

UNIVERSITE LILLE 1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DANS LA SPECIALITE « BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE »

par

Souhaila CHOUL-LI

**Le facteur de transcription Ets-1 : identification de nouveaux partenaires
protéiques et étude du clivage par les caspases**

le 17 Décembre 2009

JURY

Président :

Pr Philippe DELANNOY

Rapporteurs :

Pr Claudine MAYER

Dr Serge PLAZA

Examineur :

Dr Brigitte HARTMANN

Directeur de Thèse/Examineur : Dr Marc AUMERCIER

UNIVERSITE LILLE 1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DANS LA SPECIALITE « BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE »

par

Souhaila CHOUL-LI

**Le facteur de transcription Ets-1 : identification de nouveaux partenaires
protéiques et étude du clivage par les caspases**

le 17 Décembre 2009

JURY

Président :	Pr Philippe DELANNOY
Rapporteurs :	Pr Claudine MAYER
	Dr Serge PLAZA
Examineur :	Dr Brigitte HARTMANN
Directeur de Thèse/Examineur :	Dr Marc AUMERCIER

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à tous les membres du jury pour avoir consacré une part de leur temps précieux à l'évaluation de ce travail de Thèse. Je suis reconnaissante à Monsieur le Professeur Philippe DELANNOY d'assurer la présidence de ce jury ainsi qu'à Madame le Professeur Claudine MAYER et à Monsieur le Docteur Serge PLAZA d'avoir accepté d'assumer la contraignante fonction de rapporteur et enfin à Madame le Docteur Brigitte HARTMANN d'avoir accepté la fonction d'examineur.

Merci à Monsieur le Professeurs Yvan de LAUNOIT pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour l'intérêt montré à l'égard de mon travail.

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de Thèse, le Docteur Marc AUMERCIER, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa confiance et pour ses encouragements répétés. Merci également pour les nombreuses et enrichissantes discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec lui.

Un merci particulier au Docteur Clélia LAITEM et Arnaud LEGRAND pour leur soutien et les nombreux échanges scientifiques que nous avons eus.

Merci à Isabelle ROLAND pour son aide technique précieuse et sa bonne humeur.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur David TULASNE et à Catherine LEROY pour leur fructueuse collaboration. Je remercie également le Docteur Martine DUTERQUE-COQUILLAUD et son groupe pour le partage de leurs compétences scientifiques.

Merci à tous les membres du laboratoire, passés ou présents, qui m'ont accompagnée au long de ces trois années. Un merci particulier aux personnes qui m'ont aidée et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Agnès BEGUE, Marie-Véronique JOUBERT, le Docteur Gabriel LEPRIVIER, Hervé DROBECQ, Marie-Christine BOUCHEZ, Nicole DEVASSINE ...

Merci au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et à la Région Nord/Pas-de-Calais pour m'avoir allouée une Bourse de Docteur-Ingénieur (BDI).

SOMMAIRE

<u>ABREVIATIONS</u>	10
<u>RESUME</u>	14
<u>ABSTRACT</u>	15
<u>INTRODUCTION</u>	16
PREMIERE PARTIE : ETS-1	17
<u>CHAPITRE I : FAMILLE ETS</u>	18
I/ Origine de la famille Ets	18
II/ Présentation générale de la famille Ets	18
<u>CHAPITRE II : DU GENE A LA PROTEINE ETS-1</u>	21
I/ ARNm ets-1 et variants d'épissage alternatif	21
II/ Isoformes de la protéine Ets-1 : mise en évidence et structure	22
II-1/ <u>Ets-1 p51</u>	22
II-1-1/ Mise en évidence	22
II-1-2/ Structure	23
II-2/ <u>Ets-1 p42</u>	23
II-3/ <u>Ets-1 p27</u>	24
III/ Les domaines fonctionnels de la protéine Ets-1 : structure et fonction	25
III-1/ <u>Domaine ETS</u>	25
III-1-1/ Structure	25
III-1-2/ Fonction	26
III-2/ <u>Domaine Pointed (PNT)</u>	27
III-2-1/ Structure	27
III-2-2/ Fonction	29
III-3/ <u>Domaine transactivateur</u>	29
III-4/ <u>Domaines inhibiteurs</u>	30
III-4-1/ Structure	30
III-4-2/ Fonction	31
IV/ Sites de modifications post-traductionnelles	32
IV-1/ <u>Phosphorylation</u>	32
IV-2/ <u>Sumoylation et ubiquitination</u>	33
IV-2-1/ Mécanisme général	33
IV-2-2/ Sumoylation et ubiquitination d'Ets-1 p51	34
IV-3/ <u>Acétylation</u>	35
<u>CHAPITRE III : SPECIFICITE DE LIAISON A L'ADN D'ETS-1</u>	37
I/ Site consensus de liaison à l'ADN : identification et reconnaissance	37
I-1/ <u>Site consensus de liaison artificiel et naturel</u>	37
I-2/ <u>Mécanismes moléculaires de reconnaissance du site consensus</u>	40
II/ Auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51	41
II-1/ <u>Définition de l'auto-inhibition</u>	41
II-2/ <u>Mode d'action du module auto-inhibiteur d'Ets-1 p51</u>	42
III/ Régulation de l'auto-inhibition	44
III-1/ <u>Régulation par phosphorylation : renforcement de l'auto-inhibition</u>	45
III-2/ <u>Régulation par des interactions protéine-protéine : levée de l'auto-inhibition</u>	47
III-2-1/ Levée de l'auto-inhibition par des partenaires protéiques	47
III-2-1-a/ Interaction avec Pax-5 en présence d'ADN	47
III-2-1-b/ Interaction avec AML-1 en présence d'ADN	49
III-2-2/ Levée de l'auto-inhibition par liaison aux EBS en palindrome	50
IV/ Propriétés de liaison à l'ADN de l'isoforme Ets-1 p42	54

V/ Propriétés de liaison à l'ADN de l'isoforme Ets-1 p27.....	55
CHAPITRE IV : REGULATION D'ETS-1.....	58
I/ Régulation de l'expression du gène ets-1	58
I-1/ Promoteur humain d'ets-1 et ses facteurs régulateurs directs	58
I-2/ Signaux extracellulaires	61
I-2-1/ Signaux activateurs	61
I-2-2/ Signaux répresseurs.....	63
II/ Régulation de l'activité d'Ets-1.....	63
II-1/ Régulation par l'expression de variants d'épissage	64
II-1-1/ Régulation par l'expression de l'isoforme Ets-1 p42.....	64
II-1-2/ Régulation par l'expression de l'isoforme Ets-1 p27.....	65
II-2/ Régulation par des modifications post-traductionnelles.....	67
II-2-1/ Activation de la protéine Ets-1.....	67
II-2-1-a/ Voie des Ras-MAPKs et phosphorylation de la thréonine 38.....	67
II-2-1-b/ Autres voies.....	70
II-2-2/ Répression de la protéine Ets-1.....	70
II-2-2-a/ La voie Ca ²⁺ dépendante et phosphorylation des sérines.....	70
II-2-2-b/ Régulation par sumoylation, acétylation et ubiquitination.....	72
II-3/ Régulation par des partenaires protéiques	74
II-3-1/ Facteurs de transcription activateurs d'Ets-1.....	75
II-3-1-a/ AML-1 (appelée également PEBP2 α , CBF α 2 ou Runx-2).....	75
II-3-1-b/ HIF-2 α	77
II-3-1-c/ GHF-1/Pit-1.....	77
II-3-1-d/ AP-1 (c-Fos/c-Jun).....	78
II-3-1-e/ TFE-3.....	80
II-3-1-f/ Pax-5.....	80
II-3-1-g/ NF κ B et USF-1.....	80
II-3-1-h/ Tax-1 et Sp1.....	81
II-3-1-i/ C/EBP α	82
II-3-1-j/ Récepteurs nucléaires : VDR, ER α , PPAR α et AR.....	82
II-3-1-k/ p53 mutée.....	83
II-3-2/ Partenaires répresseurs de l'activité d'Ets-1.....	84
II-3-2-a/ EAP1/Daxx.....	84
II-3-2-b/ MafB.....	85
II-3-2-c/ EAP2.....	85
II-3-2-d/ TIP-30.....	85
II-3-2-e/ p53 sauvage.....	85
II-3-2-f/ Sp100.....	86
II-3-3/ Kinases et enzymes.....	86
II-3-3-a/ Erk-1/-2.....	86
II-3-3-b/ CaMKII.....	87
II-3-3-c/ Ubc-9 et PIASy.....	87
II-3-4/ Co-régulateurs.....	87
II-3-4-a/ CBP et p300.....	87
II-3-4-b/ HMG-A1.....	89
II-3-4-c/ SRC-1 et AIB1.....	89
II-3-5/ Partenaires protéiques régulés par Ets-1.....	89
II-3-5-a/ Stat-5.....	90
II-3-5-b/ GFI1.....	90
II-3-6/ Partenaires protéiques d'Ets-1 p42.....	90
CHAPITRE V : ROLES BIOLOGIQUES D'ETS-1	92
I/ Rôles physiologiques d'Ets-1	92
I-1/ Développement embryonnaire.....	92
I-2/ Hématopoïèse	92
I-2-1/ La lignée lymphoïde.....	93
I-2-1-a/ Les lymphocytes B.....	93
I-2-1-b/ Les lymphocytes T.....	94

I-2-1-c/ Les cellules NK	95
I-2-2/ La lignée myéloïde	95
I-2-2-a/ Mégacaryocytes.....	96
I-2-2-b/ Erythrocytes	96
I-3/ Angiogenèse.....	97
I-3-1/ Mécanisme général	97
I-3-2/ Ets-1 dans l'angiogenèse	97
I-3-2-a/ Expression associée à l'angiogenèse	97
I-3-2-b/ Rôle dans les cellules endothéliales	98
I-3-2-c/ Rôle dans les cellules SVMC	98
I-4/ Ostéogenèse	99
I-4-1/ Mécanisme général.....	99
I-4-2/ Ets-1 dans l'ostéogenèse.....	99
I-5/ Développement du système nerveux central	100
I-5-1/ Mécanisme général.....	100
I-5-2/ Ets-1 dans le développement du système nerveux.....	100
I-6/ Prolifération cellulaire.....	100
I-7/ Sénescence	101
I-8/ Apoptose	102
I-8-1/ Cibles pro-apoptotiques.....	102
I-8-2/ Cibles anti-apoptotiques	103
II/ Rôles pathologiques d'Ets-1	104
II-1/ Cancer	104
II-1-1/ Mécanisme général.....	104
II-1-2/ Ets-1 dans le cancer.....	104
II-1-2-a/ Expression associée au cancer.....	104
II-1-2-b/ Rôle dans la prolifération et la transformation cancéreuse.....	105
II-1-2-c/ Rôle dans la migration cancéreuse	106
II-1-2-d/ Rôle dans l'invasion cancéreuse.....	106
II-1-2-e/ Rôle dans la formation de métastases	107
II-1-2-f/ Rôle dans la néo-angiogenèse cancéreuse.....	107
II-2/ Autres pathologies.....	108
II-2-1/ Polyarthrite rhumatoïde.....	108
II-2-2/ Pathologies rénales.....	108
II-2-3/ Athérosclérose.....	108
DEUXIEME PARTIE : L'APOPTOSE	110
CHAPITRE I : DEFINITION ET DESCRIPTION DE L'APOPTOSE.....	111
I/ Définition	111
II/ Description de l'apoptose	111
II-1/ Caractéristiques morphologiques	111
II-2/ Caractéristiques biochimiques.....	112
CHAPITRE II : DEROULEMENT DE L'APOPTOSE.....	114
I/ Phase d'induction.....	114
I-1/ La voie des récepteurs de mort.....	114
I-2/ La voie mitochondriale.....	116
II/ Phase d'exécution	117
CHAPITRE III : LES CASPASES	118
I/ Définition	118
II/ Classification.....	118
III/ Structure.....	120
IV/ Activation.....	121
IV-1/ Activation par d'autres caspases	121
IV-2/ Activation par proximité induite	122

IV-3/ <u>Activation par association avec une sous-unité activatrice</u>	122
V/ <u>Substrats</u>	123
V-1/ <u>Sites de clivage par les caspases</u>	123
V-2/ <u>Les substrats des caspases</u>	124
V-2-1/ Perte de fonction	125
V-2-2/ Gain de fonction.....	126
<u>CHAPITRE IV : REGULATION DE L' APOPTOSE</u>	128
I/ <u>Régulation transcriptionnelle</u>	128
II/ <u>Régulation par des inhibiteurs</u>	128
II-1/ <u>Inhibiteurs naturels</u>	128
II-1-1/ CrmA et p35	128
II-1-2/ IAPs et FLIP	129
II-2/ <u>Inhibiteurs peptidiques</u>	129
III/ <u>Régulation par les membres de la famille Bcl-2</u>	129
<u>CHAPITRE V : ROLES BIOLOGIQUES DE L' APOPTOSE</u>	132
I/ <u>Rôles physiologiques</u>	132
II/ <u>Rôles pathologiques</u>	132
<u>CONTEXTE ET SUJET DE THESE</u>	134
<u>RESULTATS</u>	137
<u>PUBLICATION N°1</u>	138
I/ <u>Préambule</u>	138
II/ <u>Résumé</u>	138
III/ <u>Discussion et conclusion</u>	139
<u>PUBLICATION N°2</u>	140
I/ <u>Préambule</u>	140
II/ <u>Résumé</u>	140
III/ <u>Résultats supplémentaires</u>	141
IV/ <u>Discussion et conclusion</u>	143
<u>PUBLICATION N°3</u>	145
I/ <u>Préambule</u>	145
II/ <u>Résumé</u>	145
III/ <u>Résultats complémentaires</u>	148
III-1/ <u>Effet de Cp17 sur la survie cellulaire</u>	171
III-2/ <u>Etude de clivage de l'isoforme Ets-1 p27</u>	172
III-2-1/ <u>Mise en évidence du clivage d'Ets-1 p27 par la caspase-3</u>	172
III-2-2/ <u>Identification des sites de clivage par les caspases</u>	173
IV/ <u>Discussion et conclusion</u>	175
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	176
<u>ANNEXES</u>	183
MATERIEL ET METHODE COMPLEMENTAIRES A LA PUBLICATION N°3	184
PUBLICATION N°4	185
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	186

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différents groupes de protéines de la famille Ets chez les vertébrés.....	19
Figure 2 : Structure des différents variants de l'ARNm <i>ets-1</i> humain.....	21
Figure 3 : Les isoformes de la protéine Ets-1 : Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27.	24
Figure 4 : Alignement des séquences des domaines ETS de structure connue.....	25
Figure 5 : Structure tridimensionnelle du domaine ETS d'Ets-1 lié à sa séquence cible.....	1
Figure 6 : Alignement des séquences des domaines PNT de structure connue.....	28
Figure 7 : Structure tridimensionnelle du domaine PNT d'Ets-1.....	28
Figure 8 : Structure du module auto-inhibiteur d'Ets-1.	31
Figure 9 : Les sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Ets-1 p51.	32
Figure 10 : Modèle de sumoylation d'Ets-1.....	35
Figure 11 : Contacts moléculaires entre le domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN.....	40
Figure 12 : L'auto-inhibition et ses mécanismes de régulation.....	42
Figure 13 : Modèle structural de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.....	43
Figure 14 : Modulation de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 par phosphorylation.	46
Figure 15 : Contacts directs entre l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN dans le complexe ternaire Pax-5-ADN-Ets-1.....	1
Figure 16 : Modèle de levée mutuelle de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 et d'AML-1.	49
Figure 17 : Modèle de la fixation coopérative d'Ets-1 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.	51
Figure 18 : Complexe ternaire, Ets-1-ADN-Ets-1, au niveau des EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.	52
Figure 19 : Modèle pour la liaison différentielle d'Ets-1 p51 et Ets-1 p42 au niveau des EBS en palindrome du promoteur de la stromélysine-1.....	53
Figure 20 : Structure de l'isoforme Ets-1 p42 par comparaison à celle d'Ets-1 p51.	54
Figure 21 : Structure de l'isoforme Ets-1 p27 par comparaison à celle d'Ets-1 p51.	56
Figure 22 : Promoteur du gène <i>ets-1</i>	58
Figure 23 : Régulation de l'expression du gène <i>ets-1</i> par des signaux extracellulaires.....	62
Figure 24 : Modèle de la fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27.	66
Figure 25 : Voie Ras-MAPK.....	68
Figure 26 : Activation de la CaMKII par la voie Ca ²⁺ dépendante.	71
Figure 27 : Schéma représentant les partenaires d'interaction connus d'Ets-1 (liste non exhaustive).....	74
Figure 28 : Modèle du complexe multiprotéique formé au niveau de l'« enhancer » du gène de TCR α	76
Figure 29 : Modèle du complexe transcriptionnel nécessaire pour la transactivation du promoteur du gène de TNF- α	88
Figure 30 : Schéma représentant les partenaires d'interaction connus d'Ets-1 p42.....	91
Figure 31 : Etapes de différenciation lymphoïde et myéloïde au cours de l'hématopoïèse... ..	93
Figure 32 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.	112
Figure 33 : La voie extrinsèque de l'apoptose ou la voie des récepteurs de mort.....	115
Figure 34 : La voie intrinsèque de l'apoptose ou la voie mitochondriale.	116
Figure 35 : Représentation des différents groupes des caspases humaines.....	119
Figure 36 : Structure tridimensionnelle de la caspase-3 humaine active.	1

Figure 37 : Activation des caspases par d'autres caspases.....	121
Figure 38 : Schéma récapitulatif des deux voies d'activation des caspases au cours de l'apoptose, et de leur interconnexion.	123
Figure 39 : La PARP-1 interagit avec Ets-1 dans la cellule.....	142
Figure 40 : Le fragment de clivage Cp17 induit la mort cellulaire.	171
Figure 41 : Ets-1 p27 est clivée par la caspase-3 <i>in vitro</i>	173
Figure 42 : Représentation schématique de la protéine Ets-1 p27 montrant les sites putatifs de clivage par les caspases.	173
Figure 43 : Ets-1 p27 est clivée au niveau de trois sites localisés dans la région codée par l'exon VII.	174

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Consensus de liaison artificiel déterminé par sélection <i>in vitro</i> pour différentes protéines Ets.	38
Tableau 2 : Consensus de liaison naturel d'Ets-1, déterminé par l'alignement des sites présents dans ses promoteurs cibles.	39
Tableau 3 : Séquences des EBS en palindrome dans le promoteur des gènes <i>stromélysine-1</i> et <i>p53</i>	50
Tableau 4 : Partenaires protéiques coopérant avec Ets-1 pour l'activation de gènes cibles. ..	75
Tableau 5 : Partenaires protéiques réprimant l'activité d'Ets-1.	84
Tableau 6 : Spécificités de substrat des caspases humaines.	124
Tableau 7 : Exemples de substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose.	125
Tableau 8 : Les principaux membres de la famille Bcl-2.	130
Tableau 9 : Partenaires d'interaction des isoformes d'Ets-1 identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.	141

ABREVIATIONS

A

AAD	« <u>a</u> cidic <u>a</u> ctivation <u>d</u> omains »
ADN	« <u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique »
AIB1	« <u>a</u> mplified in <u>b</u> reast cancer <u>1</u> »
AIF	« <u>a</u> ppoptosis- <u>i</u> nducing <u>f</u> actor »
AML-1	« <u>a</u> cute <u>m</u> yeloid <u>l</u> eukemia- <u>1</u> »
AMV	« <u>a</u> vian <u>m</u> yeloblastosis <u>v</u> irus »
AP-1/-2	« <u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein- <u>1</u> / <u>-2</u> »
Apaf-1	« <u>a</u> ppoptotic <u>p</u> rotease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor- <u>1</u> »
AR	« <u>a</u> ndrogen <u>r</u> eceptor »
ARE	« <u>a</u> ntioxydant <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement »
ATF	« <u>a</u> ctivating <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor »
ARNm	« <u>a</u> cide <u>r</u> ibonucléique <u>m</u> essenger »

B

Bax	« <u>b</u> cl-2- <u>a</u> ssociated <u>x</u> »
Bcl-2	« <u>B</u> - <u>c</u> ell lymphoma- <u>2</u> »
Bcl-XL	« <u>B</u> cl- <u>e</u> xtra <u>l</u> arge »
bFGF	« <u>b</u> asic <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor »
BH	« <u>B</u> cl-2 <u>h</u> omology <u>d</u> omain »
Bid	« <u>B</u> cl2 <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein »
BIR	« <u>b</u> aculovirus <u>I</u> AP <u>r</u> epeats »
Blimp-1	« <u>B</u> lymphocyte- <u>i</u> nduced <u>m</u> aturation <u>p</u> rotein- <u>1</u> »
BR-LZ	« <u>b</u> asic <u>r</u> egion- <u>l</u> eucine <u>z</u> ipper »

C

CAD	« <u>c</u> aspase- <u>a</u> ctivated <u>D</u> Nase »
CARD	« <u>c</u> aspases <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omain »
caspase	« <u>c</u> ysteiny <u>l</u> - <u>a</u> spartate- <u>s</u> pecific <u>p</u> rotease »
CIITA	« <u>c</u> lass <u>I</u> I <u>t</u> rans- <u>a</u> ctivator »
CaM	« <u>c</u> al <u>m</u> oduline »
CaMKII	« <u>c</u> alcium/ <u>c</u> al <u>m</u> odulin- <u>d</u> ependent protein <u>k</u> inase <u>I</u> I »
CAP	« <u>c</u> atabolite <u>g</u> ene <u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein »
CBF α 2	« <u>c</u> ore <u>b</u> inding <u>f</u> actor <u>α2</u> »
CBP	« <u>C</u> REB- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein »
CCL-2	« <u>C</u> C <u>c</u> hemokine <u>l</u> igand- <u>2</u> »
Cdk	« <u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase »
C/EBP α	« <u>C</u> CAAT/ <u>e</u> nhancer <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u>α</u> »
ced	« <u>C</u> aenorhabditis <u>e</u> legans <u>d</u> eath »
ChIP	« <u>c</u> hromatine <u>i</u> mmunoprécipitation »
CMH	« <u>c</u> omplexe <u>m</u> ajeur d' <u>h</u> istocompatibilité »
CREB	« <u>c</u> AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement <u>b</u> inding »
CrmA	« <u>c</u> ytokine <u>r</u> esponse <u>m</u> odifier <u>A</u> »
CSF-1	« <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor- <u>1</u> »

D

Da	« <u>D</u> alton »
DAG	« <u>d</u> iacylglycérol »
DBD	« <u>D</u> N <u>A</u> <u>b</u> inding <u>d</u> omain »
DD	« <u>d</u> eath <u>d</u> omain »
DED	« <u>d</u> eath <u>e</u> ffector <u>d</u> omain »
DISC	« <u>d</u> eath- <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex »
DMEM	« <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium »
DNA-PK	« <u>D</u> N <u>A</u> <u>d</u> eependent- <u>p</u> rotein <u>k</u> inase »
DNA-PKcs	« <u>D</u> N <u>A</u> - <u>P</u> K <u>c</u> atalytic <u>s</u> ubunit »
DOR	« <u>d</u> elta- <u>o</u> pioid <u>r</u> eceptor »
DGK	« <u>d</u> iacylglycerol <u>k</u> inase »
DR4/5	« <u>d</u> eath <u>r</u> eceptor <u>4</u> / <u>5</u> »

<u>E</u>	
E	« <u>embryonic day</u> »
E2F-4	« <u>E2 promoter binding factor-4</u> »
EAP1/2	« <u>Ets-1 associated protein 1/2</u> »
EBS	« <u>ETS binding site</u> »
EGF	« <u>epidermal growth factor</u> »
Elf	« <u>E74 like factor</u> »
Elk-1	« <u>ETS like-1</u> »
Env	« <u>envelope</u> »
Eph	« <u>ephrin</u> »
Er-71/-81	« <u>ETS related-71 /-81</u> »
ER α	« <u>estradiol receptor α</u> »
ERE	« <u>estradiol response element</u> »
Erg	« <u>ETS-related gene</u> »
Erk	« <u>extracellular signal-regulated kinase</u> »
ES	« <u>embryonic stem</u> »
Ese-1/-2	« <u>epithelium specific ETS-1/-2</u> »
Ets	« <u>E-twenty-six specific</u> »
<u>F</u>	
FADD	« <u>Fas-associated death domain</u> »
FAK	« <u>focal adhesion kinase</u> »
FasL	« <u>Fas ligand</u> »
FGF	« <u>fibroblast growth factor</u> »
Fli-1	« <u>Friend leukemia integration-1</u> »
FLICE	« <u>Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme</u> »
FLIP	« <u>FLICE-like inhibitory protein</u> »
Flk-1	« <u>fetal liver kinase-1</u> »
<u>G</u>	
G1	« <u>growth 1</u> »
GABP- α	« <u>GA binding protein-α</u> »
<i>GADD153</i>	« <u>growth arrest and DNA damage inducible gene 153</u> »
Gag	« <u>group specific antigen</u> »
GAS	« <u>gamma interferon (IFNγ) activated site</u> »
GDP	« <u>guanosine diphosphate</u> »
GFI1	« <u>growth factor independent 1</u> »
GHF-1	« <u>growth hormone factor-1</u> »
GM-CSF	« <u>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</u> »
GTP	« <u>guanosine triphosphate</u> »
Grb2	« <u>growth factor receptor-binding protein 2</u> »
GST	« <u>glutathione S-transferase</u> »
<u>H</u>	
HDAC	« <u>histone désacétylase</u> »
Hdm2	« <u>human double minute 2 protein</u> »
HEK-293	« <u>human embryonic kidney-293</u> »
HER2	« <u>human epidermal growth factor receptor 2</u> »
HGF/SF	« <u>hepatocyte growth factor/scatter factor</u> »
HIF-1/-2 α	« <u>hypoxia inducible factor-1/-2α</u> »
HLA-DR	« <u>human leukocyte antigens-DR</u> »
HMG-A1	« <u>high mobility group protein-A1</u> »
HNF-3 γ	« <u>hepatocyte nuclear factor-3γ</u> »
Hoxb-1	« <u>homeobox-1</u> »
HoxC4	« <u>homeobox C4</u> »
HRE	« <u>hypoxia responsive element</u> »
HSF-1	« <u>heat shock factor protein-1</u> »
HTH	« <u>helix-turn-helix</u> »
HTLV-1	« <u>human T-lymphotropic virus type-1</u> »
HUVEC	« <u>human umbilical vein endothelial cell</u> »
<u>I</u>	
IAP	« <u>inhibitor of apoptosis protein</u> »
ICAD	« <u>inhibitor of caspase-activated DNase</u> »

ICE	« interleukin 1β-converting enzyme »
Ig	« immunoglobuline »
IL	« interleukine »
IKKα	« IκB kinase α »
IP ₃	« inositol 1,4,5-triphosphate ₃ »
J	
JNK	« c-Jun N-terminal kinase »
L	
LANA	« latency-associated nuclear antigen »
LEF-1	« lymphocyte enhancer factor-1 »
LPS	« lipopolysaccharide »
LTR	« long terminal repeat »
M	
MALDI-TOF	« matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight »
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MDCK	« Madin-Darby canine kidney »
Mdm2	« murine double minute 2 »
MDR-1	« multi drug resistance-1 »
MEC	« matrice extracellulaire »
Mef	« myeloid Elf-1-like factor »
MEF2	« myocyte enhancer factor 2 »
MLCK	« myosin light-chain kinase »
MMP	« matrix metalloproteinase »
Mo-MLV	« Moloney-murine leukemia virus »
MRG-1	« MSG1 (« melanocyte-specific gene-1 »)-related gene-1 »
N	
NFκB	« nuclear factor kappa B »
NK	« natural killer »
NKT	« natural killer T »
NO	« nitric oxide »
NRDB	« negative regulatory region of DNA binding »
NRE	« negative regulatory element »
Nrf-2	« nuclear factor-E2-related factor-2 »
O	
Oct	« octamer »
Omi/HtrA2	« Omi/high temperature requirement protein A2 »
P	
PARP-1	« poly (ADP-ribose) polymerase »
p300	« E1A binding protein p300 »
pb	paire de bases
Pc2	« polycomb 2 protein »
PCR	« polymerase chain reaction »
Pdef	« prostate-derived Ets factor »
PDGF	« platelet-derived growth factor »
PDGF-R/α	« PDGF receptor α »
Pea-3	« polyomavirus enhancer A binding protein-3 »
PEBP2α	« polyomavirus enhancer binding protein 2α »
Perp	« p53 apoptosis effector related to PMP-22 »
PIAS	« protein inhibitor of activated STAT »
PIP ₂	« phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphates ₂ »
PKC-α	« protein kinase C-α »
PLC	« phospholipase C »
PMA	« phorbol 12-myristate 3-acetate »
PNT	« domaine Pointed »
pol	« polymérase »
PPARγ	« peroxisome proliferator-activated receptor γ »
PTHrP	« parathyroid hormone-related protein »
Pu-1	« purine rich-1 »
R	
RanBP2	« Ran binding protein 2 »

RAR α	« <u>retinoic acid receptor α</u> »
RARE	« <u>retinoic acid response element</u> »
Rb	« <u>retinoblastoma protein</u> »
RelHD	« <u>300-amino-acid Rel homology domain</u> »
RMN	« <u>résonance magnétique nucléaire</u> »
RRE	« <u>Ras responsive element</u> »
Runx-2	« <u>Runx-related transcription factor-2</u> »
S	
SAAB	« <u>selected and amplified binding site</u> »
SAM	« <u>sterile alpha motif</u> »
SAP-1	« <u>SRF accessory protein-1</u> »
SDS-PAGE	« <u>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</u> »
SENP-1	« <u>SUMO/sentrin-specific protease-1</u> »
SRF	« <u>serum response factor</u> »
SM α -actine	« <u>smooth muscle-α actin</u> »
Smac/Diablo	« <u>second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI</u> »
Smad3	« <u>smad- and mad-related protein 3</u> »
SMARCA5	« <u>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5</u> »
SOS	« <u>son of sevenless</u> »
SRC-1	« <u>steroid receptor coactivator-1</u> »
Stat-5	« <u>signal transducer and activator of transcription-5</u> »
Ste4p	« <u>sterile 4p</u> »
SUMO	« <u>small ubiquitin-like modifier</u> »
SVF	« <u>sérum de veau fœtal</u> »
SVMC	« <u>smooth vascular muscle cells</u> »
T	
TAD	« <u>transactivation domain</u> »
Tax-1	« <u>transactivator of pX-1</u> »
TBP	« <u>TATA box binding protein</u> »
TCR	« <u>T-cell receptor</u> »
Tel	« <u>translocation ETS leukemia</u> »
TEM	« <u>transition épithélio-mésenchymateuse</u> »
TFE-3	« <u>transcription factor E-3</u> »
TGF	« <u>transforming growth factor</u> »
TH	« <u>T-helper</u> »
TIMP	« <u>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</u> »
TIP-30	« <u>30 kDa Tat-interacting protein</u> »
TLR-9	« <u>toll-like receptor-9</u> »
TNF- α	« <u>tumor necrosis factor-α</u> »
TNF-R	« <u>tumor necrosis factor-receptor</u> »
TORU	« <u>TPA oncogene response unit</u> »
TPA	« <u>12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate</u> »
TRADD	« <u>TNFR-associated death domain</u> »
TRAIL	« <u>TNF-related apoptosis inducing ligand</u> »
TRBP	« <u>thyroid hormone receptor-binding protein</u> »
TXSA	« <u>thromboxane synthase</u> »
U	
Uba-2	« <u>ubiquitin-activating enzyme-2</u> »
Ubc-9	« <u>ubiquitin conjugating enzyme-9</u> »
uPA	« <u>urokinase plasminogen activator</u> »
USF-1	« <u>upstream stimulatory factor-1</u> »
UV	« <u>ultra-violets</u> »
V	
VDR	« <u>vitamin D receptor</u> »
VDRE	« <u>vitamin D response element</u> »
VEGF	« <u>vascular endothelial growth factor</u> »
VIH	« <u>virus de l'immunodéficience humaine</u> »
W	
wHTH	« <u>winged helix-turn-helix</u> »

RESUME

Ets-1 est un facteur de transcription, membre de la famille Ets, possédant un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé permettant de reconnaître un cœur consensus, GGAA/T, présente dans le promoteur des gènes cibles. Ce facteur régule des gènes impliqués dans divers processus physiologiques et pathologiques, tels que le développement, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, l'apoptose, ou l'invasion tumorale. A l'heure actuelle, trois isoformes d'Ets-1 sont décrites chez l'homme : l'isoforme majoritaire de pleine longueur Ets-1 p51 et les isoformes Ets-1 p42 et Ets-1 p27, issues, respectivement, d'épissage alternatif de l'exon VII et des exons III à VI du gène.

Les protéines Ets-1 n'agissent pas seules au niveau de leurs promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de partenaires protéiques. De plus, elles sont des cibles nucléaires de nombreuses voies de transduction du signal. L'identification de nouvelles protéines interagissant avec les isoformes d'Ets-1 devrait donc nous permettre de mieux appréhender certaines de leurs fonctions intrinsèques. Dans ce but, nous avons, tout d'abord, mis au point un système procaryote de production des isoformes d'Ets-1 biotinylées qui conservent les propriétés fonctionnelles de la protéine Ets-1 native. Ces protéines nous ont par la suite permis de mettre au point une stratégie de purification par affinité des partenaires protéiques d'Ets-1 grâce à la réaction streptavidine-biotine. Nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires protéiques potentiels. Parmi ceux-ci, nous avons pu confirmer comme partenaires d'interaction des isoformes d'Ets-1, les trois protéines du complexe DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) : Ku70, Ku86 et DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit). Outre son rôle dans la réparation des cassures de l'ADN, la DNA-PK est connue pour être impliquée dans la régulation transcriptionnelle et la phosphorylation d'un certain nombre de facteurs de transcription. Ainsi, nous avons montré que les isoformes d'Ets-1 représentent des substrats de phosphorylation par la DNA-PK. De plus, la surexpression de la protéine Ku86 diminue l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 p51. Ces résultats ont permis de définir un nouveau lien entre les protéines de réparation de l'ADN et Ets-1, ainsi qu'une nouvelle régulation de son activité qui pourrait fournir de nouveaux indices pour comprendre les diverses fonctions des Ets-1.

Dans une autre étude, nous avons démontré qu'Ets-1 p51 est un nouveau substrat de la caspase-3, protéase effectrice de la machinerie apoptotique. En effet, Ets-1 p51, mais pas le variant d'épissage Ets-1 p42, est clivé *in vitro* et dans des cellules apoptotiques par la caspase-3. Ce clivage génère trois fragments C-terminaux : Cp20, Cp17 et Cp14 et un fragment N-terminal Np36. Ces fragments sont issus de clivages au niveau de trois sites de coupure par la caspase-3 présents dans la région codée par l'exon VII du gène. Le clivage d'Ets-1 p51 produit des fragments C-terminaux contenant le domaine de liaison à l'ADN mais pas le domaine de transactivation. Ainsi, le fragment Cp17, le principal produit de clivage généré durant l'apoptose, est capable de bloquer l'activation des promoteurs cibles induites par Ets-1 p51, démontrant ainsi ses propriétés de dominant négatif naturel. Ces données suggèrent un nouveau mécanisme de régulation d'Ets-1 p51 *via* son clivage par la caspase-3 en générant un fragment dominant négatif qui peut jouer un rôle actif durant l'apoptose.

ABSTRACT

Ets-1 is a transcription factor, member of the Ets family, having a well-conserved DNA binding domain which recognizes a core consensus sequence, GGAA/T, present in the promoter of target genes. This factor regulates genes involved in various physiological and pathological processes, such as development, haematopoiesis, angiogenesis, apoptosis and tumour invasion. To date, three isoforms were described in human: Ets-1 p51, the predominant full-length isoform, Ets-1 p42 and Ets-1 p27, shorter alternatively spliced isoforms lacking the region encoded by exon VII and exon III to VI, respectively.

Ets-1 proteins do not act alone on their target promoters but with a wide range of protein partners. Moreover, they are nuclear targets of many signal transduction pathways. Identifying novel proteins that interact with Ets-1 isoforms should permit a better understanding of the intrinsic functions of the Ets-1 isoforms. For this purpose, we first developed a prokaryotic system for production of biotinylated Ets-1 isoforms that conserve native Ets-1 properties. These proteins allowed us to develop an affinity purification strategy of Ets-1 interaction partners using streptavidin pull-down assay. We thereby identified new potential interaction partners. Among those, we could confirm as interaction partners of Ets-1 isoforms, a heterotrimeric complex of DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK), made up of Ku70, Ku86 and DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKcs). Besides its role in the repair of DNA breaks, DNA-PK is known to regulate transcription and phosphorylates a number of transcription factors. We demonstrated that this complex phosphorylates the Ets-1 isoforms. Furthermore, the overexpression of Ku86 down-regulates the transcriptional activity of Ets-1. These results have permitted to identify a new correlation between the DNA repair proteins and Ets-1 as well as a new regulation of its activity that could provide new clues to understand the diverse functions of Ets-1.

In another study, we demonstrated that Ets-1 p51 is a novel cleavage substrate of caspase-3, an effector protease of apoptosis. Indeed, Ets-1 p51, but not the spliced variant Ets-1 p42, is processed *in vitro* and in cells undergoing apoptosis by caspase-3. These cleavages lead to the generation of three C-terminal fragments Cp20, Cp17 and Cp14 and a N-terminal fragment, Np36. These fragments are generated by cleavage at three sites located in the exon VII-encoded region of Ets-1 p51. In Ets-1 p51, cleavage generates C-terminal fragments containing the DNA binding domain but lacking the transactivation domain. The Cp17 fragment, the major cleavage product generated during apoptosis, inhibits Ets-1 p51-mediated transactivation of target genes, acting thus as a natural dominant-negative of the full-length Ets-1 p51 protein. These data suggest a novel mechanism of Ets-1 p51 regulation through its caspase-mediated cleavages and generation of a dominant-negative fragment, which may play an active role during apoptosis.

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : Ets-1

CHAPITRE I : Famille Ets

I/ Origine de la famille Ets

L'histoire de la famille Ets débute en 1983 avec la découverte du gène *ets-1* sous sa forme oncogénique, désignée *v-ets* (« *E*-*t*wenty-*s*ix specific »), lors de l'isolement du génome du rétrovirus aviaire transformant E26 [2]. La démarche originelle fut de définir la séquence responsable de la capacité particulière de ce virus à induire à la fois des érythroblastoses et des myéloblastoses chez le poulet [3]. La séquence alors identifiée correspondait à un gène de fusion de structure tripartite *gag-myb-ets*, contenant deux oncogènes : *v-myb* et *v-ets*, en remplacement des gènes *pol* et *env* de la structure classique (*gag-pol-env*). Le gène *v-myb* était déjà connu puisque précédemment décrit chez le rétrovirus transformant AMV (« avian myeloblastosis virus »), contrairement à l'oncogène *v-ets* [4].

Il s'en suivit l'identification de la forme proto-oncogénique d'*ets-1*, désignée *c-ets*, dans le génome aviaire et humain par homologie avec *v-ets* [5, 6]. Sur la base d'homologies de séquence avec *c-ets*, toute une famille de gène fut ensuite découverte et qui est désormais baptisée du nom de son fondateur, la famille Ets. Elle put être détectée chez une variété d'organismes métazoaires, depuis l'éponge jusqu'à l'homme en passant par le nématode, la drosophile et l'oiseau [7, 8]. Le nombre de membres de la famille Ets s'est ainsi considérablement élargi au cours de l'évolution, et ce par duplications successives à partir de quelques gènes *ets* ancestraux [9]. A ce jour, 27 membres ont été recensés chez les vertébrés.

II/ Présentation générale de la famille Ets

La famille des gènes *ets* code des facteurs de transcription au pouvoir activateur ou répresseur, répartis en 12 groupes chez les vertébrés selon la similarité de leurs séquences (Figure 1) [8, 10]. La caractéristique majeure de cet ensemble de protéines est la présence d'un domaine de liaison à l'ADN fortement conservé, le domaine ETS [11]. Celui-ci constitue la signature de cette famille car il n'est retrouvé chez aucun autre ensemble de facteurs de transcription. Ce domaine est capable de reconnaître un élément spécifique de l'ADN dénommé EBS (« Ets binding site »). Un EBS est constitué d'environ 9 paires de bases incluant une séquence centrale de consensus 5'-GGAA/T-3' [12]. Ce site consensus de liaison, présent dans de nombreux promoteurs cibles, permet aux facteurs Ets de réguler l'expression de plus de 200 gènes de façon positive ou négative selon la présence d'un

domaine transactivateur ou transrépresseur [10, 13]. De plus, un autre domaine est conservé chez un certain nombre de membres de la famille Ets, le domaine Pointed (PNT). Celui-ci est impliqué dans les interactions protéine-protéine (Figure 1) [14].

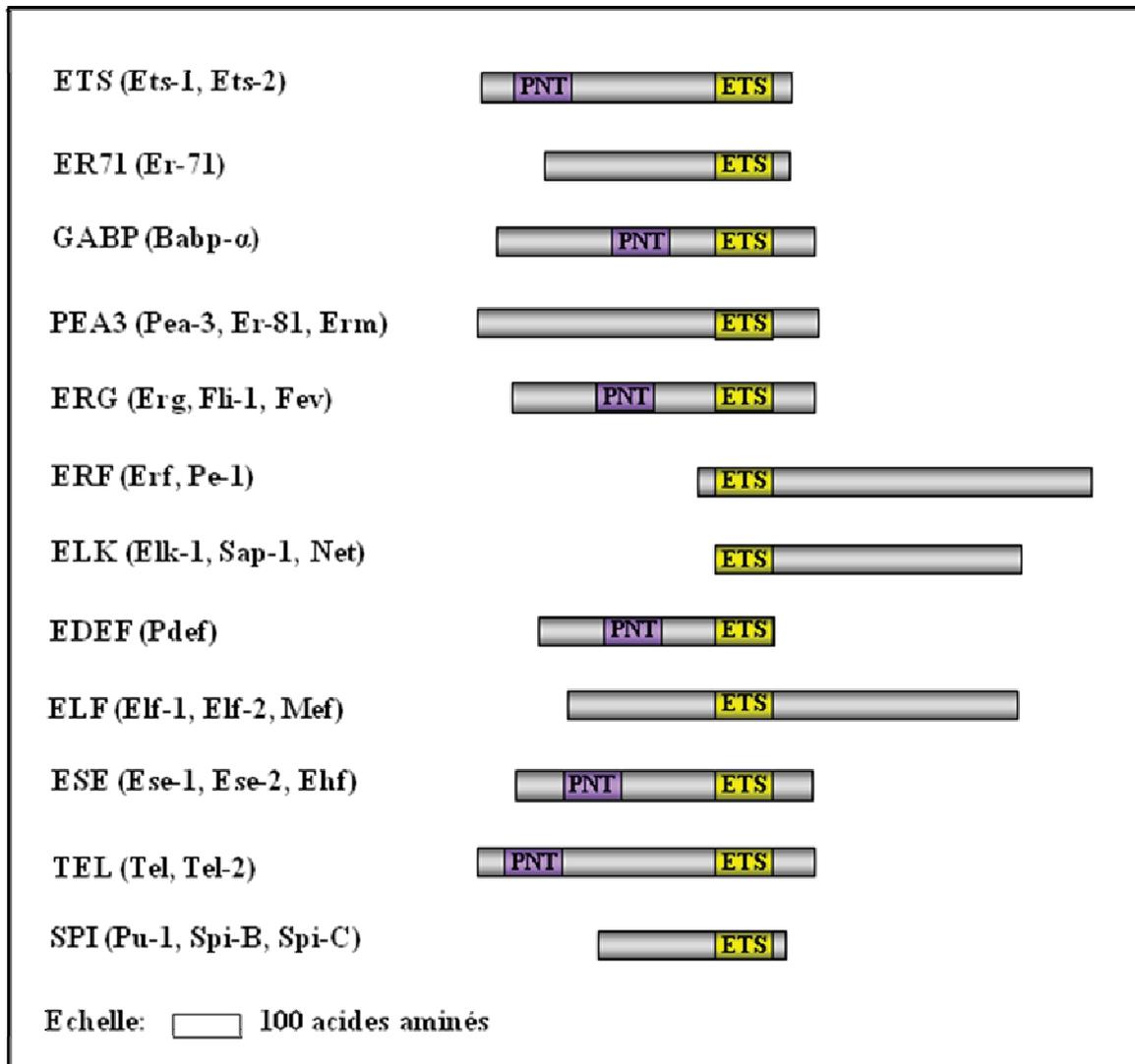


Figure 1 : Représentation des différents groupes de protéines de la famille Ets chez les vertébrés.

Les protéines composant chaque groupe sont indiquées entre parenthèses. Les domaines principaux ont été représentés, à savoir le domaine ETS en jaune et le domaine Pointed (PNT) en violet. D'après [10].

De manière générale, les facteurs Ets n'agissent pas seuls au niveau de leurs promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de partenaires protéiques selon le contexte biologique [15]. De plus, les protéines Ets sont des cibles nucléaires de nombreuses voies de transduction cellulaire, leur conférant ainsi un rôle d'intégrateur des signaux extracellulaires [16]. En conséquence de leurs fonctions de régulateurs transcriptionnels et de médiateurs de la signalisation, ces protéines sont impliquées dans des processus physiologiques, tels que le

développement, l'angiogenèse, la morphogenèse mais aussi dans des pathologies telles que le cancer, la polyarthrite rhumatoïde ou la glomérulonéphrite [10].

De manière surprenante, chaque membre de la famille Ets est capable de réguler un lot particulier de gènes lui permettant d'agir de façon spécifique malgré la forte conservation du domaine ETS et du site de liaison reconnu [13]. Ainsi, se pose une question fondamentale : comment une protéine Ets donnée est capable d'agir spécifiquement vis-à-vis des autres membres de la famille ? A partir de l'analyse des travaux menés sur la protéine Ets-1, nous tenterons de mettre en lumière les mécanismes mis en jeu par ce facteur pour atteindre cette spécificité d'action ainsi que les processus cellulaires la contrôlant.

CHAPITRE II : Du gène à la protéine Ets-1

I/ ARNm *ets-1* et variants d'épissage alternatif

Le gène humain *ets-1* est localisé dans la région q23 du chromosome 11 et s'étend sur 60 kb. Après l'activation de son promoteur, le gène *ets-1* est transcrit en un ARNm précurseur contenant 8 exons (numérotés A, III-IX) interrompus par 7 introns éliminés durant sa maturation [17, 18]. Il en résulte la génération d'un transcrit *ets-1* majoritaire de pleine longueur qui s'étend sur 6,8 kb (Figure 2).

L'ARNm *ets-1* précurseur peut également être sujet à l'élimination de séquences par le mécanisme d'épissage alternatif. En effet, une analyse par Northern-blot des ARNm purifiés *via* leur queue poly-A a mis en évidence la présence d'un transcrit *ets-1* de 2,7 kb (en plus de celui de 6,8 kb) dans les cellules lymphoïdes [19]. Celui-ci conserve les 8 exons du gène *ets-1* mais est dépourvu d'une partie de la région 3' non codante du transcrit de 6,8 kb. Puisqu'il existe plusieurs sites de polyadénylation dans l'ARNm précurseur d'*ets-1*, ceci suggère que ce nouveau variant est issu de l'utilisation d'un site de polyadénylation différent. D'ailleurs, ce variant de 2,7 kb est moins stable que le transcrit majoritaire, ce qui est en corrélation avec le rôle de la queue polyA dans la stabilisation des ARNm [19].

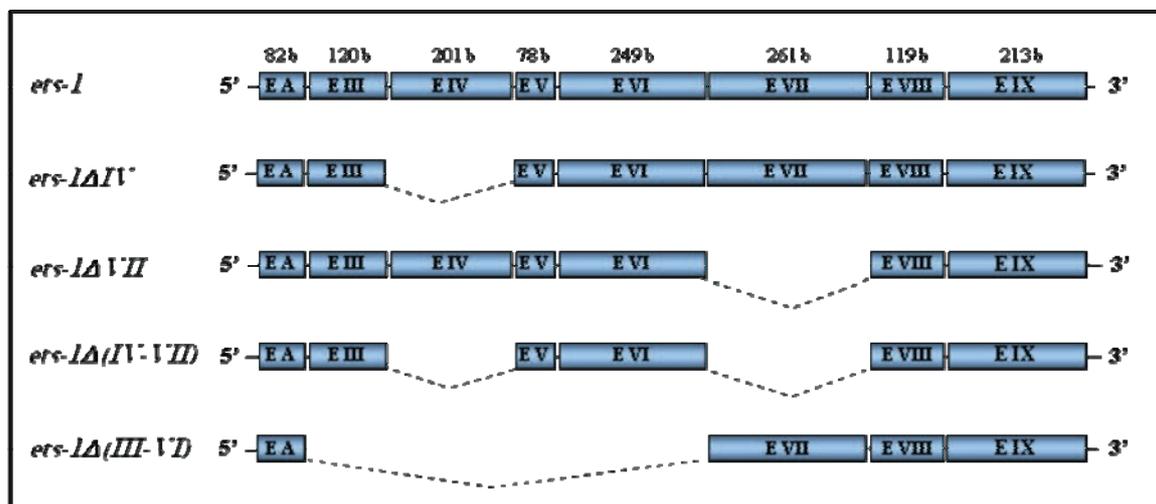


Figure 2 : Structure des différents variants de l'ARNm *ets-1* humain.

Les exons (E) sont représentés par des rectangles bleus et leur longueur est indiquée en nombre de bases (b). D'après [18, 20].

Plusieurs travaux, menés dans des lymphocytes périphériques [18] ainsi que dans les cellules blastiques prélevées chez des patients atteints de leucémie [19], ont ensuite permis d'identifier des variants d'épissage de l'ARNm *ets-1* humain ne possédant pas les exons IV,

VII ou les deux. Ils sont respectivement désignés *ets-1ΔIV*, *ets-1ΔVII* et *ets-1Δ(IV-VII)* (Figure 2).

Le variant résultant de l'épissage alternatif de l'exon VII avait été préalablement détecté dans une étude réalisée sur les cellules T humaines, MOLT-4. Néanmoins, les données bibliographiques de l'époque n'avaient pas permis d'identifier la séquence épissée comme correspondant à celle de l'exon VII [21]. De façon tout à fait intéressante, ce variant *ets-1ΔVII*, identifié chez l'homme, est retrouvé chez d'autres espèces telles que le rat, la souris et le lapin [17, 22].

Un nouveau transcrit d'*ets-1* de 0,3 kb a été récemment identifié par notre équipe lors de l'isolement de l'ADNc d'*ets-1* de lapin dans des cellules d'une lignée de fibroblastes synoviaux, HIG-82 [20]. Il s'agit d'un nouveaux variant d'épissage alternatif, désigné *ets-1Δ(III-VI)*, qui est constitué des exons A et VII à IX, mais ne possède pas les exons III à VI (Figure 2). Le patron d'expression de ce variant suit celui d'*ets-1*. Néanmoins, le taux de ce transcrit alternatif est généralement très faible comparé à celui du transcrit de pleine longueur *ets-1*.

II/ Isoformes de la protéine Ets-1 : mise en évidence et structure

A l'heure actuelle chez l'homme, seuls trois des ARNm matures d'*ets-1* sont responsables de la synthèse d'une protéine détectable. En effet, une isoforme de pleine longueur de 51 kDa a tout d'abord été décrite et dénommée Ets-1 p51 (également désignée Ets-1) en rapport avec son poids moléculaire apparent. Il s'en suivit la caractérisation d'une isoforme de 42 kDa nommée Ets-1 p42.

Récemment, une nouvelle isoforme d'Ets-1 de faible poids moléculaire a été identifiée par notre équipe et dénommée Ets-1 p27 en rapport avec son poids moléculaire apparent. Par conséquent et en plus de la protéine de pleine longueur Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27 sont les seules isoformes d'Ets-1, issues d'épissage alternatif, décrites à ce jour dans la littérature.

II-1/ Ets-1 p51

II-1-1/ Mise en évidence

La protéine correspondant au produit du gène *c-ets-1* a été caractérisée, pour la première fois en 1985, à la suite du clonage de l'oncogène *v-myb-ets* transduit par le rétrovirus aviaire transformant E26. Ceci a permis la production d'un anti-sérum spécifique du produit du gène *v-myb-ets* synthétisé dans des bactéries. Cet anti-sérum a détecté une

protéine de 56 kDa dans les organes lymphoïdes de poulet et dans les lymphocytes T et B aviaires et humaines. Cette protéine a été également détectée par un autre anti-sérum plus spécifique, anti-v-Ets, correspondant au même anti-sérum anti-v-Myb-Ets absorbé préalablement avec le produit du gène *v-myb* [23].

L'année suivante, une étude montre l'existence d'une protéine de 54 kDa, détectée à l'aide d'un anti-sérum dirigé contre le domaine Ets de la protéine virale p135^{gag-myb-ets} (protéine de 135 kDa codée par le gène *v-ets* fusionné avec le gène viral *gag* et l'oncogène *myb*). Cette protéine a été détectée dans plusieurs lignées cellulaires et tissus de poulet, et plus particulièrement dans les thymocytes et les lymphocytes bursales [24].

L'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique d'un peptide de la protéine v-Ets [25] ainsi qu'un anticorps monoclonal spécifique de la protéine Ets-1 humaine [26] a permis d'identifier la protéine Ets-1 humaine de 51 kDa.

II-1-2/ Structure

La protéine de 51 kDa, dénommée Ets-1 p51, correspond à l'isoforme de pleine longueur de 441 acides aminés issue du transcrite majoritaire *ets-1* qui contient l'intégralité des exons (Figure 3). Elle est constituée de cinq domaines protéiques plus ou moins conservés au sein de la famille Ets et possédant des fonctions diverses responsables de son activité de facteur de transcription. Il s'agit d'un domaine de fixation à l'ADN (le domaine ETS), d'un domaine de transactivation (le domaine TAD), d'un domaine d'interactions protéine-protéine (le domaine Pointed ou PNT) et de deux domaines inhibiteurs (les domaines I) (Figure 3).

II-2/ Ets-1 p42

Une étude menée en 1990 sur les cellules T murines, KB5-C20, décrit l'expression de deux isoformes d'Ets-1 [27]. L'isoforme minoritaire de plus faible poids moléculaire n'est pas détectée avec un anticorps dirigé contre le domaine codé par l'exon VII. La même année, une autre étude menée sur les cellules T humaines, CEM, montre l'existence d'une protéine de 42 kDa, détectée à l'aide de différents anticorps monoclonaux dirigés contre Ets-1 mais pas avec celui ciblant le domaine codé par l'exon VII [26]. Cette isoforme, dénommée Ets-1 p42, est donc codée par le variant *ets-1ΔVII*, qui est effectivement exprimé dans ce modèle cellulaire. Ets-1 p42 ne contient donc plus les acides aminés 245 à 331 comprenant le domaine inhibiteur N-terminal (Figure 3).

L'isoforme Ets-1 p42 a ensuite été décrite dans des modèles cellulaires variés tels que les cellules humaines de carcinome colique [15, 28] ou mammaire [29, 30], de mélanome [30]

mais aussi dans les cellules T normales ou issues de leucémie et dans les astrocytes normaux ou issus d'astrocytome [31].

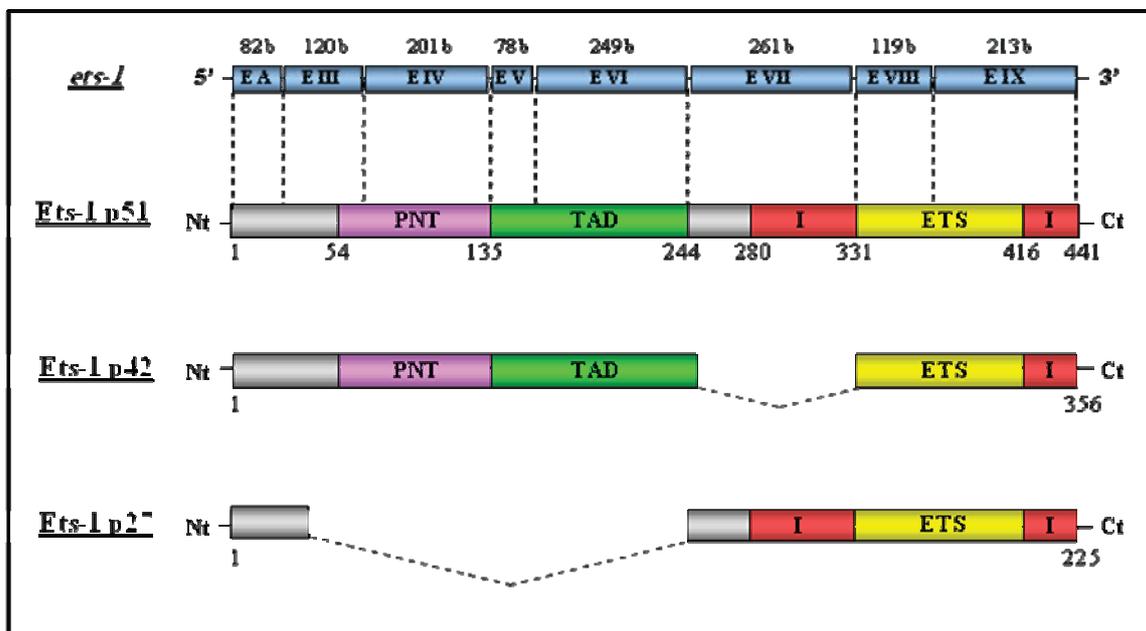


Figure 3 : Les isoformes de la protéine Ets-1 : Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine de transactivation (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge, le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée. La structure de l'ARNm *ets-1* est figurée et alignée par rapport à la structure de la protéine Ets-1 p51.

II-3/ Ets-1 p27

L'isoforme Ets-1 p27 a été tout d'abord détectée dans les cellules HIG-82 transfectées par un vecteur contenant l'ADNc du transcrite alternatif *ets-1Δ(III-VI)*, et ce à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'Ets-1 [20]. L'expression endogène d'Ets-1 p27 a été ensuite mise en évidence à l'aide d'un anticorps spécifique d'Ets-1 p27 dirigé contre le peptide codé par la jonction d'épissage alternatif, et ceci dans les lignées de cellules HIG-82, MDA-MB-231 issues d'un adénocarcinome mammaire humain, MG-63 issues d'un ostéosarcome humain et les cellules de leucémie aigue T humaine Jurkat [20].

L'isoforme Ets-1 p27 est donc issue du transcrite alternatif *ets-1Δ(III-VI)* qui ne possède pas les exons III à VI. Cette protéine contient le domaine ETS de liaison à l'ADN, ainsi que les domaines auto-inhibiteurs. Par contre, elle ne possède plus les acides aminés 28 à 244 comprenant le domaine transactivateur et le domaine Pointed (Figure 3) [20].

III/ Les domaines fonctionnels de la protéine Ets-1 : structure et fonction

III-1/ Domaine ETS

III-1-1/ Structure

La structure du domaine ETS de liaison à l'ADN a été résolue par radio-cristallographie et résonance magnétique nucléaire (RMN) en absence ou en présence d'ADN [32-34]. Celle-ci a pu être comparée aux structures obtenues pour d'autres membres de la famille Ets, tels que Fli-1 (« Friend leukemia integration-1 ») [35], Pu-1 (« purin rich-1 ») [36], Gabp- α (« GA binding protein- α ») [37], Sap-1 (« SRF accessory protein-1 ») [38], Elk-1 (« Ets-like-1 »), Pdef (« prostate-derived Ets factor ») [39] et Ese-2 (« epithelium specific Ets-2 ») [40]. L'ensemble de ces travaux a mis en lumière la très forte conservation structurale de ce domaine (Figure 4).

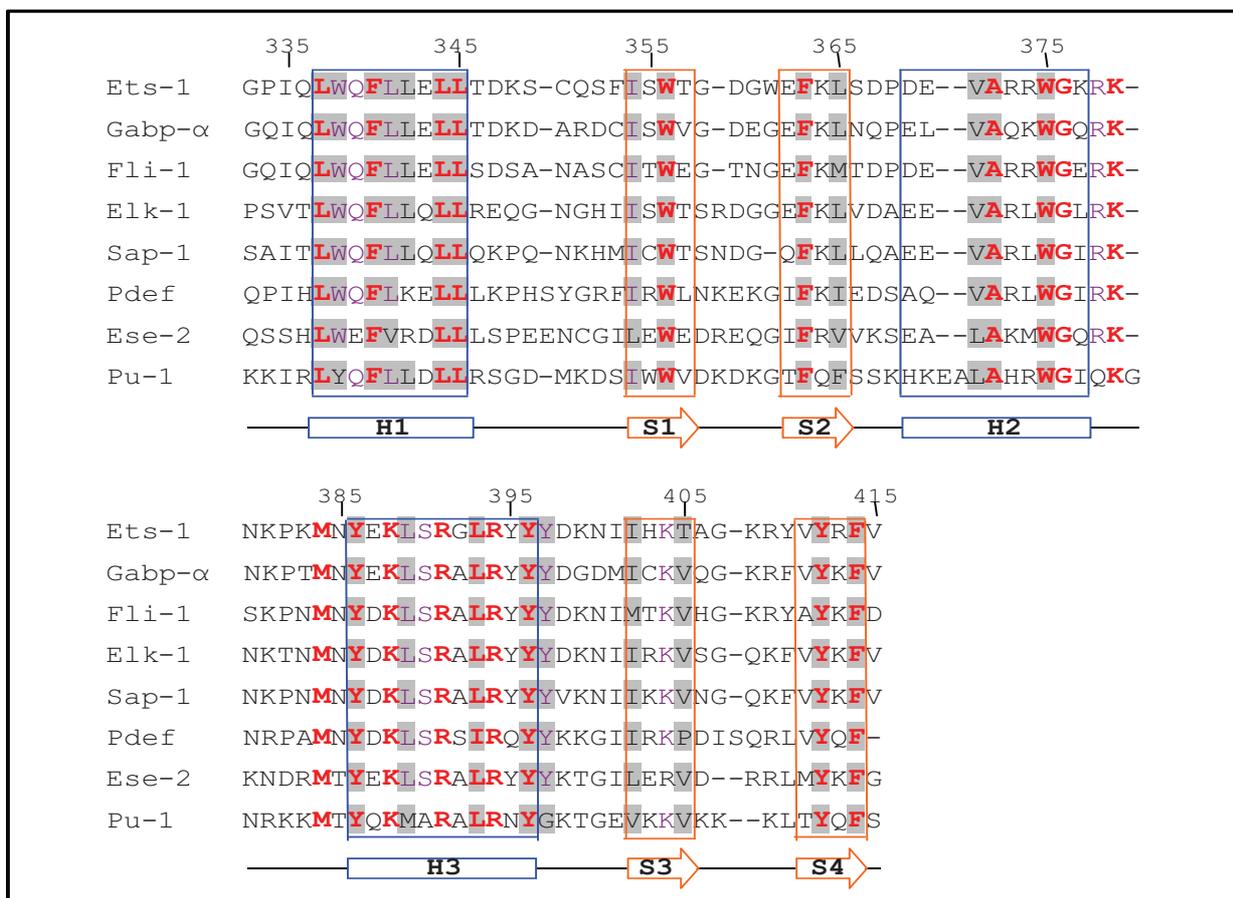


Figure 4 : Alignement des séquences des domaines ETS de structure connue.

La structure secondaire est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α (H1-H3) sont figurées par des rectangles bleus et les brins β (S1-S4) par des flèches orange. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras et en rouge. Ceux conservés à plus de 85% sont colorés en brun. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du domaine sont repérés par un fond gris [38]. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1.

Il apparaît, d'après ces études, que le domaine ETS est constitué de 3 hélices α (H1-H3) et de 4 brins β (S1-S4) qui s'organisent tridimensionnellement selon un motif structural de type hélice-tour-hélice ailé, désigné wHTH (« winged helix-turn-helix ») (Figures 4 et 5). Le motif HTH résulte de la disposition perpendiculaire des hélices H2 et H3 et de leur connexion par une boucle « turn » (ou tour) (Figure 5). Celui-ci est compacté contre un feuillet β anti-parallèle (formé par les 4 brins β , S1-S4) donnant naissance à un cœur hydrophobe. La dénomination « winged » (ou ailé) provient, quant à elle, de la boucle reliant les brins S3 et S4 qui a l'apparence d'une aile (Figure 5). De plus, la présence d'une poche regroupant les résidus hydrophobes au cœur du domaine se révèle indispensable pour stabiliser la structure globale [32].

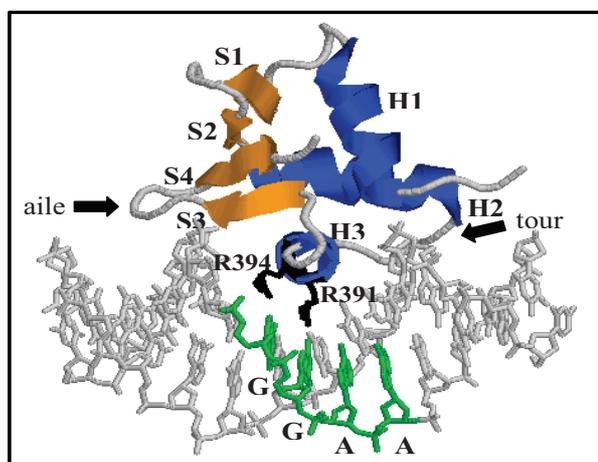
L'ensemble de ces caractéristiques structurales place les facteurs Ets dans la super-famille des protéines à domaine wHTH qui comprend de nombreuses protéines fixant l'ADN telles que : (1) l'activateur CAP (« catabolite gene activator protein ») et le répresseur BirA chez les procaryotes, (2) le répresseur Mu et la terminase gpNu1 chez les virus et (3) les facteurs de transcription HNF-3 γ (« hepathocyte nuclear factor-3 γ ») et E2F-4 (« E2 promoter binding factor-4 ») chez les eucaryotes [41].

III-1-2/ Fonction

De façon générale, le domaine ETS lie spécifiquement l'ADN au niveau d'une séquence possédant un cœur consensus 5'-GGAA/T-3' par l'intermédiaire de quatre zones de contacts. La plus importante implique l'hélice H3 qui s'insère dans le grand sillon de l'ADN et contacte directement les bases du cœur grâce à deux arginines (R391 et R394) strictement conservées au sein de la famille Ets (Figures 4 et 5) [12]. Ces interactions sont fondamentales pour la reconnaissance spécifique d'une séquence nucléotidique par les protéines Ets.

Figure 5: Structure tridimensionnelle du domaine ETS d'Ets-1 lié à sa séquence cible.

Les bases du cœur consensus apparaissent en vert. La chaîne latérale des arginines (R391 et R394) impliquées dans des interactions directes avec les bases de l'ADN est représentée en noir. D'après (PDB : 1K79).



Par ailleurs, trois autres régions du domaine ETS participent à des contacts avec le squelette phosphate de l'ADN de part et d'autre du cœur consensus, sur l'un ou l'autre des brins de la double hélice. Il s'agit de la boucle entre les hélices H2 et H3 (correspondant au « turn » du motif HTH), de celle entre les brins S3 ou S4 (qui forme l'aile du motif wHTH) et de résidus de la partie N-terminale de l'hélice H1 [12]. Certaines de ces interactions facilitent l'insertion de l'hélice H3 dans le grand sillon de l'ADN par un positionnement exact des résidus face aux bases qu'ils contactent.

Néanmoins, il existe des interactions protéine-ADN propres à Ets-1, engageant des résidus peu conservés, qui sont à la base de la spécificité de liaison à l'ADN. Ces mécanismes seront développés dans le Chapitre III §I-2.

III-2/ Domaine Pointed (PNT)

III-2-1/ Structure

Outre Ets-1, le domaine Pointed (PNT) est partagé par 10 membres de la famille Ets chez les vertébrés. Celui-ci correspond, en fait, à un domaine qui est abondamment représenté dans le règne animal depuis la levure jusqu'à l'homme, le domaine SAM (« sterile α motif »). Ce dernier est retrouvé chez de nombreuses protéines aux fonctions très diverses, telles que le récepteur à tyrosine kinase Eph (« ephrin »), la protéine d'assemblage Ste4p (« sterile 4p »), la protéine Smaug liant l'ARN, ou la DGK (« diacylglycérol kinase ») [42].

La structure du domaine PNT d'Ets-1 a été déterminée par RMN [43] et a pu être comparée avec celles obtenues pour Gabp- α , Tel « translocation ETS leukemia » [44] et Erg (« Ets-related gene ») [14]. La structure secondaire de ce domaine est composée de 4 ou 5 hélices α (H2-H5 ou H1-H5), selon la protéine Ets considérée (Figure 6). Le point commun de ces différentes structures est la présence d'un domaine compacté formé par les hélices H2 à H5 grâce à des interactions hydrophobes impliquant des résidus conservés (Figures 6 et 7) [14]. Dans le cas d'Ets-1, l'hélice H1 supplémentaire est exposée au solvant car elle n'interagit pas avec les autres hélices [43]. Ceci est en accord avec le caractère polaire de cette hélice H1.

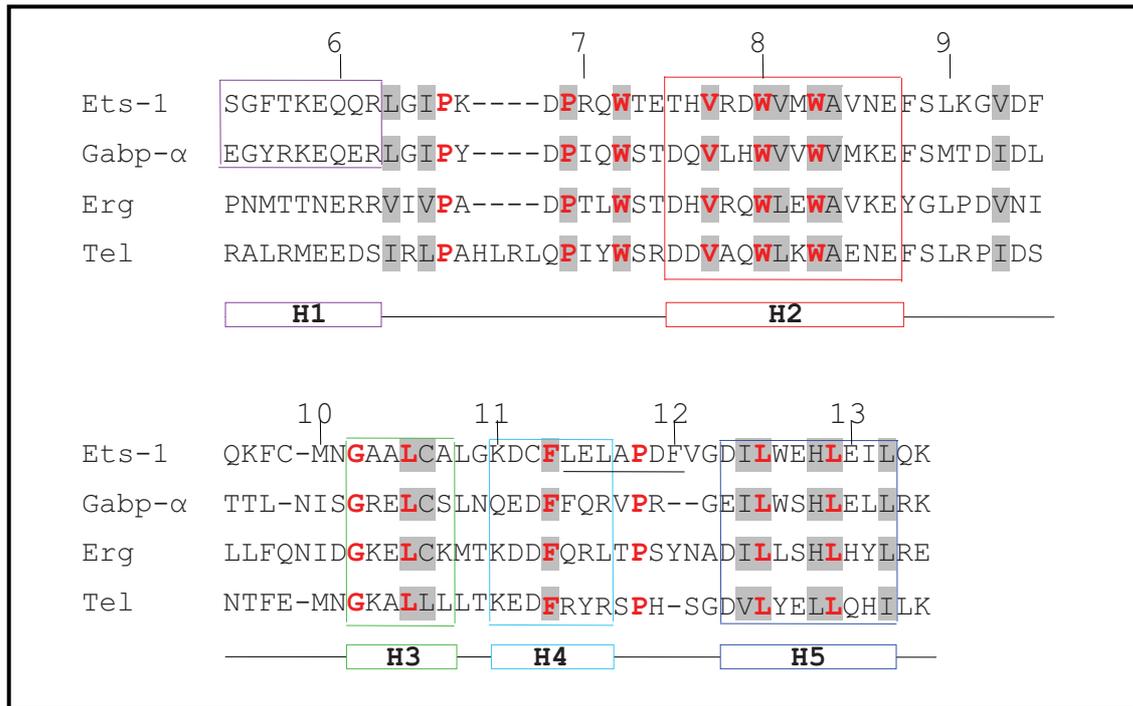


Figure 6 : Alignement des séquences des domaines PNT de structure connue.

La structure secondaire déterminée pour Ets-1 est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α (H1-H5) sont figurées par des rectangles. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras et colorés en rouge. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du domaine sont repérés par un fond gris. Les acides aminés impliqués dans l'interaction entre Ets-1 et Erk-2 sont soulignés dans la séquence [45]. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1.

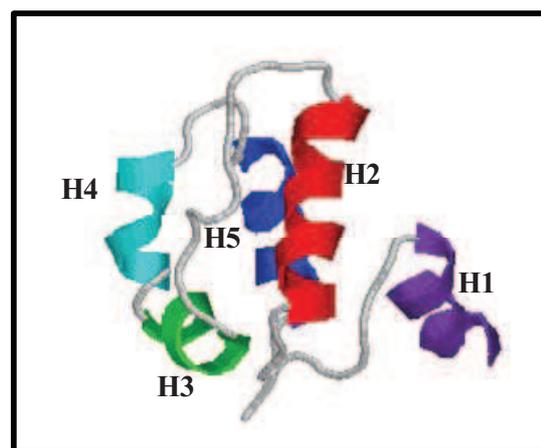


Figure 7 : Structure tridimensionnelle du domaine PNT d'Ets-1.
D'après [43] (PDB : 1BQV).

III-2-2/ Fonction

De façon générale, le domaine PNT est responsable du recrutement de divers facteurs par interactions : (1) avec un autre domaine PNT comme illustré par la capacité de Tel ou Erg à s'homodimériser *via* ce domaine [44, 46] ou (2) avec un domaine de nature différente permettant notamment le recrutement de facteurs essentiels à la régulation transcriptionnelle. En effet, une étude montre qu'Ets-1 peut former *via* son domaine PNT un complexe avec la MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), Erk-2 (« extracellular signal-regulated kinase-2 ») [45, 47].

De façon intéressante, l'interaction entre ces deux protéines est due à un motif protéique LXLXXXF (où L est la leucine, F la phénylalanine et X un acide aminé quelconque) présent dans le domaine PNT d'Ets-1 (Figure 6), correspondant à un site plateforme (ou « docking site ») des MAPKs Erk-1/-2. Bien que des données structurales ne soient disponibles que pour l'interaction d'Ets-1 avec la kinase Erk-2, Erk-1 est très probablement recrutée au niveau de ce site. L'importance de ce motif est illustré par le fait qu'il est retrouvé dans la séquence d'Ets-2, qui possède un domaine PNT capable d'interagir avec Erk-2, mais non dans celle de Gabp- α qui ne lie pas Erk-2 [45]. Les conséquences de cette interaction seront abordées au §IV-1 de ce Chapitre.

III-3/ Domaine transactivateur

Le domaine transactivateur d'Ets-1 occupe une position centrale au sein de sa séquence (Figure 3). Celui-ci a été défini comme un domaine indépendant de transactivation puisqu'il est capable d'induire la transcription d'un gène rapporteur lorsqu'il est fusionné au domaine de liaison à l'ADN d'un facteur hétérologue, en l'occurrence Gal-4 [48]. Ce domaine est caractérisé par un fort contenu en résidus acides (point isoélectrique proche de 4,4), mais aucune structure n'a encore pu être définie. La structure secondaire prédite par bio-informatique indique la présence potentielle de deux hélices α et de trois brins β [49]. Ces caractéristiques tendent à classer ce domaine dans la catégorie des domaines d'activation acides (« acidic activation domains » ou AAD) [50]. Néanmoins, ce domaine est unique car aucune similarité n'a pu être trouvée dans la séquence des membres de la famille Ets, même avec la séquence d'Ets-2, la protéine la plus proche d'Ets-1 (55% d'identité de séquence). Ce point est important pour la compréhension des mécanismes régissant la spécificité d'action d'Ets-1 vis-à-vis d'Ets-2.

En effet, l'existence de domaines transactivateurs propres à chaque protéine peut être un moyen de recruter des facteurs différents. Ainsi, il a pu être montré qu'Ets-1 interagit avec GHF-1 (« growth hormone factor-1 »)/Pit-1, un facteur de transcription à homéodomaine POU, *via* une région de 70 acides aminés incluant la partie C-terminale de son domaine transactivateur, alors qu'Ets-2 en est incapable [51, 52]. L'effet de cette interaction sur l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 sera développé dans le Chapitre VI §II-3-1-c.

III-4/ Domaines inhibiteurs

III-4-1/ Structure

La protéine Ets-1 possède deux domaines inhibiteurs situés de part et d'autre du domaine ETS entre les résidus 280 et 331 (domaine inhibiteur N-terminal), et les résidus 416 et 441 (domaine inhibiteur C-terminal) (Figure 3). Des travaux de RMN et de radiocristallographie [53, 54] montrent que chaque domaine inhibiteur possède deux hélices α : HI-1 et HI-2 pour le domaine N-terminal et H4 et H5 pour le domaine C-terminal (Figure 8A). Les hélices de chaque domaine inhibiteur interagissent les unes avec les autres ainsi qu'avec l'hélice H1 du domaine ETS pour former un module compacté, le module auto-inhibiteur (Figure 8B et 8C) [54]. Ce module est stabilisé par l'existence d'une large poche hydrophobe qui intègre des résidus des cinq hélices (Figure 8C). De plus, le caractère polaire des hélices HI-1, H4 et H5 renforce la formation de ce module grâce à des interactions électrostatiques. L'impact de cette structure sur la fixation d'Ets-1 à l'ADN sera abordé dans le Chapitre III §II-2.

De façon intéressante, la séquence des domaines inhibiteurs est conservée chez Ets-2, ainsi que les propriétés d'hydrophobicité et de charges des résidus cruciaux. Ceci suggère fortement l'existence d'un module auto-inhibiteur de même structure au niveau d'Ets-2 (Figure 8A) [32, 55].

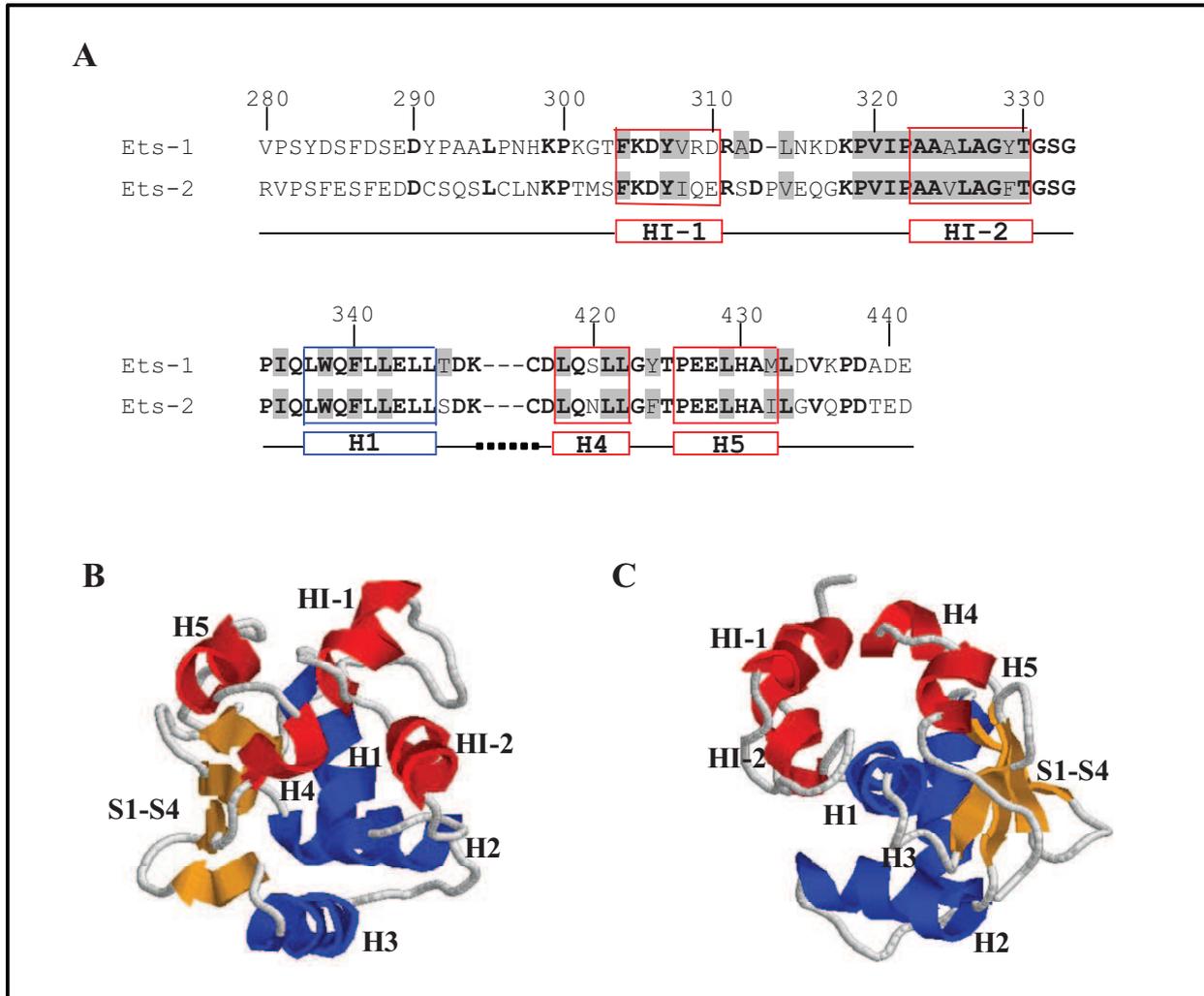


Figure 8 : Structure du module auto-inhibiteur d'Ets-1.

A : Alignement des séquences d'Ets-1 et d'Ets-2 au niveau des domaines inhibiteurs et de l'hélice H1 du domaine ETS. La structure secondaire déterminée pour Ets-1 est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α des domaines inhibiteurs (H1-H5) sont figurées par des rectangles rouges et l'hélice H1 du domaine ETS par un rectangle bleu. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du module auto-inhibiteur sont repérés par un fond gris. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1. **B**, **C** : Structure tridimensionnelle du module auto-inhibiteur. Les éléments structuraux du domaine ETS sont en bleu (hélice α) et jaune (brins β), ceux des domaines inhibiteurs en rouge. La structure est représentée en vue de face (**B**) ou de haut (**C**). D'après [54] (PDB : 1R36).

III-4-2/ Fonction

Les premières études avaient mis en évidence que la délétion de l'une ou l'autre des régions qui encadrent le domaine ETS augmente fortement la fixation d'Ets-1 à l'ADN [56, 57]. Des travaux plus récents montrent que les deux domaines inhibiteurs agissent de concert pour réduire l'affinité de liaison à l'ADN d'Ets-1 [58]. De façon intéressante, la conservation des deux domaines inhibiteurs dans la séquence d'Ets-2 lui confère des propriétés d'inhibition de la liaison à l'ADN similaires à celles d'Ets-1. Ce phénomène de régulation intra-protéique de la fixation à l'ADN, appelé auto-inhibition de liaison à l'ADN, est présent chez d'autres

facteurs de transcription [59]. Les mécanismes à la base de l'auto-inhibition seront explicités dans le Chapitre III §II-2.

IV/ Sites de modifications post-traductionnelles

La protéine Ets-1 p51 subit plusieurs modifications post-traductionnelles, au niveau d'un certain nombre d'acides aminés, telles que : (1) la phosphorylation (T38, S251, S270, S273, S282, S285), (2) la sumoylation (K15, K227), (3) l'ubiquitination (K48) ou (4) l'acétylation (Figure 9).

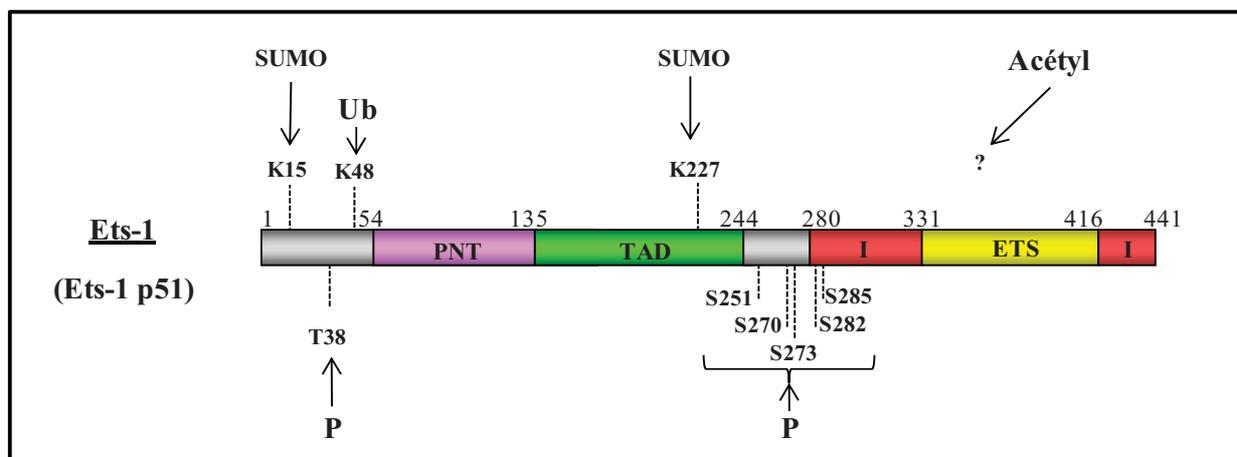


Figure 9 : Les sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Ets-1 p51.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine de transactivation (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge, le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune. Les résidus indiqués peuvent être modifiés par : (1) phosphorylation (P) sur la thréonine (T) en position 38 et sur les sérines (S) en position 251, 270, 273, 282 et 285, (2) sumoylation (SUMO) sur les lysines (K) en position 15 et 227, (3) ubiquitination (Ub) sur la lysine (K) en position 48 ou (4) acétylation (Acétyl) sur des résidus non identifiés.

IV-1/ Phosphorylation

L'une des premières modifications post-traductionnelles rapportée pour Ets-1 p51 est la phosphorylation d'un résidu thréonine localisé en position N-terminale du domaine PNT et plus précisément en position 38 (T38) (Figure 9). Ce résidu appartient au motif de phosphorylation PLLTP (où P est la proline et L la leucine), retrouvé dans la séquence d'Ets-2 [44]. La phosphorylation de ce résidu est catalysée par les MAPKs Erk-1/-2. Dans le cas d'Erk-2 et donc très probablement dans celui d'Erk-1, cette réaction nécessite l'interaction de la MAPK avec Ets-1 au niveau du site plate-forme présent dans le domaine PNT (voir le §III-2-2 de ce Chapitre) [45, 47, 60]. Cette modification post-traductionnelle stimule les propriétés transactivatrices d'Ets-1, en favorisant le recrutement des co-activateurs, CBP (« CREB

(« cAMP response element binding »)-binding protein ») et p300 (« E1A binding protein p300 ») (voir Chapitre IV §II-2-1-a).

Un autre type de phosphorylation d'Ets-1 p51 a lieu au niveau d'une région riche en sérines, située en amont du domaine inhibiteur N-terminal en position 251, 270, 273, 282 et 285 (S251, S270, S273, S282 et S285) (Figure 9). Cette réaction est catalysée en réponse au calcium par la CaMKII (« calcium/calmodulin-dependent protein kinase II ») dans la majorité des cas [61, 62], ou par la MLCK (« myosin light-chain kinase ») dans les astrocytes après stimulation par un analogue de l'acétylcholine [31]. Dans ce modèle cellulaire, la CaMKII étant absente, la MLCK joue probablement un rôle redondant. La phosphorylation en réponse au calcium réduit la fixation d'Ets-1 à l'ADN *in vitro* par le mécanisme décrit dans le Chapitre III §III-1 [55]. De plus, une étude menée sur les cellules de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, montre qu'Ets-1 peut être phosphorylée au niveau de ces résidus sérines par la kinase PKC- α (« protein kinase C- α ») de façon indépendante des voies de signalisation du calcium et des MAPKs Erk-1/-2. Néanmoins et de façon antagoniste à ce qui est majoritairement décrit dans la littérature quant à l'effet de la phosphorylation de ces résidus, la PKC- α régule positivement l'activité d'Ets-1 *via* cette modification post-traductionnelle [30, 63].

Il apparaît que la phosphorylation de la thréonine 38 et des résidus sérines peut avoir lieu simultanément et de façon indépendante au cours de l'activation des cellules T, malgré des effets opposés (stimulateur et inhibiteur) sur l'activité d'Ets-1 [64].

IV-2/ Sumoylation et ubiquitination

IV-2-1/ Mécanisme général

La sumoylation et l'ubiquitination consistent en la liaison covalente et réversible de petites protéines, respectivement SUMO (« small ubiquitin-like modifier ») (11 kDa) et ubiquitine (9 kDa), au niveau de résidus lysines (K) de protéines cibles. Dans le cas de la sumoylation, il existe trois protéines SUMO principales dénommées SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3 ainsi qu'une protéine SUMO-4 exprimée spécifiquement dans certains tissus [65]. Ces protéines se fixent au niveau de résidus lysines, contenus dans un motif consensus de type ψ -K-x-E/D (ψ étant un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé quelconque), de leurs protéines cibles [66, 67].

Les voies enzymatiques conduisant à la sumoylation et à l'ubiquitination sont similaires bien que l'effet sur la protéine cible soit différent [68-70]. La cascade enzymatique impliquée

dans la liaison de résidus SUMO ou ubiquitine sur une protéine cible est constituée de plusieurs étapes : (1) la fixation du résidu activé en présence d'ATP sur l'enzyme E1 d'activation, (2) le transfert du résidu de l'enzyme E1 vers une enzyme E2 de conjugaison, (3) le transfert du résidu de l'enzyme E2 vers le substrat (la protéine cible) grâce à une enzyme E3 de ligation. Celle-ci sert de plateforme d'interaction qui met en contact les protagonistes de la réaction [71]. L'enzyme E1 d'activation est généralement Aos1/Uba-2 (« ubiquitin-activating enzyme-2 ») et l'enzyme E2 de conjugaison, Ubc-9 (« ubiquitin conjugating enzyme-9 »). La nature de l'enzyme E3 de ligation dépend du substrat. Elle peut être une protéine de la famille PIAS (« protein inhibitor of activated STAT »), la RanBP2 (« Ran binding protein 2 ») ou la protéine Pc2 (« polycomb 2 protein »).

IV-2-2/ Sumoylation et ubiquitination d'Ets-1 p51

Concernant la sumoylation, des travaux récents montrent que la protéine Ets-1 est modifiée par SUMO-1 et SUMO-2 *in vitro* et dans des cellules après surexpression de ces protéines [72, 73]. Plusieurs sites putatifs de sumoylation ont été identifiés dans la séquence d'Ets-1 [74], mais uniquement deux ont été validés. Leurs lysines acceptrices sont situées en position N-terminale du domaine PNT au niveau du 15^{ème} acide aminé d'Ets-1 (K15) et dans le domaine transactivateur TAD en position 227 (K227) (Figure 9). La liaison de SUMO-1 au niveau de la lysine 15 ne modifie en rien la structure d'Ets-1 [74] alors que la sumoylation de la lysine 227 altère sa conformation, suggérant des effets différents sur l'activité d'Ets-1 [73]. Concernant la cascade enzymatique aboutissant à la sumoylation d'Ets-1, il est montré que (Figure 10) :

- (1) Ubc-9 est bien l'enzyme E2 de conjugaison [72] et qu'elle interagit *via* son site de reconnaissance des substrats avec les domaines PNT et ETS d'Ets-1 [74, 75],
- (2) PIASy constitue l'enzyme E3 d'activation qui recrute Ets-1 par l'intermédiaire de son domaine TAD [76],
- (3) Ets-1 est désomoylée par la SUMO-protéase SENP-1 (« SUMO/sentrin-specific peptidase-1 »), illustrant le caractère réversible de ce type de modification post-traductionnelle [72, 76]. La sumoylation d'Ets-1 induit une répression de son activité transcriptionnelle comme décrit dans le chapitre IV §II-2-2-b [77].

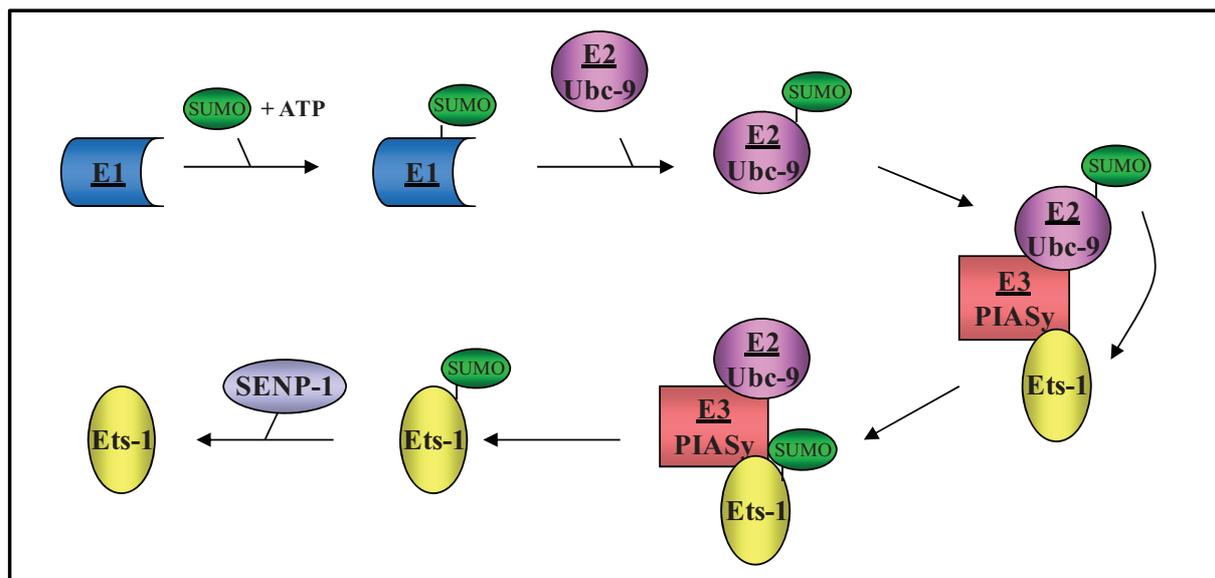


Figure 10 : Modèle de sumoylation d'Ets-1.

Les enzymes de sumoylation sont représentées en bleu pour l'enzyme E1 d'activation, en violet pour l'enzyme E2 de conjugaison (identifiée comme étant Ubc-9 pour Ets-1) et en rouge pour l'enzyme E3 de ligation (identifiée comme étant PIASy pour Ets-1). La petite protéine SUMO est représentée en vert, la protéine Ets-1 en jaune et la désomoylase SENP-1 en gris.

Concernant l'ubiquitination d'Ets-1, elle s'effectue sur des résidus lysines différents de ceux qui sont sumoylés, indiquant qu'il n'existe pas de compétition entre ces deux types de modifications. D'ailleurs, l'ubiquitination d'Ets-1 n'est pas abolie suite à l'inactivation par mutation des sites de sumoylation [72]. La lysine acceptrice de résidus ubiquitines est située en position N-terminale du domaine PNT au niveau du 48^{ème} acide aminé d'Ets-1 (K48) (Figure 9). Les enzymes responsables de cette modification d'Ets-1 ne sont pas identifiées. Néanmoins, il est démontré que la protéine Ubc-9 n'est pas impliquée dans la cascade réactionnelle [75]. L'ubiquitination d'Ets-1 induit sa dégradation *via* le protéasome 26S [72].

IV-3/ Acétylation

L'acétylation consiste en l'addition de groupements acétyls $\left[\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\right]$ sur les résidus lysines d'une protéine cible par des acétyl-transférases. Il en résulte la neutralisation de la charge positive de la lysine et la modification de la taille de sa chaîne latérale. Cette réaction est réversible sous l'effet de déacétylases qui induisent le clivage des groupements acétyls.

L'acétylation d'Ets-1 est détectée au niveau basal dans des fibroblastes du derme, mais elle est surtout stimulée en réponse au TGF- β (« transforming growth factor- β ») dans ce modèle cellulaire. Les résidus lysines d'Ets-1 affectés ainsi que l'acétyl-transférase impliquée ne sont pas encore identifiés. Néanmoins, Ets-1 est connue pour interagir *via* une région incluant les domaines PNT et TAD avec les co-activateurs CBP et p300 [44]. Ces derniers

possédant une activité acétyl-transférase envers les histones et certains facteurs de transcription [78], il est tout à fait envisageable qu'ils soient responsables de l'acétylation d'Ets-1, surtout que le complexe formé par Ets-1 avec CBP et p300 est dissocié suite à l'acétylation d'Ets-1. De plus, une étude montre que cette modification post-traductionnelle est compatible avec la phosphorylation d'Ets-1 aussi bien au niveau de la thréonine 38 que des résidus sérines contenus dans le domaine codé par l'exon VII [79].

Au travers de l'ensemble des données présentées dans ce Chapitre, il apparaît clairement qu'Ets-1 partage des similarités de structure et de séquence avec d'autres protéines Ets, Ets-2 étant le facteur ayant le plus de points communs avec Ets-1. Ainsi, la question sous-jacente est : quels sont les mécanismes à la base de la spécificité d'action d'Ets-1 quant à la discrimination de ses promoteurs cibles par rapport aux autres membres de la famille Ets ? De plus, la présence de la protéine Ets-1 sous trois isoformes p51, p42 et p27, ayant des structures différentes, laisse envisager qu'Ets-1 peut réguler ses propriétés de liaison à l'ADN par l'expression des variants d'épissage. Quelles sont les propriétés de liaison à l'ADN des différentes isoformes d'Ets-1 ? Ces questions seront abordées dans le Chapitre suivant.

La présence de sites variés de modifications post-traductionnelles suggère qu'Ets-1 peut être régulée en aval de diverses voies de signalisation au niveau de ces sites. Quelles sont ces voies de signalisation ? Et quels sont leurs effets sur la régulation de l'activité d'Ets-1 au travers de ses modifications post-traductionnelles ? De plus, l'expression de différents variants d'épissage d'Ets-1 peut également avoir des effets sur la régulation de ses fonctions. Quelles sont ces effets ? Et comment peuvent-ils influencer le devenir de la cellule ? Ces questions seront traitées dans le Chapitre IV portant sur la régulation d'Ets-1.

CHAPITRE III : Spécificité de liaison à l'ADN d'Ets-1

Malgré la forte conservation du domaine de liaison à l'ADN (domaine ETS) au sein de la famille Ets, la protéine Ets-1 est capable de réguler la transcription de son propre ensemble de gènes cibles. Les promoteurs de ces gènes contiennent des EBS, séquences de liaison à l'ADN de la famille Ets, qu'Ets-1 reconnaît spécifiquement grâce à : (1) des contacts moléculaires entre son domaine ETS et la séquence cible, (2) son auto-inhibition de liaison à l'ADN et, (3) l'interaction avec ses partenaires protéiques qui influence profondément les deux premiers niveaux de spécificité. Ces propriétés combinées à la régulation spatio-temporelle de son expression font d'Ets-1 un facteur de transcription spécifique.

I/ Site consensus de liaison à l'ADN : identification et reconnaissance

I-1/ Site consensus de liaison artificiel et naturel

Le site consensus de liaison à l'ADN d'Ets-1 a, tout d'abord, été caractérisé artificiellement par des expériences *in vitro* de sélection et d'amplification de sites de fixation (technique dite de « SAAB » pour « selected and amplified binding site ») [80]. Une séquence riche en purines a été identifiée : 5'-N(A/g)C(C/a)GGA(A/T)(G/a)(T/C)N-3' (N correspondant à n'importe quelle base). Celle-ci est reconnue par de nombreux autres facteurs Ets, renforçant la question de la spécificité d'action au sein de cette famille (Tableau 1) [81-84]. Néanmoins, quelques différences subtiles permettent de discriminer les consensus de liaison des membres de la famille Ets.

D'une part, la base du cœur située en +4 de l'EBS permet de distinguer deux groupes de consensus de fixation, ceux de type GGAA contenant une adénine stricte à cette position (Ets-2, Fli-1, Elk-1, Elf-1 « E74 like factor-1 », Tel, Pu-1) et ceux de type GGAA/T possédant une adénine ou une thymine (Ets-1, Er-71 « ETS related-71 », Gabp- α , Er-81 « ETS related-81 », Sap-1, Ese-2) (Tableau 1). Dans le cas d'Ets-1, une étude montre que l'incapacité à privilégier une adénine à cette position provient de la lysine 388 de l'hélice H3 du domaine ETS (Figure 4). En effet, lorsque ce résidu est muté en thréonine, comme dans l'hélice H3 d'Elf-1, Ets-1 ne reconnaît plus que des séquences contenant un cœur 5'-GGAA-3' [85].

D'autre part, les bases -3, -2 et -1 de l'EBS peuvent être de nature variée, ce qui est particulièrement marqué dans les consensus de Ese-2, Tel et Pu-1. Ceci peut s'expliquer par la forte divergence de séquence entre leur domaine ETS respectif et celui des autres membres de

la famille. En effet, les domaines ETS de ces trois facteurs possèdent moins de 43% d'identité de séquence avec celui d'Ets-1. Alors que celui d'Ets-1 présente 97% d'homologie avec celui d'Ets-2 et 69% avec celui de Fli-1. Néanmoins, ces différences de séquence apparaissent tout de même trop faibles pour expliquer la spécificité de liaison d'Ets-1, en particulier lorsque l'on compare son consensus de fixation avec ceux de Fli-1, Elk-1 ou Sap-1 (Tableau 1).

Groupe	Protéine	Consensus sélectionné										
		A/g	C	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/C	N	
ETS	Ets-1	A/g	C	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/C	N	
	Ets-2	A	C	C	G	G	A	A	G	T	G	
ER71	Er-71	G/C	C/G	C/a	G	G	A	T/A	G/a	T/c	C	
GABP	Gabp- α	G/a	C/g	C/a	G	G	A	A/t	G/a	T/c	x	
PEA3	Er-81	G/a	G/c	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/c	x	
ERG	Fli-1	A	C	C	G	G	A	A	G/a	T/c	A/G	
ELK	Elk-1	A	C	C	G	G	A	A	G	T	G/A	
	Sap-1	A	C	C	G	G	A	A/t	G/a	T/c	x	
ELF	Elf-1	C/a	C	C	G	G	A	A	G	T	N	
ESE	Ese-2	T/A	A/c	A/c	G	G	A	A/t	G/a	T	A/t	
TEL	Tel	T	G/T	A/C	G	G	A	A	G	T	x	
SPI	Pu-1	A/t	G/c	A/cg	G	G	A	A	G/c	T	A/G	
		-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	

Tableau 1 : Consensus de liaison artificiel déterminé par sélection *in vitro* pour différentes protéines Ets.

Le cœur invariant 5'-GGAA/T-3' est encadré en rouge. La position de la première guanine de ce cœur est désignée par +1, les bases en 5' sont numérotées -1, -2, -3; les bases en aval prennent les valeurs +2 à +7. La lettre N correspond à n'importe quelle base, la lettre x indique que la base n'a pas été identifiée. Les bases en lettres majuscules sont des résidus retrouvés fréquemment au sein des sites (dans plus de 45% des cas), alors que celles en lettres minuscules sont des résidus peu représentés (moins de 45%). D'après [81-84].

Il s'avère en fait que la véritable source de spécificité provient de sites éloignés du consensus de liaison. En effet, une étude récente utilisant des puces à ADN démontre qu'il existe une fixation redondante de différents facteurs Ets au niveau de sites consensus conservés généralement situés au niveau proximal des promoteurs. Alors qu'au contraire, une fixation spécifique est décelable au niveau des sites éloignés du consensus qui sont localisés plutôt dans la partie distale des promoteurs [86].

Cette spécificité est due en partie à une plus grande variation d'affinité de liaison entre les différentes protéines Ets au niveau des sites éloignés dits de « basse affinité » par rapport aux sites proches du consensus dits de « haute affinité », comme le démontre l'étude des

affinités de fixation d'Ets-1, Ese-2, Ese-1, Pdef et Pu-1 [81] ou de Fli-1, Sap-1 et Pu-1 [84] sur différents sites plus ou moins éloignés du consensus.

D'ailleurs dans le contexte de l'« enhancer » du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines μ , Ets-1 est capable de sélectionner la séquence dite μ A plutôt que celle dite μ B reconnue préférentiellement par Pu-1, malgré leur éloignement du consensus [87]. Ceci illustre l'intérêt des sites de « basse affinité » dans la spécificité d'action des protéines Ets dans un contexte naturel. Ce concept est également vérifié par la divergence de séquences entre le consensus de liaison identifié *in vitro* (contexte artificiel) et celui retrouvé au niveau des promoteurs cibles (contexte naturel) dans le cas des protéines Pu-1 et Elf-1 [84, 88].

Le consensus de liaison naturel d'Ets-1 a été déterminé par l'alignement des sites reconnus au sein de ses promoteurs cibles. Il en ressort des différences de séquences par rapport au consensus artificiel, dont la plus notable concerne la base en position -1 (Tableau 2). En effet, une adénine est préférentiellement détectable à cette position dans le consensus naturel au lieu d'une cytosine dans le consensus artificiel. La présence d'une adénine à cette position est connue pour diminuer l'affinité de liaison à l'ADN d'Ets-1 [22, 26, 80].

Ceci illustre bien l'importance des sites de « basse affinité » dans le recrutement d'Ets-1 au niveau de ses promoteurs cibles dans un contexte naturel. Néanmoins, la faible affinité de liaison à l'ADN d'Ets-1 est contrecarrée par une fixation combinatoire avec ses partenaires protéiques au niveau de sites adjacents comme explicité dans le Chapitre III §III-2.

	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
A	50	15	89	0	0	135	125	33	24	20
T	25	15	3	0	0	0	11	2	50	20
G	36	38	14	135	135	0	1	85	23	58
C	23	67	29	0	0	0	2	15	38	37
	A/g	C/g	A/c	G	G	A	A	G/a	T/c	G/c

Tableau 2 : Consensus de liaison naturel d'Ets-1, déterminé par l'alignement des sites présents dans ses promoteurs cibles.

Les séquences de la majorité des sites fonctionnels fixés par Ets-1 au niveau de ses promoteurs cibles ont été alignées et la répartition des bases aux différentes positions a été reportée afin de déterminer un consensus de liaison. Le cœur invariant 5'-GGAA-3' est encadré en rouge. La position de la première guanine du cœur est désignée +1, les bases en 5' sont numérotées -1, -2, -3 ; les bases en aval prennent les valeurs +2 à +7. Les bases en lettres majuscules sont des résidus retrouvés fréquemment au sein des sites (plus de 45% des cas), alors que celles en lettres minuscules sont peu représentées (moins de 45%). D'après [80].

I-2/ Mécanismes moléculaires de reconnaissance du site consensus

La reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN par le domaine ETS est généralement dirigée par un réseau d'interactions moléculaires très précis. Les études structurales par radio-cristallographie et RMN montrent que les acides aminés du domaine ETS établissent deux types de contacts au niveau de la séquence d'ADN [33, 36-40, 89] :

(1) ceux avec les bases du cœur consensus (Figure 11A). En effet, les résidus conservés de l'hélice H3 interagissent directement avec les bases du cœur consensus 5'-G₊₁G₊₂A₊₃A₊₄-3' au niveau du grand sillon de l'ADN. Ce sont les arginines 391 et 394 (R391 et R394) qui contactent les deux guanines du cœur (Figure 5 et 11A) [38].

Pour certaines protéines Ets, des résidus supplémentaires participent à la reconnaissance directe des bases. Pour Ets-1, la tyrosine 395 (Y395) et la lysine 388 (K388) forment des liaisons avec les bases en position +3, +4 et +5 (correspondant aux positions 8, 9 et 10 de la Figure 11A) sur l'un ou l'autre des brins. Ces interactions entre acides aminés et bases sont responsables du mécanisme de lecture directe (« direct readout ») de la séquence d'ADN par le domaine ETS.

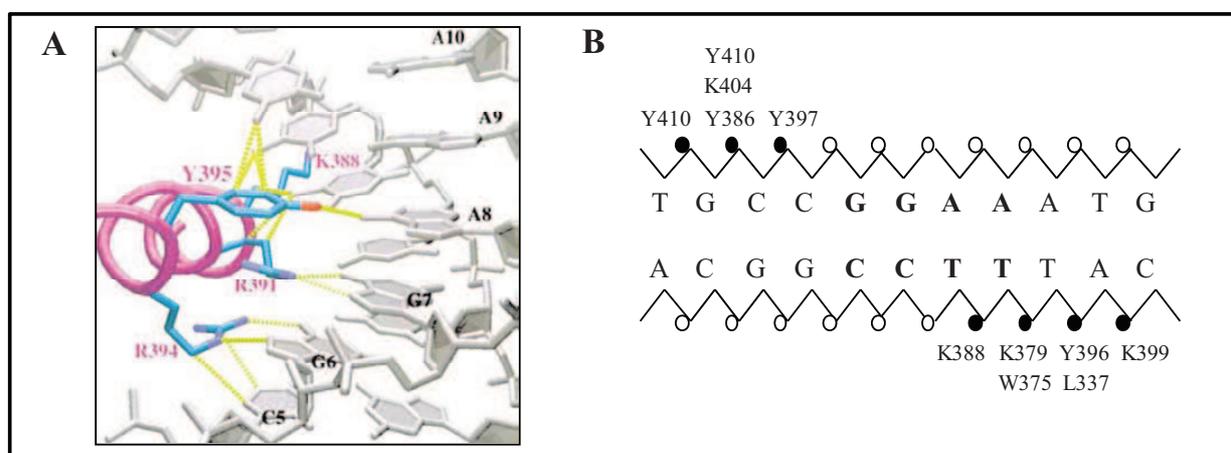


Figure 11 : Contacts moléculaires entre le domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN.

A : Contacts directs entre l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN. La chaîne latérale des résidus impliqués dans des interactions directes avec les bases a été représentée et les contacts ont été figurés en jaune. Les bases du cœur 5'-G₊₁G₊₂A₊₃A₊₄-3' sont numérotées G6, G7, A8, A9. **B :** Contacts entre les résidus du domaine ETS d'Ets-1 et le squelette phosphate de l'ADN. Les phosphates contactés sont figurés par un rond noir. Pour les acides aminés interagissant avec les phosphates, leur position au sein de la séquence d'Ets-1 a été indiquée. D'après [33] (PDB : 1K79).

(2) ceux avec le squelette phosphate de l'ADN (Figure 11B). Ils sont établis entre des résidus plus ou moins conservés du domaine ETS et le squelette phosphate de l'ADN, de part et d'autre du cœur au niveau du petit sillon. Les résidus impliqués appartiennent : (1) à

l'hélice H3, (2) à la boucle entre les hélices H2 et H3, (3) à la boucle entre les brins S3 et S4 et (4) à la partie N-terminale de l'hélice H1.

Selon la protéine Ets considérée, le nombre de résidus engagés et la position des phosphates contactés sont variables, rendant compte d'une certaine spécificité de liaison [84]. En ce qui concerne Ets-1, onze acides aminés participent à des interactions avec sept phosphates particuliers du squelette (Figure 11B) [33]. Ce deuxième type de contacts correspond à un mécanisme de lecture indirecte (« indirect readout ») de l'ADN, qui privilégie la reconnaissance de la structure intrinsèque du site de liaison à celle de l'enchaînement des nucléotides [90].

Ainsi, le mécanisme de lecture directe de l'ADN permet au domaine ETS de discriminer un EBS d'un site de fixation pour un autre facteur grâce à des interactions avec les bases du motif invariant 5'-GGAA/T-3'. Quant à la spécificité de liaison au sein de la famille Ets, celle-ci est fournie en partie par le mécanisme de lecture indirecte qui autorise de nombreux motifs de contacts entre le domaine ETS des différents membres et le squelette phosphate. Etant donné que ces interactions impliquent les nucléotides flanquant le cœur, ceci permettrait d'expliquer leur variation au sein des consensus de liaison des protéines Ets (Tableau 1). En conclusion, l'action combinée de ces deux mécanismes de reconnaissance de l'ADN fournit les bases de la spécificité de liaison d'Ets-1.

II/ Auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51

II-1/ Définition de l'auto-inhibition

L'auto-inhibition est un mécanisme de régulation négative de l'activité d'une protéine [53]. De façon générale, il peut s'agir du masquage direct d'un site actif ou d'une surface d'interaction d'une protéine mais aussi, de façon plus indirecte, du maintien d'une conformation non-fonctionnelle d'un domaine cible.

Une protéine "auto-inhibée" peut être considérée comme dans un état latent où la conformation est dite "fermée". En réponse à des signaux particuliers, l'auto-inhibition est levée suite à un changement conformationnel de la protéine qui peut être engendré par une interaction protéine-protéine, une modification post-traductionnelle ou un clivage protéolytique. La protéine tend alors vers une conformation dite "ouverte" qui correspond à un état actif. A l'opposé, l'auto-inhibition peut très bien être renforcée par des interactions protéine-protéine ou par des modifications post-traductionnelles de façon à stabiliser l'état « fermé ». En dehors de l'activation par protéolyse qui est définitive, l'auto-inhibition doit

être perçue comme un mécanisme dynamique permettant le passage réversible et rapide de l'état actif vers l'état latent d'une protéine, et inversement, par le biais de modifications conformationnelles (Figure 12).

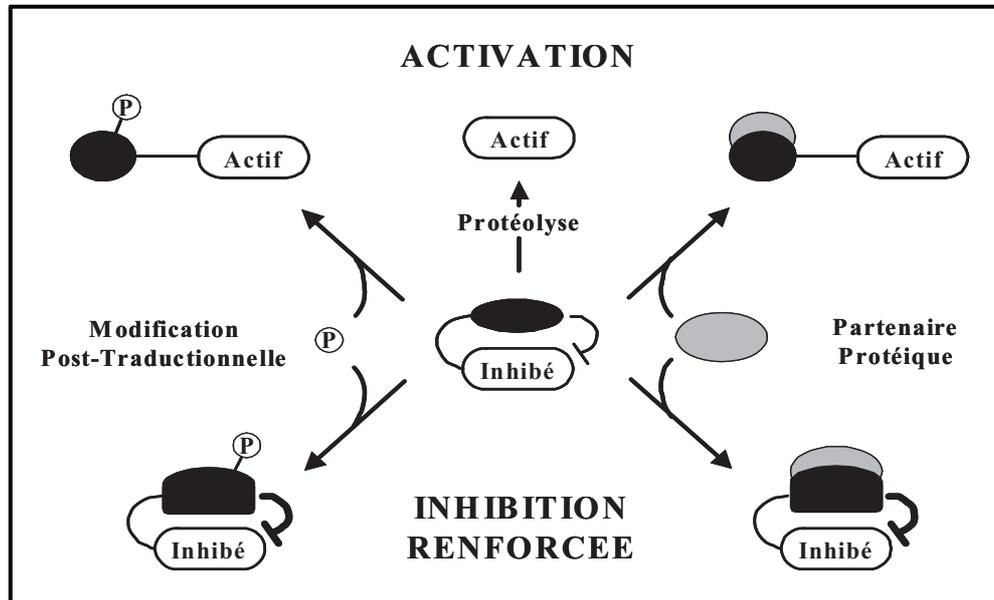


Figure 12 : L'auto-inhibition et ses mécanismes de régulation.

Le domaine protéique (en blanc) au centre est auto-inhibé par un contact intramoléculaire (domaine noir). Le clivage du domaine inhibiteur (en haut au centre) ou sa déstabilisation par l'intermédiaire d'un contact avec un partenaire protéique (en haut à droite) ou par une modification post-traductionnelle (en haut à gauche) peuvent restaurer l'activité du domaine protéique d'intérêt. Au contraire, la stabilisation du domaine inhibiteur (en bas) renforce l'auto-inhibition.

L'auto-inhibition de la liaison à l'ADN est retrouvée chez divers facteurs de transcription eucaryotes et procaryotes, tels que p53, TBP (« TATA box binding protein »), Hoxb-1 (« homeobxb-1 ») et l'ARN polymérase σ 70 [59, 82]. Au sein de la famille Ets, ce mécanisme affecte les protéines des groupes ETS, PEA3 (« polymavirus enhanacer A binding protein 3 »), ELK et GABP [82].

II-2/ Mode d'action du module auto-inhibiteur d'Ets-1 p51

Le module auto-inhibiteur d'Ets-1, comme décrit dans le Chapitre II §III-4, est composé des hélices α des deux domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4 et H5) et de l'hélice α H1 du domaine ETS (Figure 13A). La détermination de la structure de ce module n'a eu lieu que bien après la mise en évidence et la compréhension biochimique du mécanisme d'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.

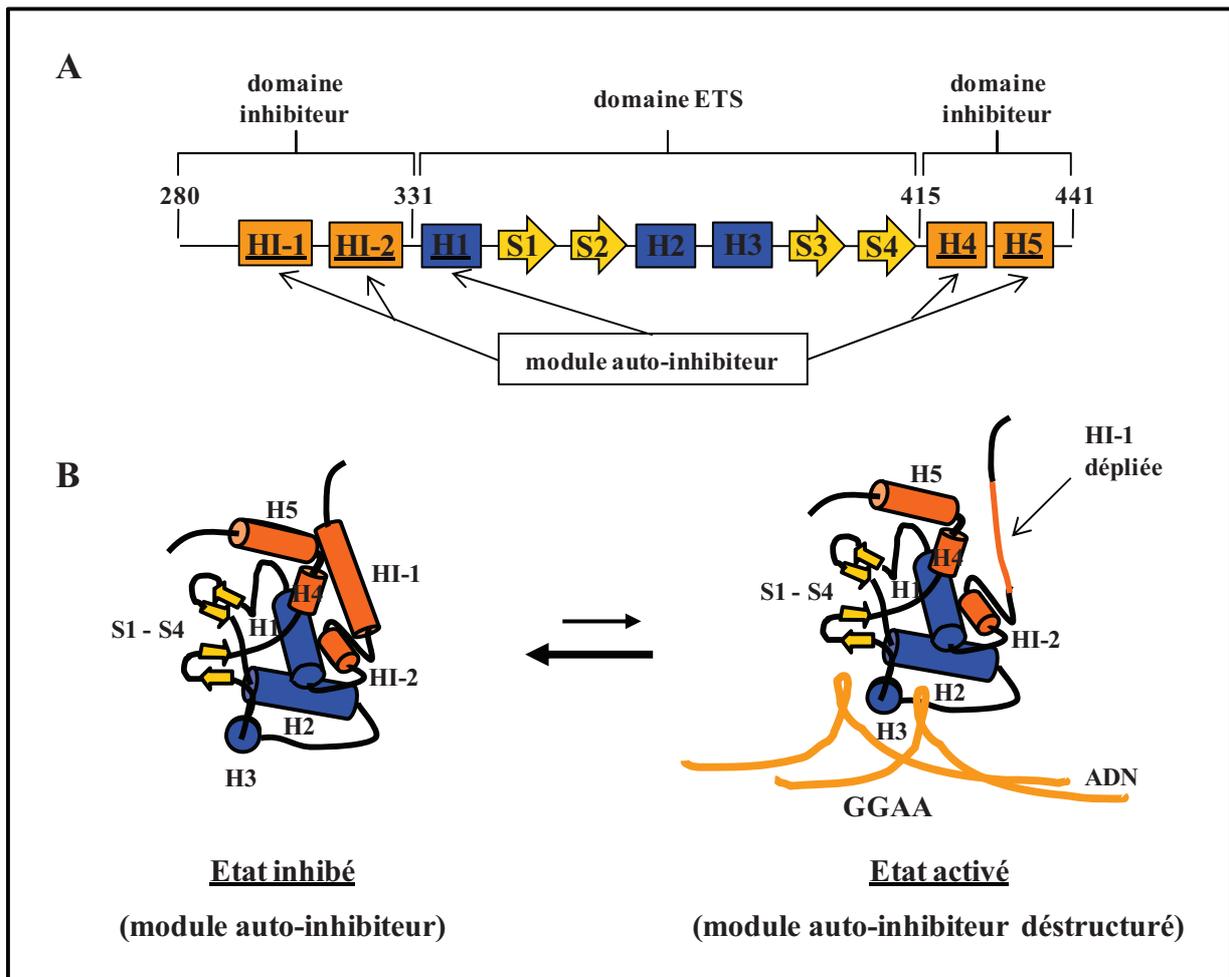


Figure 13 : Modèle structural de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.

A : Structure secondaire des domaines inhibiteurs et du domaine ETS d'Ets-1. Les rectangles correspondent aux hélices α et les flèches aux brins β . Le nom des hélices α constituant le module auto-inhibiteur est souligné. **B** : Modèle de levée de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1. En solution, les hélices des domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4, H5) sont compactées sur le domaine ETS par interaction avec l'hélice H1 formant un module auto-inhibiteur. Lors de la fixation à l'ADN, l'hélice HI-1 se déplie induisant la déstructuration de ce module. Les hélices α du domaine ETS (H1-H3) sont représentées en bleu, les brins β (S1-S4) en jaune. Les hélices des domaines inhibiteurs sont colorées en orange. D'après [91].

Les changements de conformation du module auto-inhibiteur d'Ets-1 lors de sa liaison à l'ADN ont été déterminés : (1) par des expériences de protéolyse ménagée et de spectroscopie par dichroïsme circulaire [92] ainsi que (2) par des expériences de RMN et de radio-cristallographie en utilisant des mutants de délétion d'Ets-1 auto-inhibés (Ets-1 Δ N300 et Ets-1 Δ N280) en solution ou fixé à l'ADN [53, 91]. L'ensemble de ces travaux démontre clairement que l'hélice HI-1 du domaine inhibiteur N-terminal de type hélice-pelote (« helix-coil ») se déstructure lors de la liaison d'Ets-1 à l'ADN. L'utilisation de mutants de délétion d'Ets-1 a également permis de démontrer l'importance du domaine inhibiteur C-terminal pour la stabilisation de l'hélice HI-1 [58].

Le modèle pour l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 indique qu'en solution, le module auto-inhibiteur est compacté sur le domaine ETS *via* l'interaction des hélices des deux domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4, H5) avec l'hélice H1 du domaine ETS constituant un état inhibé. Lors de la fixation à l'ADN, l'hélice HI-1 du domaine inhibiteur N-terminal se déplie induisant la déstructuration du module auto-inhibiteur pour passer dans un état activé (Figure 13B). Le déplacement de l'équilibre vers l'état inhibé explique la faible affinité de liaison relative d'Ets-1, qui correspond à une réduction d'affinité d'un facteur 15 par rapport à une molécule dépourvue de module auto-inhibiteur [58, 93].

Malgré l'importance de ces données dans notre compréhension du mécanisme d'auto-inhibition d'Ets-1, une question importante persiste toujours : comment la déstructuration de l'hélice HI-1 contrôle la liaison d'Ets-1 à l'ADN ? L'hélice H1 du domaine ETS qui participe à la fois à la formation du module inhibiteur et à la liaison à l'ADN semble être mise en cause. En effet, une étude montre : (1) que les interactions de l'hélice H1 au sein du module auto-inhibiteur sont nécessaires pour maintenir la structure de l'hélice HI-1 et (2) que l'hélice H1 est impliquée dans la reconnaissance indirecte de l'ADN par un contact entre la leucine 337 (L337) et un phosphate du squelette en 3' du cœur consensus (Figure 11B) [94].

Par conséquent, il a été suggéré que la fixation à l'ADN nécessiterait un repositionnement de l'hélice H1 afin d'engager la liaison avec le phosphate du cœur. Ceci induirait de façon allostérique la déstructuration de l'hélice HI-1. En fait, l'analyse de la structure de mutants de délétion d'Ets-1 auto-inhibés en solution ou fixés à l'ADN ne valide pas directement cette hypothèse, mais elle permet d'affiner le mécanisme proposé.

En effet, aucun changement de position de l'hélice H1 n'a été mis en évidence lors de la fixation à l'ADN. Par contre, un changement de conformation de la boucle entre les hélices HI-2 et H1 a pu être observé [53, 91]. Celui-ci pourrait être à l'origine de la déstructuration de l'hélice HI-1 en provoquant le déplacement de l'hélice apolaire HI-2, ce qui romprait le cœur hydrophobe du module. Il n'en reste pas moins que de nombreux points doivent encore être éclaircis afin de percer les mécanismes intimes à la base de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.

III/ Régulation de l'auto-inhibition

L'auto-inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1 est régulée : (1) positivement par la phosphorylation qui renforce l'état auto-inhibé de la protéine ou (2) négativement par des

interactions protéine-protéine qui entraînent la levée de l'auto-inhibition de la liaison à l'ADN.

III-1/ Régulation par phosphorylation : renforcement de l'auto-inhibition

L'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 est renforcée suite à la phosphorylation par la CaMKII de la région riche en sérines située en amont du domaine inhibiteur N-terminal (Figure 9) (voir Chapitre II §IV-1). Des études quantitatives de fixation à l'ADN *in vitro* prouvent que l'affinité d'Ets-1 pour l'ADN après phosphorylation est réduite d'un facteur 50 [55, 61]. Des expériences de protéolyse ménagée démontrent que ce type de modification stabilise la structure du module auto-inhibiteur. D'après les auteurs, les charges négatives apportées par les résidus phosphates seraient impliquées dans des interactions électrostatiques avec la région basique d'Ets-1 (entre les résidus 298 et 318) qui comprend l'hélice HI-1 (Figure 14B). Les conséquences seraient donc le blocage du dépliement de l'hélice HI-1 et le renforcement de la structure du module auto-inhibiteur [55].

Une étude récente démontre effectivement que la région riche en sérines est en contact avec une surface s'étendant du domaine inhibiteur N-terminal au domaine ETS d'Ets-1 [55]. Ceci suggère que cette interaction, renforcée après phosphorylation, réduirait la flexibilité conformationnelle du module auto-inhibiteur nécessaire à la levée de l'auto-inhibition. Contrairement aux hypothèses de certains auteurs, cette interaction n'est que peu contrôlée par des forces électrostatiques, car elle n'est pas affectée par des variations de forces ioniques [55].

D'autres travaux démontrent également que : (1) seule la phosphorylation de trois sérines (S251, S282 et S285) affecte négativement la fixation d'Ets-1 à l'ADN et ce de façon graduelle en fonction du nombre de résidus modifiés, (2) bien que la région riche en sérines n'adopte pas de structure déterminée en solution, sa phosphorylation induit des changements conformationnels au niveau de résidus des hélices HI-1, H1 et H3 et enfin, (3) la phosphorylation restreint la dynamique du module auto-inhibiteur, réduisant ainsi la propension de l'hélice HI-1 à se déplier comme suspecté dans les études précédentes [61].

celle d'Ets-1 en absence de modifications post-traductionnelles. Par conséquent, cette phosphorylation d'Ets-2 n'aurait pas d'effets répressifs majeures supplémentaires [55]. Ainsi, l'activation de la CaMKII par des signaux extracellulaires pourrait avoir une action différentielle sur la capacité de liaison à l'ADN des protéines Ets-1 et Ets-2.

III-2/ Régulation par des interactions protéine-protéine : levée de l'auto-inhibition

La levée de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1, favorisant la régulation de l'expression de ses gènes cibles, s'effectue : (1) de façon dépendante des partenaires protéiques dans le cadre d'une régulation combinatoire ou (2) de façon autonome au niveau d'une configuration particulière d'EBS organisés en répétition inversée (ou palindrome). Dans les deux cas, des interactions protéine-protéine sont à l'origine de modifications conformationnelles d'Ets-1 qui déstructurent le module auto-inhibiteur, facilitant alors sa fixation à l'ADN.

III-2-1/ Levée de l'auto-inhibition par des partenaires protéiques

L'auto-inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1 peut être levée grâce à l'interaction avec certains partenaires protéiques, augmentant ainsi sa faible capacité de fixation sur ses consensus. Cette coopération s'effectue au niveau de promoteurs cibles contenant un EBS adjacent au site de liaison du partenaire. Dans ce cadre, différents facteurs de transcription ont pu être mis en cause, tels que NF κ B (« nuclear factor kappa B »), TFE-3 (« transcription factor E-3 »), USF-1 (« upstream stimulatory factor-1 »), Pax-5 ou AML-1 (« acute myeloid leukemia-1 ») (appelée également Runx-2, CBF α 2, ou PEBP2 α) [95-97]. Ces interactions seront étudiées dans le Chapitre IV §II-3-1.

Cette régulation combinatoire permet d'augmenter la spécificité de liaison à l'ADN d'Ets-1 vis-à-vis des autres membres de la famille Ets, puisque les promoteurs cibles doivent contenir le site consensus de liaison du partenaire adjacent à celui d'Ets-1, désigné site composite. De plus, elle permet à Ets-1 de se fixer sur des sites très dégénérés par rapport au consensus et qui ne peuvent être reconnus par une protéine Ets seule.

III-2-1-a/ Interaction avec Pax-5 en présence d'ADN

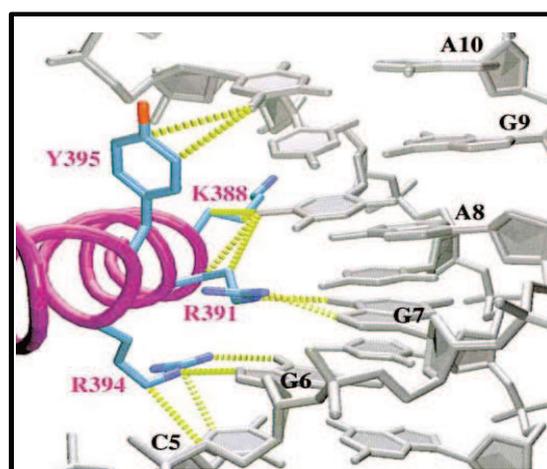
L'interaction d'Ets-1 avec le facteur Pax-5 permet sa liaison au niveau d'un EBS présent dans le promoteur du gène de la chaîne α des immunoglobulines (gène *mb-1*) qui

contient un cœur non consensus de type 5'-GGAG-3'. Les expériences de gel retard menées avec ce site montrent qu'Ets-1 est incapable de s'y lier, comme le laissait présager la forte divergence de séquence par rapport au consensus [98]. Néanmoins, l'ajout du facteur de transcription à domaine Paired Pax-5, qui possède un site adjacent à l'EBS au sein du promoteur du gène *mb-1*, permet à Ets-1 de se fixer en formant un complexe ternaire Pax-5-ADN-Ets-1 [98, 99]. Les interactions protéine-protéine entre ces deux facteurs impliquent des résidus appartenant à leurs domaines de liaison à l'ADN respectifs (le domaine ETS pour Ets-1 et le domaine Paired pour Pax-5) [15, 53].

Le mécanisme de ce partenariat particulier a pu être décrit en résolvant par radio-cristallographie la structure du complexe ternaire comprenant les domaines ETS et Paired liés à l'ADN [33]. L'étude des contacts directs entre le domaine ETS et les bases de l'ADN montre, de façon tout fait intéressante, que les interactions avec Pax-5 entraînent un changement de conformation d'un résidu crucial de l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1. Il s'agit de la tyrosine 395 (Y395) qui, dans le cas d'un cœur consensus 5'-G₊₁G₊₂A₊₃A₊₄-3', interagit directement avec les bases en position +3, +4 et +5 (Figure 11A, résidus en position 8, 9 et 10) [33]. Par contre, au sein du complexe avec Pax-5, sur un cœur 5'-G₊₁G₊₂A₊₃G₊₄-3', ce même résidu est incapable d'interagir avec la base en position +4. Seule la base en position +5 (correspondant à la position 10 dans la Figure 15) est contactée dans ces conditions. Ceci résulte de la réorientation de cette tyrosine induite par son interaction avec un résidu du domaine Paired (comparaison Figure 11A et Figure 15) [33].

Figure 15 : Contacts directs entre l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN dans le complexe ternaire Pax-5-ADN-Ets-1.

La chaîne latérale des résidus impliqués dans des interactions directes avec les bases est représentée et les contacts sont figurés en jaune. Les bases du cœur 5'-G₊₁G₊₂A₊₃A₊₄-3' sont numérotées G6, G7, A8, A9. D'après (PDB : 1K78).



Cette conformation particulière est stabilisée par certains résidus peu conservés du domaine ETS (glutamine 336 et acide aspartique 398), ce qui explique que bien que la tyrosine 395 soit retrouvée chez la très grande majorité des protéines Ets, seules Gabp- α et Fli-1 sont également capables d'interagir avec Pax-5 [98].

III-2-1-b/ Interaction avec AML-1 en présence d'ADN

Le cas du partenariat avec AML-1 est particulièrement intéressant car il a permis de mettre à jour un mécanisme original par lequel deux facteurs de transcription acquièrent mutuellement une plus grande spécificité de liaison à l'ADN. De façon similaire à Ets-1, AML-1 est auto-inhibée pour sa liaison à l'ADN à cause d'interactions intra-moléculaires entre un domaine inhibiteur, NRDB (« negative regulatory region of DNA binding ») et son domaine de liaison à l'ADN Runt [100].

De façon intéressante, il existe des sites de liaison adjacents pour ces deux protéines au sein des « enhancers » du virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MLV pour « Moloney-murine leukemia virus ») ou du gène de la chaîne β du récepteur des lymphocytes T (TCR pour « T cell receptor »), qui leur permettent d'activer la transcription de façon synergique [101]. Des expériences de retard sur gel montrent que sur ces sites, Ets-1 et AML-1 sont incapables de se fixer seules, à cause de leur auto-inhibition de liaison à l'ADN et de la dégénérescence de la séquence de ces éléments (sites de « basse affinité »). Par contre, la présence simultanée de ces deux protéines aboutit à la formation d'un complexe ternaire stable Ets-1-ADN-AML-1 suite à une levée mutuelle de leur auto-inhibition (Figure 16) [95, 102].

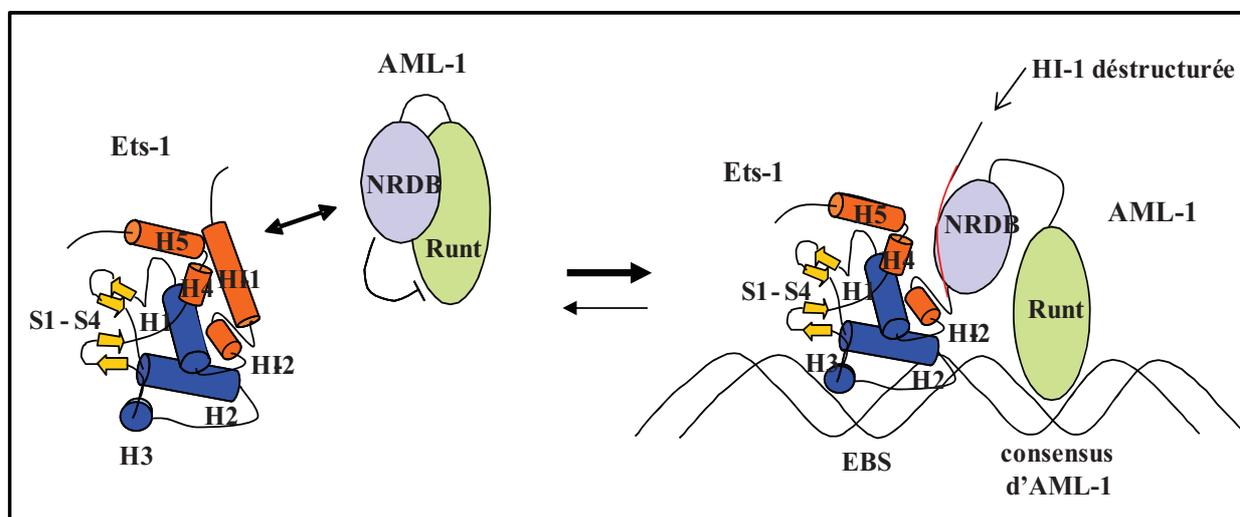


Figure 16 : Modèle de levée mutuelle de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 et d'AML-1.

L'interaction d'Ets-1 *via* son domaine inhibiteur N-terminal incluant l'hélice HI-1 avec AML-1 *via* son domaine NRBD induirait la levée mutuelle de leur auto-inhibition et la fixation à l'ADN au niveau d'un site composite, constitué d'un EBS adjacent au site consensus d'AML-1. Les hélices α du domaine ETS (H1-H3) sont représentées en bleu, les brins β (S1-S4) en jaune. Les hélices des domaines inhibiteurs d'Ets-1 sont colorées en orange. Le domaine Runt d'AML-1 est figuré en vert pâle et son domaine inhibiteur NRDB en violet. D'après [102].

Le mécanisme sous-jacent comprend des interactions protéine-protéine entre le domaine inhibiteur N-terminal d'Ets-1 et le NRDB d'AML-1, mises en évidence par des expériences de co-rétention protéique [95]. Ces interactions pourraient s'opposer au repliement de l'hélice HI-1, empêchant la reformation du module auto-inhibiteur d'Ets-1.

De plus, l'utilisation d'un mutant ponctuel d'Ets-1 a permis de démontrer de façon élégante que le mécanisme d'auto-inhibition de liaison à l'ADN est directement impliqué dans la fixation coopérative [103]. Ces travaux mettent en évidence que l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1, en restreignant son affinité de fixation, apporte une plus grande spécificité de reconnaissance grâce à l'intervention de partenaires protéiques privilégiés.

III-2-2/ Levée de l'auto-inhibition par liaison aux EBS en palindrome

Ets-1 peut s'affranchir de ses partenaires protéiques pour lever sa propre auto-inhibition de liaison à l'ADN en se fixant au niveau d'une configuration particulière d'EBS organisés en palindrome. Une telle configuration d'EBS est décrite dans un nombre restreint de promoteurs tels que ceux du gène *stromélysine-1* (ou MMP-3 (« matrix metalloproteinase-3 »)), codant une métalloprotéase matricielle [104, 105] et du gène suppresseur de tumeur *p53* [106] (Tableau 3).

<u>promoteur</u>	<u>EBS en palindrome</u>
<i>stromélysine-1</i>	5' ... ACAGGAAGCACTTCCTGG ... 3'
<i>p53</i>	5' ... TACGGAAAGCCTTCCTAA ... 3'

Tableau 3 : Séquences des EBS en palindrome dans le promoteur des gènes *stromélysine-1* et *p53*.

Dans le contexte du promoteur du gène de la stromélysine-1, notre équipe a démontré que cette configuration particulière de sites engendre une liaison coopérative de deux molécules d'Ets-1 [107]. Ceci aboutit *in vitro* et dans un contexte cellulaire à la formation d'un complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1 qui possède un fort pouvoir transactivateur au niveau de ce promoteur [107, 108]. L'utilisation de mutants de délétion d'Ets-1 montre que la région comprise entre les résidus 245-330 (codée par l'exon VII du gène *ets-1*), qui contient le domaine inhibiteur N-terminal et la région riche en sérines, est absolument nécessaire à la liaison coopérative sur ces EBS, suggérant l'implication de cette région dans l'interaction entre les deux protéines Ets-1. D'ailleurs, la phosphorylation de cette région d'Ets-1 par la CaMKII qui renforce l'auto-inhibition de liaison à l'ADN réduit la formation du complexe ternaire. Sur la base de ces travaux, un mécanisme a pu être proposé : (1) la

première molécule d'Ets-1 se fixe sur un EBS avec une faible affinité à cause de son auto-inhibition de liaison, (2) la fixation de la deuxième molécule est facilitée et accélérée grâce à la présence de la région codée par l'exon VII, (3) le complexe ternaire est stabilisé par une levée mutuelle de l'auto-inhibition de liaison de chaque molécule (Figure 17).

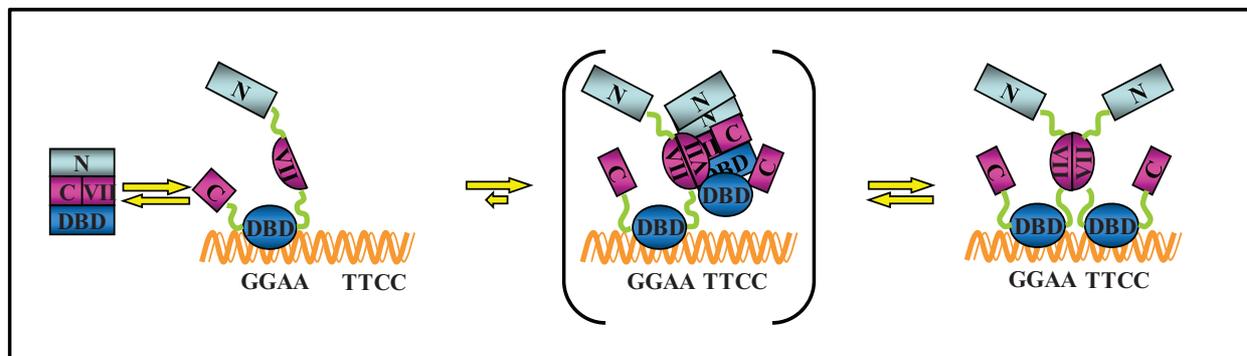


Figure 17 : Modèle de la fixation coopérative d'Ets-1 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.

Une première molécule d'Ets-1 se fixe avec une faible affinité sur l'EBS en position 5' du palindrome. Grâce à une interaction au niveau du domaine codé par l'exon VII, elle facilite le recrutement d'une seconde molécule d'Ets-1 sur l'EBS en position 3'. Il en résulte la formation d'un complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1. Les rectangles (rose noté C et gris noté N) représentent les extrémités carboxy et amino terminale de la protéine Ets-1. Le domaine de liaison à l'ADN correspond au cercle bleu désigné DBD et le domaine codé par l'exon VII au demi-cercle rose désigné VII. D'après [107].

La structure radio-cristallographique de ce complexe ternaire a été obtenue en utilisant le mutant minimum de délétion d'Ets-1 étant auto-inhibé (Ets-1 Δ 280) et un fragment d'ADN correspondant aux EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 (Figure 18) [109].

Les résultats obtenus corroborent ceux décrits dans le Chapitre III §I-2 concernant l'interaction entre les résidus du domaine ETS d'Ets-1 et les bases du cœur consensus (Figure 18B). Ils prouvent également que :

- (1) la dimérisation d'Ets-1 nécessite la présence d'ADN,
- (2) la formation du complexe ternaire n'induit pas de réelle courbure de l'ADN (4.8°) et réduit même celle induite par Ets-1 sur chacun des EBS du palindrome de façon indépendante (14.0° et 16.2°),
- (3) les résidus 332 à 338 des domaines ETS de chaque protéine Ets-1 interagissent avec les 4 paires de bases centrales aux 2 EBS au niveau du petit sillon de l'ADN,
- (4) une interface entre les deux protéines Ets-1 est créée grâce à une interaction particulière entre un résidu glycine (G333) de la première protéine Ets-1 dont la conformation est dépendante du résidu proline adjacent (P334) avec un résidu asparagine (N380) de la

seconde protéine Ets-1 [109]. Les résidus G333 et P334 nécessaires à la dimérisation d'Ets-1 sont conservés dans la séquence d'Ets-2 en accord avec sa capacité à se fixer au niveau de ce palindrome d'EBS.

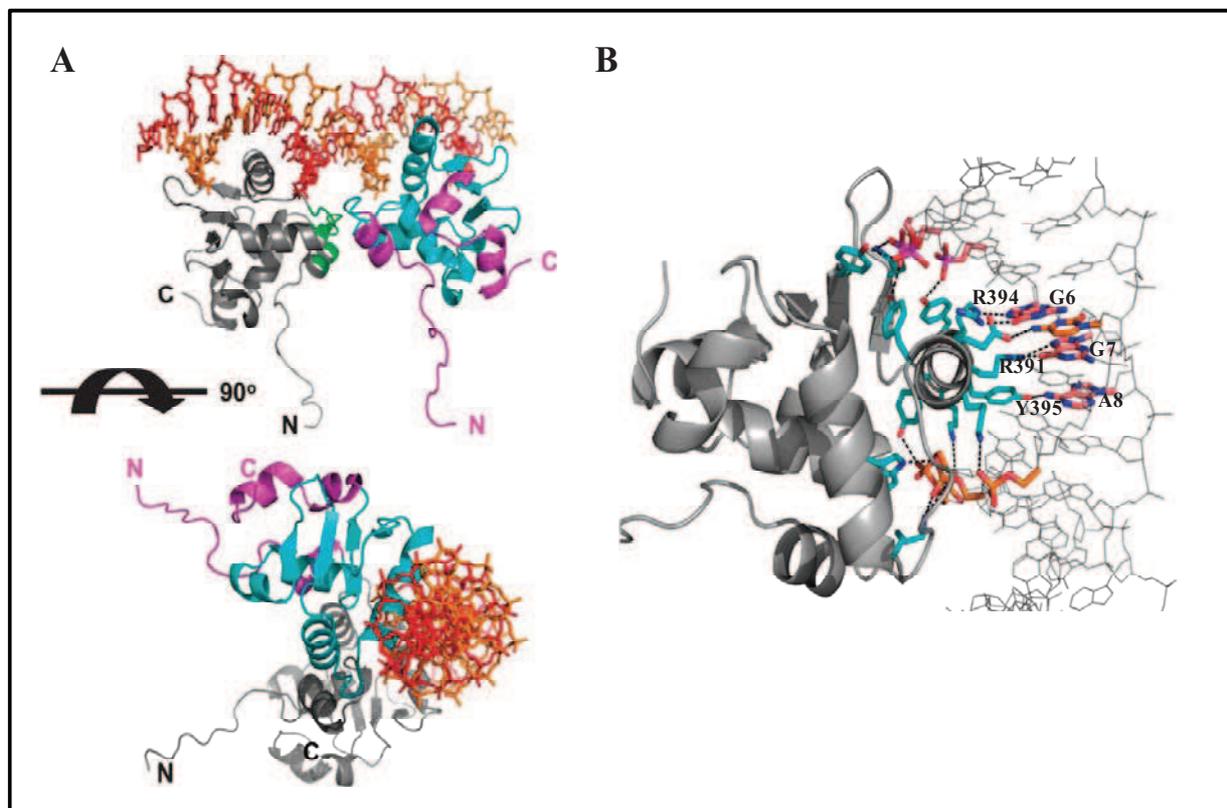


Figure 18 : Complexe ternaire, Ets-1-ADN-Ets-1, au niveau des EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.

A : Structure générale du complexe ternaire dans deux orientations. L'une des deux molécules Ets-1 est représentée en gris, l'autre en couleur (le domaine ETS est indiqué en bleu et les domaines inhibiteurs en rose). L'ADN apparaît en rouge et en orange, une couleur pour chaque brin. **B :** Contacts directs entre l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN dans le complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1. La chaîne latérale des résidus (R394, R391 et Y395 de l'hélice H3), impliqués dans des interactions directes avec les bases est représentée. Les contacts sont indiqués en pointillés. Les bases du cœur 5'-G₊₁G₊₂A₊₃-3' sont numérotées G6, G7, A8. D'après [109] (PDB : 2NNY).

De façon contradictoire, des travaux réalisés par notre équipe avec des molécules en solution n'aboutissent pas aux mêmes résultats. En effet, il apparaît dans l'étude menée par notre équipe que la formation du complexe ternaire d'Ets-1 p51 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 induirait une courbure de l'ADN (Figure 19). Ainsi, la fixation d'une première molécule d'Ets-1 p51 induit une courbure de l'ADN dirigée dans le sens de l'interface protéine-ADN. Le DBD de cette protéine crée une gêne stérique empêchant la liaison d'une deuxième molécule au niveau du deuxième EBS. Grâce à son module inhibiteur qui permet de lever les contraintes stériques, une deuxième molécule d'Ets-1 p51 se fixe coopérativement modifiant ainsi la direction de la courbure de l'ADN induite

par la première molécule (Figure 19). La direction de cette courbure de l'ADN a un impact décisif sur le niveau d'activation du promoteur. En effet, seule une courbure dirigée à l'opposé de l'interface protéine-ADN au centre des EBS induit une activation maximale du promoteur [110].

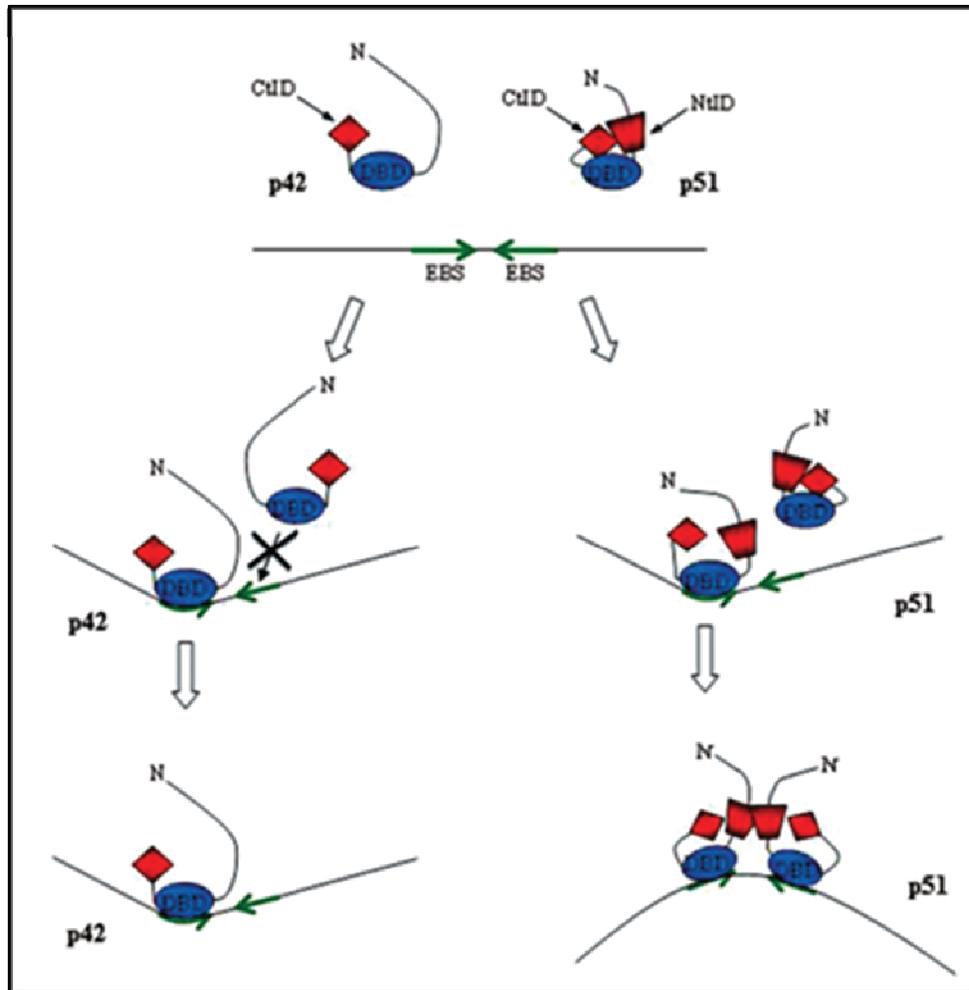


Figure 19 : Modèle pour la liaison différentielle d'Ets-1 p51 et Ets-1 p42 au niveau des EBS en palindrome du promoteur de la stromélysine-1.

La fixation d'une molécule d'Ets-1 p42 sur les EBS en palindrome induit une courbure de l'ADN. La liaison d'une deuxième molécule est empêchée par une gêne stérique au niveau du DBD. A l'inverse, deux molécules d'Ets-1 p51 sont capables de lever ces contraintes stériques *via* une interaction coopérative qui induit : (1) un réarrangement structural drastique du module auto-inhibiteur (domaines inhibiteur C-terminal (CtID) et N-terminal (NtID)) et la création d'une interface intermoléculaire entre les domaines inhibiteurs N-terminaux et (2) une courbure de l'ADN à l'opposé de l'interface protéine-ADN. Ce complexe ternaire est responsable d'une activation maximale du promoteur. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) correspond au cercle bleu, le domaine inhibiteur N-terminal (NtID) correspond au trapèze rouge, le domaine inhibiteur C-terminal (CtID) correspond au rectangle rouge, les EBS en palindrome sont représentés par des flèches vertes. D'après [110].

Il est à noter qu'un palindrome d'EBS est également présent dans le promoteur du gène *p53* [106]. Ceci suggère un mode de fixation coopérative d'Ets-1 au niveau de ce promoteur, comme décrit pour le promoteur du gène de la stromélysine-1. Des travaux menés par notre équipe montrent qu'Ets-1 se fixe de façon coopérative sur les EBS en palindrome du

promoteur de *p53* pour former un complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1, optimal pour la transactivation. Dans ce palindrome, l'EBS en position 3' présente une séquence dégénérée qui est incapable de fixer Ets-1 de façon isolée, mais qui la recrute lors de la formation du complexe ternaire [111]. Cet EBS constitue un site de « basse affinité » (voir Chapitre III §I-1). Ces résultats sont en corrélation avec des travaux menés sur des cellules souches embryonnaires (ES pour « *embryonic stem* ») de souris démontrant que la répression d'Ets-1 par la technologie d'ARN interférence réduit le taux d'ARNm *p53* en réponse aux rayons ultra-violet (UV), mais que celui-ci est restauré par la réexpression d'Ets-1 [112].

Ce mécanisme de fixation coopérative, initialement caractérisé au niveau du promoteur du gène de la stromélysine-1, peut être un modèle général de la fixation d'Ets-1 sur des EBS en palindrome permettant de contrecarrer la dégénérescence de la séquence des EBS et donc d'augmenter le nombre de gènes cibles potentiels d'Ets-1.

IV/ Propriétés de liaison à l'ADN de l'isoforme Ets-1 p42

L'isoforme Ets-1 p42 est dépourvue du domaine codé par l'exon VII (87 acides aminés) (Figure 20). Celui-ci est composé : (1) du domaine inhibiteur N-terminal qui est indispensable à l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 et, (2) de la région riche en sérines qui, après phosphorylation principalement par la CaMKII, renforce l'auto-inhibition de liaison à l'ADN. L'isoforme Ets-1 p42 est donc incapable de former un module auto-inhibiteur et présente une affinité de liaison à l'ADN plus grande qu'Ets-1 p51 [22, 58, 113, 114].

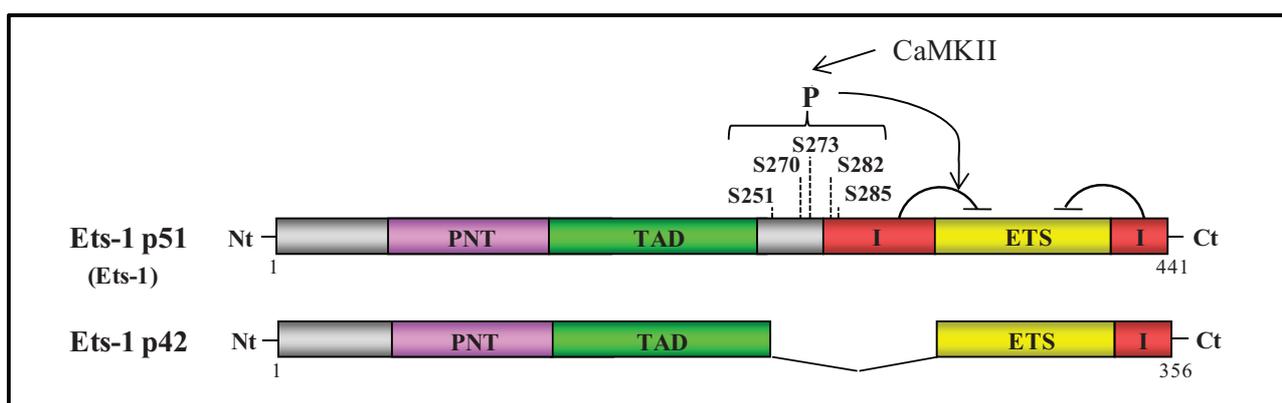


Figure 20 : Structure de l'isoforme Ets-1 p42 par comparaison à celle d'Ets-1 p51.

La kinase CaMKII phosphoryle les résidus sérines présents dans le domaine codé par l'exon VII, ce qui renforce l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51. Cette région étant absente dans l'isoforme Ets-1 p42, celle-ci n'est pas soumise à cette régulation. Les domaines fonctionnels des deux isoformes sont représentés, à savoir le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine transactivateur (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge et le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune.

En effet, Ets-1 p42 forme un complexe quatre à vingt fois plus stable qu'Ets-1 p51 avec l'ADN au niveau d'EBS isolés, résultant d'une vitesse de dissociation plus faible [113]. Ce différentiel est accentué en réponse à des signaux calciques qui renforcent l'auto-inhibition d'Ets-1 p51 *via* la phosphorylation de la région riche en sérines, absente chez Ets-1 p42 (Figure 20) [55, 61]. De plus, les travaux menés au sein de notre équipe montrent qu'Ets-1 p42 n'est pas auto-inhibée pour sa fixation à l'ADN et n'est pas soumise au mécanisme de coopérativité positive de liaison sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 [107, 110]. En effet, la fixation d'une première molécule induit une courbure de l'ADN d'amplitude proche à celle induite par la fixation d'une seule molécule d'Ets-1 p51 (Figure 19). La liaison d'une deuxième molécule est empêchée par une gêne stérique au niveau du DBD. Ceci est causé par la configuration particulière des EBS en palindrome. Par conséquent, Ets-1 p42 formera, au niveau de ces sites, uniquement un complexe binaire responsable d'une faible transactivation (Figure 19) [110].

En plus de ce différentiel de fixation à l'ADN par rapport à Ets-1 p51, Ets-1 p42 est capable de se lier sur des EBS non reconnus par Ets-1 p51 [22, 115]. Le recrutement préférentiel de l'une ou l'autre des isoformes au niveau des EBS est bien illustré au niveau du promoteur du gène de la VE-cadhérine [22]. En effet, ce promoteur contient deux EBS, désignés EBS4 et EBS2. L'EBS4 recrute de façon similaire les deux isoformes alors que l'EBS2 interagit spécifiquement avec Ets-1 p42. Dans les deux cas, il en résulte une transactivation du promoteur. Cette discrimination est la conséquence, d'une part, de la différence d'affinité qu'ont ces deux isoformes pour les différents EBS et, d'autre part, de la capacité d'Ets-1 p42 à reconnaître des séquences consensus plus variées qu'Ets-1 p51. En effet, la mutation de la base située en position -1 d'un EBS (c'est-à-dire avant le cœur GGAA/T) de C en G affecte fortement la fixation d'Ets-1 p51 alors qu'elle n'a pas d'effet sur celle d'Ets-1 p42 [22].

Ces différences de propriétés de liaison à l'ADN et de reconnaissance de consensus de fixation sont donc à l'origine de propriétés distinctes entre Ets-1 p51 et Ets-1 p42.

V/ Propriétés de liaison à l'ADN de l'isoforme Ets-1 p27

L'isoforme Ets-1 p27 possède le domaine ETS de liaison à l'ADN, les domaines auto-inhibiteurs N- et C-terminaux ainsi que la région riche en sérine (Figure 21). Cette structure originale lui permet de lier l'ADN suivant le même mécanisme qu'Ets-1 p51.

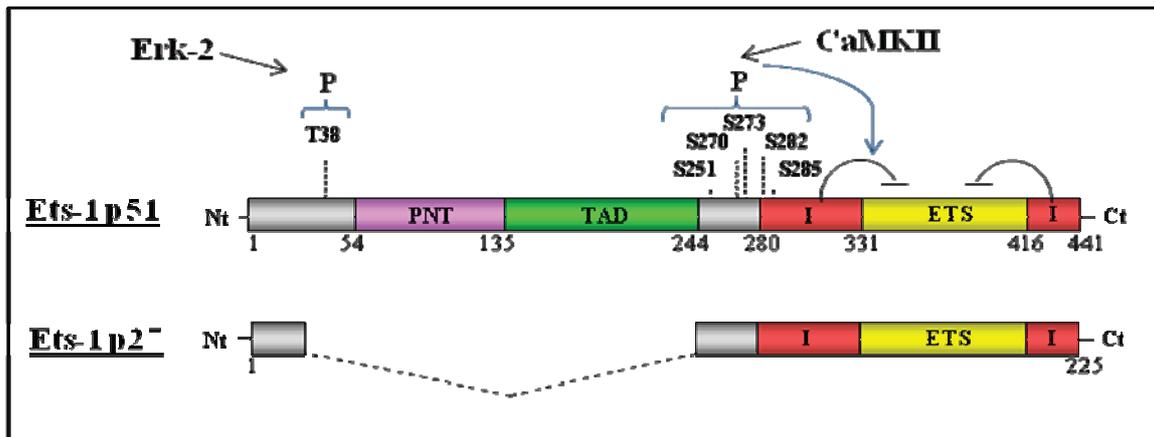


Figure 19: Structure de l'isoforme Ets-1 p27 par comparaison à celle d'Ets-1 p51.

La kinase CaMKII phosphoryle les résidus sérines présents dans le domaine codé par l'exon VII, ce qui renforce l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51. Cette région étant présente dans l'isoforme Ets-1 p27, celle-ci est supposée être soumise à la même régulation. Les domaines fonctionnels sont représentés, à savoir le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine transactivateur (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge et le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune.

En effet, les travaux menés par notre équipe montrent que, de la même façon qu'Ets-1 p51, Ets-1 p27 est auto-inhibée pour sa liaison à l'ADN et est soumise au mécanisme de coopérativité de liaison sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1. Ceci aboutit à la formation d'un complexe ternaire Ets-1 p27-ADN-Ets-1 p27 [20]. En outre, la présence de la région riche en sérines dans la séquence d'Ets-1 p27 (Figure 21) laisse présager que, de la même façon qu'Ets-1 p51, la phosphorylation de cette région par la CaMKII renforce l'auto-inhibition de sa liaison à l'ADN.

L'absence du domaine Pointed, du domaine transactivateur et du site de phosphorylation par Erk-2 (T38) suggère une action négative d'Ets-1 p27 sur la transcription de gènes, et en particulier ceux régulés par Ets-1 p51. Ceci sera explicité dans le Chapitre IV §II-1-2.

En conclusion de ce Chapitre, il apparaît que la spécificité d'action d'Ets-1 au niveau de ses promoteurs cibles résulte : (1) de la reconnaissance de séquences consensus particulières (EBS), capables d'établir des contacts spécifiques avec la protéine Ets-1 et (2) de son auto-inhibition de liaison à l'ADN qui nécessite soit l'intervention de partenaires protéiques pour favoriser le recrutement d'Ets-1 au niveau d'EBS adjacents au site de fixation du partenaire ou soit une organisation particulière d'EBS en palindrome. De tels sites

composites ou palindromiques n'étant présents que dans un nombre restreint de promoteurs, ceci va accroître la spécificité d'action d'Ets-1.

Les données exposées au cours de ces deux premiers Chapitres fournissent des informations plutôt structurales sur la protéine Ets-1 et son mode de fixation à l'ADN. Mais qu'en est-il dans un contexte cellulaire ? Quels sont les éléments responsables de l'expression du gène *ets-1* ? Quelles sont les voies de signalisation capables de moduler l'activité de cette protéine, à la vue des nombreux sites de modifications post-traductionnelles qu'elle possède ? Et surtout, quel est le rôle des partenaires d'interaction dans la régulation de l'activité d'Ets-1. Ces questions seront abordées dans le Chapitre suivant.

CHAPITRE IV : Régulation d'Ets-1

I/ Régulation de l'expression du gène *ets-1*

L'expression du gène *ets-1* est régulée par différents signaux extracellulaires qui activent ou répriment des voies de transduction intracellulaires transmettant le signal du cytosol au noyau. Des facteurs de transcription sont activés en aval pour agir au niveau du promoteur du gène *ets-1* soit directement en se fixant sur leurs éléments de réponse, soit indirectement par l'intermédiaire d'autres facteurs.

I-1/ Promoteur humain d'*ets-1* et ses facteurs régulateurs directs

Un certain nombre de sites fonctionnels pour des facteurs de transcription a pu être caractérisé au sein du promoteur du gène *ets-1* (Figure 22).

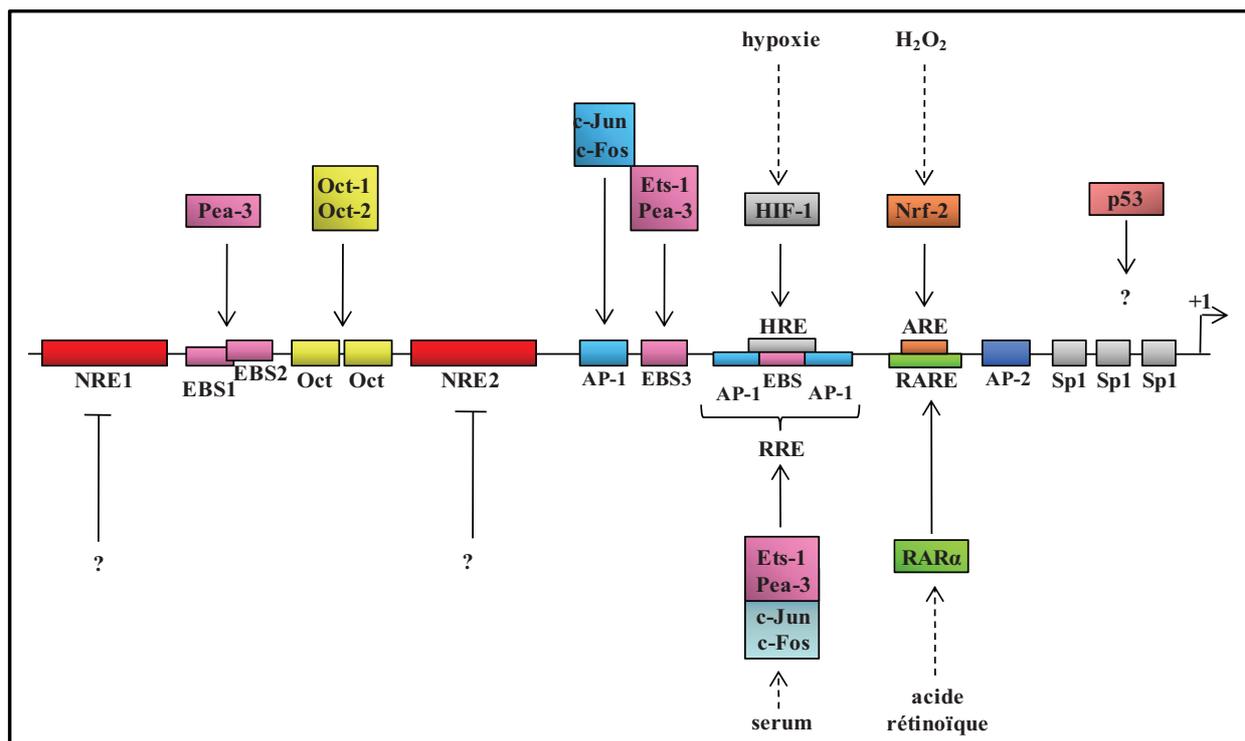


Figure 20 : Promoteur du gène *ets-1*.

Les rectangles rouges (NRE1 et NRE2) représentent les éléments de réponse négative et les autres, les éléments de réponse positive. Les flèches indiquent une activation du promoteur par des facteurs de transcription eux-mêmes (traits pleins) ou sous l'action de signaux extracellulaires (pointillés). Le +1 est le point d'initiation de la transcription.

L'analyse de la séquence du promoteur du gène *ets-1* montre qu'il ne possède pas de boîtes TATA et CCAAT qui sont les sites généraux d'initiation de la transcription gouvernée

par l'ARN polymérase de type II. Par contre, une région riche en GC est située à proximité du point d'initiation de la transcription (+1) en position -190 et +230 avec plus de 75% de bases GC [116] (Figure 22). Ce type de séquence est retrouvé classiquement dans les promoteurs des gènes domestiques (ou « housekeeping genes »).

Le promoteur du gène *ets-1* contient également des éléments de régulation positive et négative qui permettent le recrutement de facteurs de transcription responsables de son activation ou de sa répression (Figure 22).

Sites et facteurs activateurs :

Dans la partie proximale du promoteur (Figure 22), des sites activateurs sont identifiés. Il s'agit de :

- Sp1 au nombre de trois [116],
- AP-2 (« activator protein-2 ») [117],
- RARE (« retinoic acid response element »), recrutant le récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque RAR α (« retinoic acid receptor a ») en réponse à l'acide rétinoïque [44],
- ARE (« antioxydant responsive element »), cible du facteur Nrf-2 (« nuclear factor E2-related factor-2 ») activé en réponse à l'H₂O₂ [118],
- RRE (« Ras-responsive element »), composé d'un EBS encadré par deux sites AP-1 (« activator protein-1 ») et activé par les facteurs Ets-1 et Pea-3 au niveau de l'EBS et c-Jun/c-Fos au niveau des sites AP-1 en réponse au sérum [116],
- HRE (« hypoxia responsive element »), recrutant le facteur HIF-1 (« hypoxia-inducible factor-1 ») médiateur nucléaire de l'hypoxie [119],
- EBS, désigné EBS3, reconnu par les facteurs Ets-1 et Pea-3 [120],
- AP-1, fixant les facteurs c-Jun/c-Fos [116, 117].

Dans la partie plus distale du promoteur (Figure 22), des études ont mis en évidence deux sites activateurs :

- Oct (« octamer »), deux sites adjacents recrutant les protéines Oct-1 et Oct-2 [120],
- EBS, deux sites adjacents désignés EBS1 et EBS2 fixant Pea-3 [120].

Quelques précisions intéressantes sur la structure de ce promoteur sont à noter. Tout d'abord, la présence d'un élément de réponse à Ras (RRE) dans le promoteur d'*ets-1* pourrait être responsable de l'induction de son expression par le PMA (« phorbol 12-myristate 3-acetate » également dénommé TPA « 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate »), ester de phorbol connu pour ses propriétés d'inducteur de tumeurs. Cette activation a été rapportée par différents auteurs [121-123]. En effet, ces éléments RREs jouent un rôle fondamental dans l'activation des promoteurs par des oncogènes et des esters de phorbol. De plus, l'ensemble de ces données démontre qu'*Ets-1* est capable d'augmenter l'activité de son propre promoteur *via* l'EBS3 et l'EBS inclus dans le RRE (Figure 22) [116]. Il existe donc une boucle positive d'auto-activation de l'expression du gène *ets-1* [26]. Malgré sa forte identité avec *Ets-1*, le facteur *Ets-2* est incapable d'engendrer cet effet [26]. Par contre, la protéine *Pea-3* est un activateur bien meilleur qu'*Ets-1* au niveau de ce promoteur [120]. Ceci résulte probablement de sa capacité à être recrutée sur l'ensemble des EBS contenus dans le promoteur d'*ets-1* (EBS1-2-3 et EBS du RRE) (Figure 22).

Sites et facteurs represseurs :

Les seuls éléments represseurs identifiés dans le promoteur d'*ets-1* sont les deux éléments NRE1 et NRE2 (« negative regulatory element »), situés dans la partie plus distale du promoteur de part et d'autre de la région contenant les EBS1-2 et les sites Oct (Figure 22). Leur délétion induit une importante augmentation de l'activité basale du promoteur de plus de 20 fois [120]. D'ailleurs, cette activité est conservée dans le contexte d'un promoteur hétérologue [124]. L'utilisation de constructions du promoteur du gène *ets-1* a permis de démontrer que les capacités répressives du site NRE2 sont plus fortes que celles du site NRE1. D'après les auteurs, la localisation du site NRE2 à proximité des éléments de réponse positive pourrait être à l'origine du blocage de l'accès de facteurs activateurs à leurs sites de liaison [120]. Des complexes protéine-ADN spécifiques ont pu être mis en évidence au niveau des NRE, à partir d'extraits nucléaires de cellules lymphoïdes [124]. Néanmoins, aucun facteur de transcription n'a été identifié. L'analyse de la séquence de ces éléments par bio-informatique suggère l'existence d'un site pour le facteur YY-1, qui possède des capacités de répresseur transcriptionnel [125].

Jusqu'à ce jour un seul facteur de transcription capable d'inhiber l'activité de ce promoteur a pu être caractérisé. Il s'agit du suppresseur de tumeur p53 sous sa forme sauvage. La protéine p53 mutée est incapable d'induire cet effet répresseur. Bien qu'aucun site de

liaison pour p53 n'ait été mis en évidence, cette protéine est détectée au niveau de la région -30 du promoteur du gène *ets-1* grâce à des expériences de pontage par les rayons UV (Figure 22). Ceci suggère que p53 serait recrutée au niveau du promoteur d'*ets-1* par des interactions protéine-protéine [126].

I-2/ Signaux extracellulaires

I-2-1/ Signaux activateurs

Des travaux ont mis en évidence l'action de certains signaux extracellulaires sur l'activation du promoteur du gène *ets-1* via la fixation de facteurs de transcription comme décrit dans le §I-1 de ce Chapitre (Figure 22). C'est le cas : (1) de l'acide rétinoïque, un agent différenciant, qui augmente le taux d'ARNm *ets-1* dans des ostéoblastes et des cellules de carcinome épidermoïde [44, 127, 128], (2) du stress oxydant causé par H₂O₂ qui stimule la synthèse de la protéine Ets-1 aboutissant à une augmentation de l'activité du promoteur dans des cellules de carcinome ovarien [118] et (3) de l'hypoxie qui aboutit également à l'induction de la transcription du gène *ets-1* dans des cellules de carcinome de la vessie et des cellules endothéliales (Figure 22) [119].

D'autres signaux extracellulaires activent également l'expression d'*ets-1*. Néanmoins, aucune donnée ne précise à quel niveau agissent ces différentes molécules, facteurs de croissance et cytokines, et plus particulièrement s'ils affectent directement l'activité du promoteur d'*ets-1* (Figure 23). C'est le cas de l'EGF (« epidermal growth factor ») [129, 130], du FGF (« fibroblast growth factor ») [131], du PDGF (« platelet-derived growth factor ») [132] et du TGF- α [131, 133] dans des types cellulaires aussi variés que des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules carcinomateuses. De manière plus restreinte, l'expression du gène *ets-1* est stimulée par le facteur de dissémination HGF/SF (« hepatocyte growth factor/scatter factor ») dans des cellules épithéliales [134], le VEGF (« vascular endothelial growth factor ») et le bFGF (« basic fibroblast growth factor ») dans des cellules endothéliales [135, 136] ainsi que le PDGF-BB dans des cellules musculaires lisses vasculaires, SVMC (« smooth vascular muscle cells ») [122]. Pour l'ensemble de ces facteurs, il a pu être mis en évidence que leur action nécessite l'activation d'Erk-1/-2, kinases effectrices de la voie de signalisation mitogène Ras-MAPKs. Certaines cytokines, pro-inflammatoires comme l'IL-1 α (« interleukine-1 α ») [132], l'IL-1 β [137] et le TNF- α (« tumor necrosis factor-1 α ») [132, 138], ou pro-angiogéniques comme le CCL-2 (« CC chemokine ligand-2 ») [139], empruntent également cette voie de signalisation afin d'augmenter l'expression du gène *ets-1* (Figure 23).

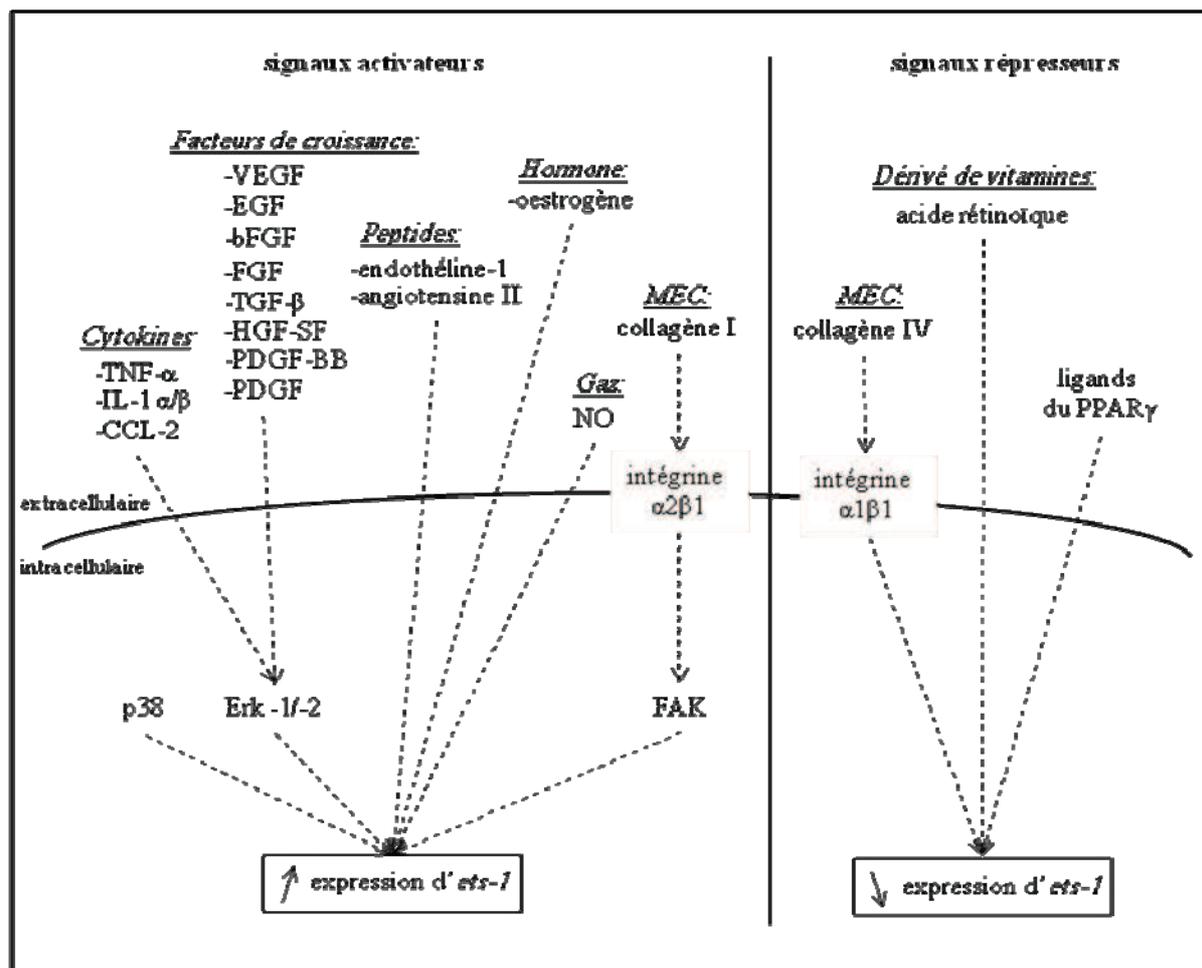


Figure 21 : Régulation de l'expression du gène *ets-1* par des signaux extracellulaires.

Les signaux indiqués sont ceux pour lesquels aucun facteur de transcription en aval n'a été identifié comme responsable de la régulation directe du promoteur.

Néanmoins, des voies aboutissant à l'activation de kinases différentes d'Erk-1/2 ont également pu être mises en cause dans l'augmentation de l'expression d'Ets-1. Il s'agit des voies stimulatrices : (1) de la MAPK p38 lors du processus de régénération endothéliale consécutif à une dénudation de ce tissu et (2) de la kinase FAK (« focal adhesion kinase ») dans les cellules endothéliales après interaction avec le collagène de type I [140] (Figure 23). De façon tout à fait intéressante, l'augmentation de l'expression du gène *ets-1* est également induite par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, récepteur membranaire à certains composants de la matrice extracellulaire (MEC) dont le collagène de type I [141]. Par conséquent, l'action du collagène de type I [140] est donc très probablement relayée par ce récepteur (Figure 23).

Par ailleurs, d'autres types de molécules ont la capacité d'activer l'expression du gène *ets-1*, parmi elles des hormones comme les oestrogènes [142], des peptides modulateurs de la vasomotricité comme l'endothéline-1 [122] et l'angiotensine II [143] ou encore le NO (« nitric oxide ») [144] (Figure 23).

I-2-2/ Signaux répresseurs

L'expression d'*ets-1* peut également être modulée de façon négative par des signaux extracellulaires (Figure 23). En particulier, l'intégrine $\alpha1\beta1$ réduit le niveau d'ARNm *ets-1*, et ce à l'inverse de l'intégrine $\alpha2\beta1$ [141]. Les intégrines sont des récepteurs, constitués de sous-unités α et β , capables de fixer différents composants de la MEC. Ainsi, les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ possèdent des ligands préférentiels différents : le collagène de type IV pour l'intégrine $\alpha1\beta1$ et le collagène de type I pour l'intégrine $\alpha2\beta1$. L'expression du gène *ets-1* pourra donc être modulée en fonction du type de molécules de la MEC en interaction avec les cellules.

Par ailleurs, des ligands synthétiques du récepteur PPAR γ (« peroxysome proliferator-activated receptor γ ») sont capables de bloquer l'augmentation du taux d'ARNm *ets-1* en réponse au PDGF dans des cellules SVMC [145]. Le PPAR γ activé agit en interférant avec la voie de signalisation du PDGF, mais en aval des MAPKs Erk-1/-2, suggérant l'inhibition d'un facteur de transcription présent au niveau du promoteur d'*ets-1* [146] (Figure 23).

Parmi les signaux extracellulaires répresseurs, nous pouvons citer l'acide rétinoïque. Tout d'abord décrit comme un activateur stimulant la fixation du RAR α au niveau du promoteur d'*ets-1* (Figure 23), il a en fait une fonction bivalente dans la régulation du gène *ets-1*. En effet, une étude a mis en évidence que l'acide rétinoïque aboutit au blocage de l'induction de l'ARNm *ets-1* par le bFGF ou le TNF- α dans des cellules endothéliales [147]. Il inhibe également l'activation du promoteur d'*ets-1* induit par le PMA, suggérant une action des récepteurs à l'acide rétinoïque au niveau de l'élément potentiel de réponse au PMA, le RRE, dans ce contexte cellulaire. Ceci est d'autant plus vraisemblable que ces récepteurs sont connus pour interférer avec la liaison de Fos et Jun au niveau du RRE de certains promoteurs, comme celui du gène de la collagénase-1 (MMP-1) [148]. L'ensemble des données sur la régulation de l'expression du gène *ets-1* par l'acide rétinoïque suggère que cette molécule agit selon des mécanismes distincts en fonction du contexte cellulaire.

II/ Régulation de l'activité d'Ets-1

L'activité de régulateur transcriptionnel d'Ets-1 est modulée : (1) par l'expression de variants d'épissage alternatif, (2) par son état de modifications post-traductionnelles et (3) par l'interaction avec des partenaires protéiques.

II-1/ Régulation par l'expression de variants d'épissage

L'épissage alternatif est un mécanisme qui permet de diversifier la fonction du produit d'un gène *via* la production de différentes isoformes. Dans le cas d'Ets-1, l'épissage alternatif de son ARNm précurseur génère deux isoformes Ets-1 p42 et Ets-1 p27 de structures différentes. Ces deux variants d'épissage possèdent des propriétés et des fonctions différentes de la protéine Ets-1 de pleine longueur.

II-1-1/ Régulation par l'expression de l'isoforme Ets-1 p42

La différence fondamentale entre Ets-1 p51 et Ets-1 p42 se situe au niveau de leurs capacités de liaison à l'ADN. En effet, la fixation d'Ets-1 p51 à l'ADN est régie par le mécanisme d'auto-inhibition contrairement à celle d'Ets-1 p42. Ceci signifie que dans le cas des promoteurs contenant un EBS isolé, ceux-ci seront préférentiellement activés par Ets-1 p42 puisqu'elle possède une affinité de liaison plus forte qu'Ets-1 p51. Ceci a pu être démontré en particulier au niveau du promoteur de la caspase-1 (« cysteinyl-aspartate-specific protease-1 ») possédant un EBS situé en position -525 [115]. L'action spécifique d'Ets-1 p42 sur ce promoteur lui confère une fonction biologique propre. En effet, Ets-1 p42 est capable d'induire l'apoptose dans des cellules de carcinome de colon DLD-1 contrairement à Ets-1 p51 [15]. De plus, l'augmentation de l'expression d'Ets-1 p42 induit l'apoptose de ces cellules dans des conditions de faibles concentrations en sérum [28] ou suite à un traitement avec un anticorps anti-Fas [15]. La surexpression d'Ets-1 p42 dans les cellules DLD-1 est également responsable de la réduction de leur tumorigénicité puisqu'elle abolit leurs capacités à former des tumeurs après xénogreffes dans des souris « Nudes » [28]. Par conséquent, l'explication proposée par les auteurs est que les cellules DLD-1 surexprimant Ets-1 p42 mourraient avant de pouvoir former des tumeurs dans les souris.

L'impact de l'expression d'Ets-1 p42 sur la survie est également décelable dans d'autres contextes cellulaires. D'une part, un doublement du taux d'apoptose des lymphocytes B et T de la rate est détecté dans des souris transgéniques présentant un ratio Ets-1 p51/Ets-1 p42 en faveur d'Ets-1 p42 [149]. D'autre part, une réduction du taux de survie est décelable après la surexpression d'Ets-1 p42 dans des cellules de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, mais pas dans la lignée moins agressive, MCF-7 [30]. Or, une étude démontre que le promoteur de certains gènes dont celui de l'uPA (« urokinase plasminogène activator ») est mis sous silence par méthylation dans les cellules MCF-7, ce qui inhibe la stimulation induite par Ets-1 [150]. Au contraire, sa déméthylation dans les cellules MDA-MB-231 est favorable

à son activation transcriptionnelle. Ces données suggèrent que l'absence d'effet d'Ets-1 p42 dans les MCF-7 pourrait résulter de l'inaccessibilité de ses sites consensus de liaison à l'ADN.

II-1-2/ Régulation par l'expression de l'isoforme Ets-1 p27

L'auto-inhibition de liaison à l'ADN, source de spécificité d'Ets-1, est également le mécanisme gouvernant la fixation à l'ADN de la nouvelle isoforme Ets-1 p27. Des travaux menés par notre équipe ont montré que cette isoforme est un dominant négatif de la protéine Ets-1 p51 de pleine longueur, qui agit à la fois sur ses propriétés transcriptionnelles et sur sa localisation subcellulaire (Figure 24) [20].

En effet, Ets-1 p27 est incapable d'activer la transcription d'un promoteur cible d'Ets-1 p51, tel que celui de la stromélysine-1. De plus, au niveau de ce promoteur Ets-1 p27 empêche Ets-1 p51 de stimuler la transcription en bloquant l'accès aux EBS (Figure 24B). Ce même effet a été également mis en évidence au niveau du promoteur de la collagénase-1, un gène cible d'Ets-1 p51 activé de façon synergique par Ets-1 p51 et le complexe c-Jun/c-Fos (AP-1) *via* leur fixation coopérative au niveau de l'élément TORU (« TPA oncogene response unit »), composé d'un site EBS adjacent à un site AP-1. Dans ce contexte, l'effet de dominant négatif d'Ets-1 p27 peut provenir de sa capacité à remplacer Ets-1 p51 dans l'interaction avec ses partenaires (Figure 24). De plus, Ets-1 p27 est capable de restreindre l'activité transcriptionnelle d'autres membres de la famille Ets. C'est le cas d'Ets-2 et de Pea-3, protéines auto-inhibées pour leur liaison à l'ADN au niveau du promoteur de la stromélysine-1 [20].

Par ailleurs, Ets-1 p27 est capable de délocaliser la protéine Ets-1 p51 du noyau vers le cytoplasme agissant ainsi comme un dominant négatif de localisation subcellulaire (Figure 24B). En effet, la surexpression individuelle d'Ets-1 p27 a montré une localisation : (1) nucléaire, en accord avec ses propriétés transcriptionnelles et (2) cytoplasmique, laissant les possibilités ouvertes à d'autres fonctions [20]. Par contre, de nombreux travaux décrivent la protéine Ets-1 p51 comme nucléaire, et ce dans des tissus et modèles cellulaires variés [20, 149, 151, 152]. Ets-1 p27 est capable de délocaliser Ets-1 p51, surexprimée dans les cellules ou endogène, du noyau vers le cytoplasme l'empêchant ainsi d'exercer son rôle de régulateur transcriptionnel [20]. Le mécanisme à la base de cette délocalisation n'est pas encore connu. La délocalisation d'Ets-1 p51 a été également décrite au cours de la différenciation érythroïde. En effet, l'expression nucléaire d'Ets-1 p51 dans les progéniteurs précoces est responsable du blocage de la différenciation notamment *via* l'activation du gène *GATA-2*. Sa délocalisation

vers le cytoplasme le prive donc de jouer son rôle transcriptionnel, permettant ainsi l'achèvement de la différenciation érythroïde [153].

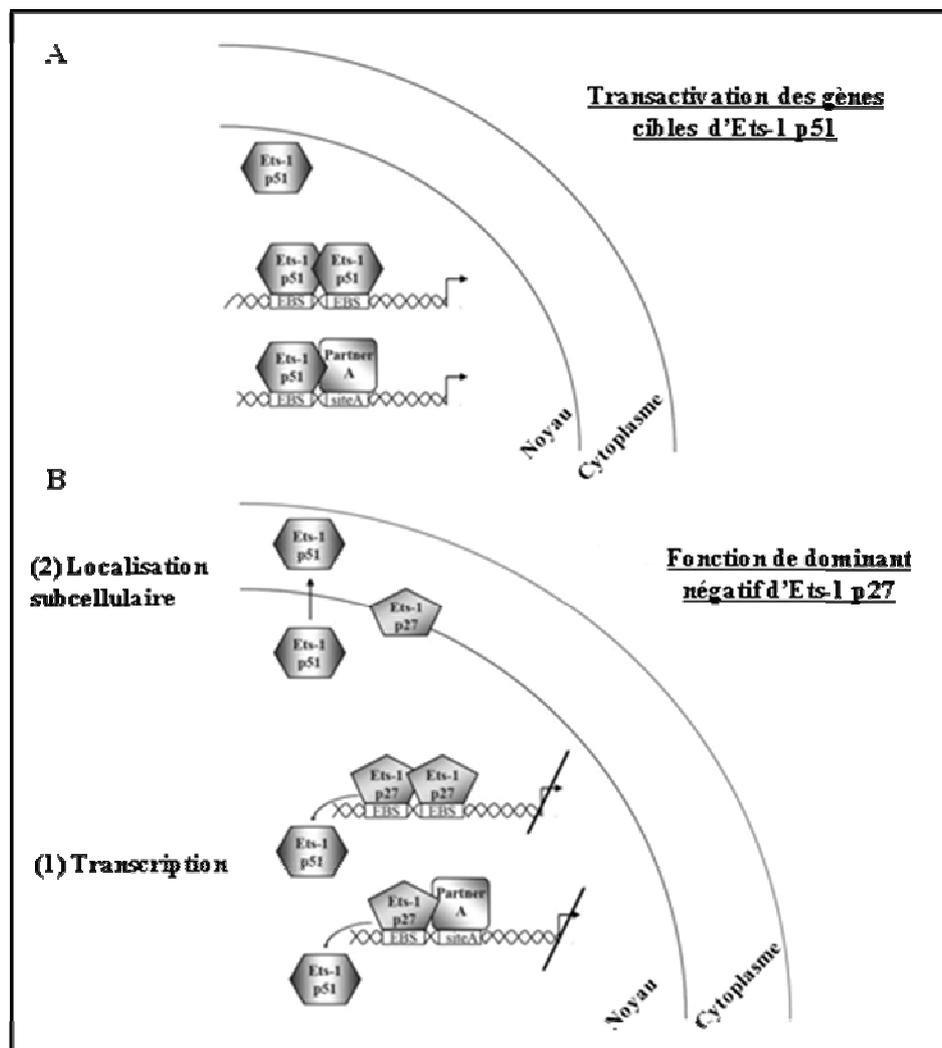


Figure 22 : Modèle de la fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27.

A : Activation transcriptionnelle des gènes cibles d'Ets-1 p51. Pour lever son auto-inhibition de liaison à l'ADN, la protéine nucléaire Ets-1 p51 se fixe sur les promoteurs cibles contenant : (1) des EBS en palindrome espacés de quatre paires de base pour former le complexe ternaire Ets-1 p51-ADN-Ets-1 p51 ou (2) des éléments pour recruter Ets-1 p51 *via* l'interaction avec des partenaires d'interaction. **B** : Fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27. (1) Dominant négatif transcriptionnel. Ets-1 p27 auto-inhibée se lie à l'ADN de la même façon qu'Ets-1 p51, bloquant ainsi l'accès aux EBS à Ets-1 p51. Néanmoins, étant donné qu'elle ne possède pas le domaine Pointed ni le domaine de transactivation, Ets-1 p27 n'a aucun effet sur les promoteurs cibles, bloquant ainsi la transactivation médiée par Ets-1 p51. (2) Dominant négatif de la localisation cellulaire. Ets-1 p27 est capable de délocaliser Ets-1 p51 du noyau vers le cytoplasme. D'après [20].

Dans la même étude réalisée par notre équipe, la surexpression stable d'Ets-1 p27 dans les cellules de carcinome mammaire invasif MDA-MB-231, a permis de :

- (1) réduire l'expression de certains gènes cibles d'Ets-1, confirmant son effet dominant négatif dans ces cellules,

- (2) réprimer le phénotype tumoral de ces cellules en réduisant leurs capacités prolifératives, transformantes et invasives,
- (3) réduire leur tumorigénicité et plus précisément leur capacité à former des tumeurs après xénogreffes chez la souris [20].

La génération par épissage alternatif d'isoformes de la protéine Ets-1 semble donc être un moyen mis en place pour étendre la fonction de ce facteur à d'autres gènes cibles *via* l'isoforme Ets-1 p42 mais aussi pour contrôler de façon négative l'activité de la protéine Ets-1 *via* l'isoforme Ets-1 p27.

II-2/ Régulation par des modifications post-traductionnelles

L'activité d'Ets-1 est régulée au niveau post-traductionnel par diverses modifications qui permettent de moduler ses capacités de liaison à l'ADN, son pouvoir transactivateur ou sa stabilité. Ces modifications sont contrôlées par différentes voies de signalisation cellulaire. La voie principale d'activation d'Ets-1 est celle des Ras-MAPKs qui aboutit à la phosphorylation de la thréonine 38. Quant à la répression de son activité, elle résulte majoritairement de la phosphorylation des résidus sérines dans le domaine codé par l'exon VII en réponse à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. D'autres voies sont également impliquées dans la régulation de l'activité d'Ets-1.

II-2-1/ Activation de la protéine Ets-1

II-2-1-a/ Voie des Ras-MAPKs et phosphorylation de la thréonine 38

La voie des Ras-MAPKs

Les MAPKs, dont les principales sont Erk-1/-2, JNK-1/-2/-3 (« c-Jun N-terminal kinase ») et p38- α - β - γ - δ , sont activées en réponse à une cascade de réactions intracellulaires après stimulation de récepteurs membranaires. De manière générale, les kinases Erk-1/-2 sont activées en réponse aux facteurs de croissance alors que les protéines JNK et p38 le sont plutôt par des cytokines inflammatoires et des stimuli de stress [154, 155].

Dans le cas d'Ets-1, c'est la voie Ras-MAPK Erk-1 qui est responsable de son activation par phosphorylation de la thréonine 38 (voir Chapitre II §IV-1). La transduction d'un signal empruntant cette voie suit le schéma suivant (Figure 25) : la stimulation d'un récepteur de la membrane plasmique induit l'activation de petites GTPases de la famille Ras par l'intermédiaire des protéines Grb2 (« growth factor receptor-binding protein 2 ») et SOS

(« son of sevenless »), facteurs d'échange du nucléotide de Ras. Ainsi, la protéine Ras permute le GDP en GTP, modifiant sa conformation et lui permettant d'interagir avec une série de protéines effectrices dont les kinases Raf (A-Raf, B-Raf et Raf1 ; qui sont des MAP kinase kinase kinases) qu'elle phosphoryle. Une fois activée, la protéine Raf se lie et phosphoryle la protéine Mek (Mek-1 et Mek-2 ; qui sont des MAP kinase kinases) qui, par la suite, en fait de même avec la protéine Erk (Erk-1/-2 ; MAP kinase). Cette dernière est alors transloquée dans le noyau où elle phosphoryle des facteurs de transcription qui stimulent la transcription de leurs gènes cibles [156].

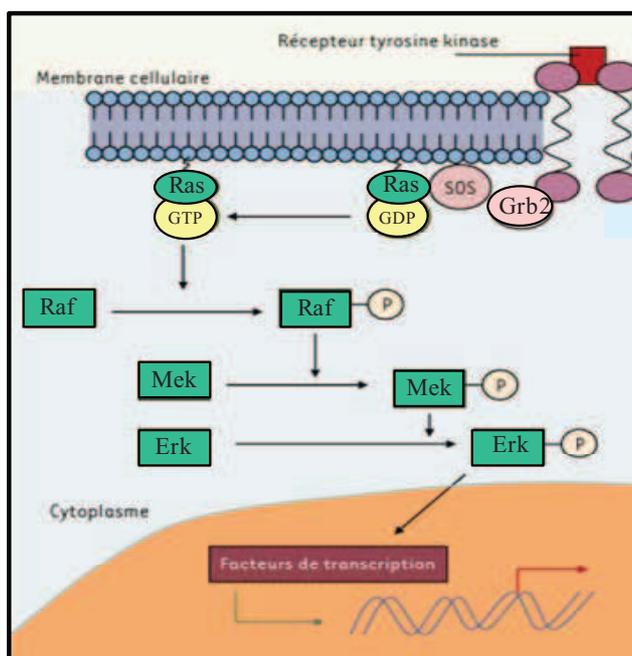


Figure 23 : Voie Ras-MAPK.

Suite à leur activation, les récepteurs membranaires stimulent *via* les protéines Grb2 et SOS la GTPase Ras qui convertit son GDP en GTP. La protéine RasGTP stimule par phosphorylation la protéine Raf qui induit l'activation en cascade de Mek et Erk. La kinase Erk phosphorylée est alors transloquée dans le noyau où elle active des facteurs de transcription. D'après [156].

Activation d'Ets-1 par phosphorylation de la thréonine 38

La voie Ras MAPK est responsable de la phosphorylation d'Ets-1 au niveau de la thréonine 38. De nombreux travaux démontrent que celle-ci a un impact très important sur les capacités transactivatrices d'Ets-1, mais n'affecte pas sa liaison à l'ADN [44, 55]. D'autres études montrent que le facteur de dissémination HGF/SF ou la protéine Ras (qui induisent la phosphorylation des MAPKs Erk-1/-2) stimulent plus fortement l'activité induite par Ets-1 au niveau de divers promoteurs naturels et artificiels qui contiennent des éléments de réponse à Ras, constitués d'un site composite EBS/AP-1 [44, 60]. La simple mutation de cette thréonine 38 suffit à réduire drastiquement la transactivation observée [44].

Des effets similaires ont pu être décrits pour Ets-2, qui possède le même site de phosphorylation et la même séquence plate-forme pour le recrutement des MAPKs Erk-1/-2 [44, 45]. L'activation de la voie de signalisation Ras-Raf-Mek-Erk représente donc un moyen pour des signaux extracellulaires de stimuler rapidement et réversiblement les capacités transactivatrices d'Ets-1 ou d'Ets-2 qui, déjà présents sur des éléments RREs, pourront induire quasi-immédiatement la transcription de nombreux gènes. En particulier, certains gènes codant des protéases qui digèrent la matrice extracellulaire, tels que ceux de l'uPA, de la collagénase-1 et de la gélatinase-B (MMP-9), sont activés au niveau d'éléments RREs par Ets-1 à la suite d'une stimulation de cette voie de signalisation [129, 157].

Par ailleurs, un élément composé exclusivement de deux EBS est aussi capable de répondre à Ras, comme cela est démontré sur des promoteurs artificiels en présence d'Ets-2 [158] et dans des promoteurs naturels tels que celui du gène de la stromélysine-1 [105]. De plus, les kinases Erk-1/-2 sont capables d'induire l'expression d'Ets-1 en réponse à de nombreux signaux (voir Chapitre IV §I-2-1). Il est donc probable qu'Ets-1 active elle-même son propre promoteur au niveau du RRE après phosphorylation de la thréonine 38.

La phosphorylation d'Ets-1 par les kinases Erk-1/-2 est également nécessaire pour stimuler la transcription de gènes cibles en partenariat avec d'autres facteurs. En premier lieu, celle-ci permet une action synergique avec les protéines de la famille AP-1 au niveau des éléments RREs de divers promoteurs, tels que ceux de gènes cités précédemment (*uPA*, *collagénase-1* et *gélatinase-B*) ainsi que celui de l'« enhancer » du virus du polyome [129, 157, 159]. Cette phosphorylation facilite également la coopération transcriptionnelle avec le facteur hypophysaire GHF-1/Pit-1 au niveau d'un RRE non conventionnel, présent dans le promoteur du gène de la prolactine [160, 161]. Dès lors, il se pose la question du mécanisme d'action de cette modification post-traductionnelle sur les capacités transactivatrices d'Ets-1.

Les études structurales menées sur le domaine Pointed et le motif PLLTP d'Ets-1 montrent que la phosphorylation de la thréonine 38 n'induit aucun changement structural [45]. Ces travaux n'ont donc pas permis d'apporter d'éléments relatifs au mécanisme d'action de la phosphorylation d'Ets-1. Néanmoins, grâce à des expériences de chromatographie d'affinité utilisant Ets-1 immobilisée sur une colonne, il a été mis en évidence que les co-activateurs CBP et p300 sont recrutés préférentiellement par la forme phosphorylée d'Ets-1 au niveau de la thréonine 38 [162]. L'activité acétyl-transférase de CBP et p300 est nécessaire à l'activation des promoteurs cibles d'Ets-1 tels que celui du gène de la stromélysine-1 [163]. L'interaction avec CBP et p300 implique le domaine PNT, contenant le motif de phosphorylation ciblé par Erk-1/-2, et le domaine TAD nécessaire à la transactivation des

gènes cibles [44]. Cette étude permet de faire le lien avec des travaux précédents montrant qu'Ets-1 recrute les co-activateurs CBP et p300 afin de transactiver certains de ses gènes cibles [44, 163].

II-2-1-b/ Autres voies

Dans les cellules humaines de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, il a été mis en évidence qu'Ets-1 p51 est phosphorylée par la PKC- α au niveau de la région codée par l'exon VII (voir Chapitre II §IV-1) [30]. La voie de signalisation responsable de cette modification post-traductionnelle est différente de celles rapportées pour les autres kinases ciblant Ets-1. En effet, ni l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et ni les MAPKs Erk-1/-2 ne sont impliquées [30, 63].

Cette phosphorylation permet d'activer Ets-1 p51, au contraire de celle induite par la CaMKII. Ceci est démontré au niveau du promoteur P3 de la PTHrP (« parathyroid-hormone-related protein »), hormone apparentée à l'hormone parathyroïdienne, qui est activée par le TGF- β . En présence de la PKC- α , Ets-1 induit une forte activité de ce promoteur en réponse au TGF- β [30]. Cet effet passe par un accroissement de la synergie transcriptionnelle entre Ets-1 et Smad3 (« Sma- and Mad-related protein 3 »), médiateur nucléaire de la signalisation du TGF- β [30]. Lorsque l'activité de la PKC- α est inhibée, l'activation du promoteur P3 du gène *PTHrP* en réponse au TGF- β est bloquée, et ceci est corrélé à une diminution du taux de protéine Ets-1 p51. De plus, la réduction de l'expression de la PKC- α par ARN interférence entraîne la dégradation d'Ets-1 par le protéasome, sans altérer le taux d'ARNm [63]. Le mécanisme d'action de la phosphorylation d'Ets-1 p51 par la PKC- α pourrait donc être lié à une protection vis-à-vis du protéasome, permettant d'accroître sa stabilité.

II-2-2/ Répression de la protéine Ets-1

II-2-2-a/ La voie Ca^{2+} dépendante et phosphorylation des sérines

La voie Ca^{2+} dépendante

L'augmentation du taux de calcium (Ca^{2+}) cytosolique en réponse à un signal calcique résulte, d'une part, de l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique et d'autre part, de l'activation de récepteurs de la membrane des organites intracellulaires (notamment le réticulum endoplasmique), tels que ceux de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) (Figure 26) [164]. Dans ce dernier cas, le signal calcique stimule les récepteurs couplés aux protéines G de la membrane plasmique qui activent alors la phospholipase C (PLC). Cette enzyme

catalyse l'hydrolyse des phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphates (PIP₂) de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en IP₃. La fixation de l'IP₃ sur ses récepteurs au niveau de la membrane des organites induit le relargage du Ca²⁺ dans le cytosol.

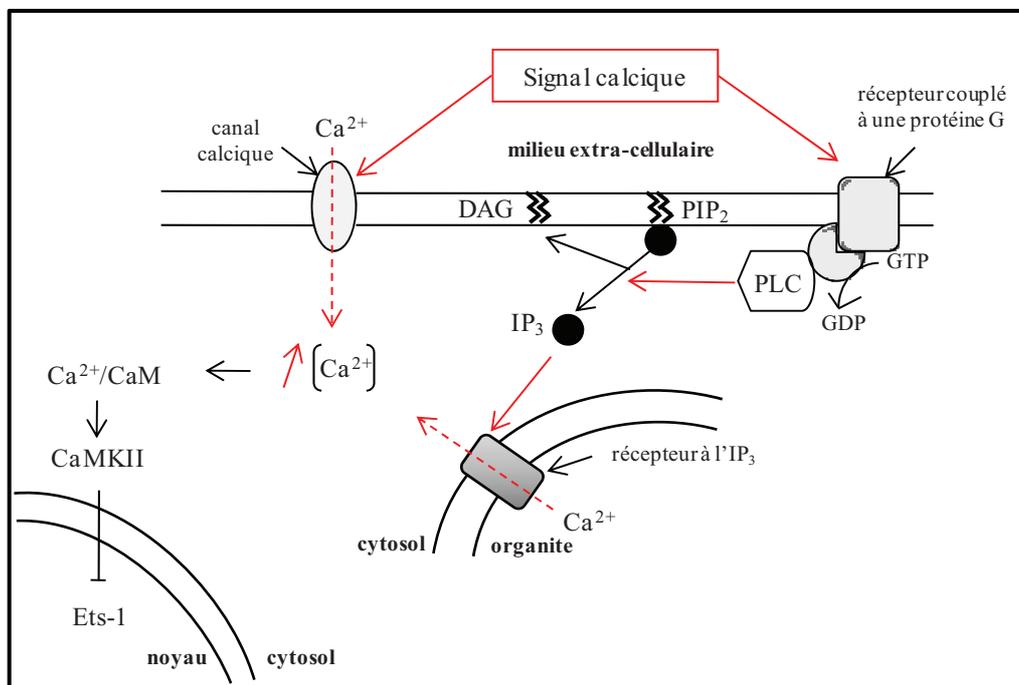


Figure 24 : Activation de la CaMKII par la voie Ca²⁺ dépendante.

Suite à un signal calcique, les canaux calciques de la membrane s'ouvrent permettant l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule. De plus, les récepteurs couplés aux protéines G sont activés. Ils stimulent la PLC qui hydrolyse les PIP₂ de la membrane en DAG et en IP₃. L'IP₃, en se fixant sur ses récepteurs à la membrane des organites, induit le relargage du Ca²⁺ dans le cytosol. Le calcium intracellulaire, dont la concentration augmente en réponse au signal calcique, s'associe à la calmoduline (CaM) pour activer la CaMKII. Celle-ci est responsable de l'inhibition de l'activité d'Ets-1. Les flèches rouges pleines représentent la cascade d'activation en réponse au signal et celles en pointillées, les flux de calcium. D'après [164].

Répression d'Ets-1 par phosphorylation des sérines

Dans le cadre de la régulation d'Ets-1, le calcium est pris en charge par la calmoduline (CaM) pour former le complexe Ca²⁺/CaM. Celui-ci interagit avec la CaMKII qui s'active alors par auto-phosphorylation [165, 166]. La CaMKII est ensuite transloquée dans le noyau pour inhiber l'activité d'Ets-1 en induisant la phosphorylation de sa région riche en sérines dans le domaine codé par l'exon VII (voir Chapitre II §IV-1).

Des travaux menés sur des lymphocytes T et B ont permis de détecter, grâce à des anticorps spécifiques, la protéine Ets-1 p51 sous sa forme phosphorylée au niveau du domaine codé par l'exon VII suite à l'activation de la CaMKII. Celle-ci résulte de l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire suite à la liaison d'anticorps au niveau des récepteurs spécifiques des lymphocytes T et B [26, 27, 167]. Néanmoins, aucune forme phosphorylée d'Ets-1 p42 n'est mise en évidence dans ces conditions, du fait de l'absence de la région

codée par l'exon VII. Ceci signifie que les signaux capables d'activer la CaMKII auront une action différentielle sur les deux isoformes d'Ets-1, en inhibant spécifiquement l'action d'Ets-1 p51. Etant insensible à ce type de phosphorylation, Ets-1 p42 pourra agir de façon indépendante sans interférer avec Ets-1 p51, et ce malgré sa faible expression.

Cette modification post-traductionnelle en réponse au calcium est responsable du renforcement de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51 et donc d'une répression de son activité transcriptionnelle (voir Chapitre III §III-1) [55]. L'impact négatif de ce type de phosphorylation sur la liaison à l'ADN a pu être mis en évidence dans un contexte cellulaire, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), au niveau du promoteur du GM-CSF (« granulocyte macrophage-colony stimulating factor ») [133]. Il en résulte une réduction de l'activité du promoteur induite par Ets-1 p51. D'ailleurs, la mutation des sérines phosphorylables d'Ets-1 p51 entraîne une augmentation de l'activité du promoteur du GM-CSF de plus de 3 fois en présence de CaMKII, associée à une fixation accrue d'Ets-1 au niveau de ce promoteur [133]. De plus, l'action de la CaMKII inhibe la synergie transcriptionnelle entre Ets-1 et AML-1 au niveau du promoteur du GM-CSF [133]. Ceci pourrait s'expliquer par un blocage de la fixation coopérative de ces protéines, devenues incapables d'induire la levée mutuelle de leur auto-inhibition de liaison à l'ADN (voir Chapitre III §III-2-1-b). Des travaux menés au sein de notre équipe démontrent que la phosphorylation par la CaMKII empêche également la fixation coopérative d'Ets-1 p51 au niveau des EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 [107]. Dans ces conditions, le renforcement de la structure auto-inhibée de chaque molécule va à l'encontre de la levée mutuelle de l'auto-inhibition observée en absence de cette kinase [107].

II-2-2-b/ Régulation par sumoylation, acétylation et ubiquitination

Sumoylation

Certains signaux tels que le stress oxydant causé par H₂O₂ activent des voies de signalisation induisant la sumoylation d'Ets-1 (voir Chapitre II §IV-2-2) [72]. Cette modification post-traductionnelle d'Ets-1 réduit son pouvoir transactivateur. Ceci a été caractérisé sur divers promoteurs artificiels et naturels [72, 73, 107]. En effet, la mutation des lysines modifiées ou l'utilisation d'une enzyme de désomoylation, telle que SENP-1 sont responsables d'un accroissement des capacités activatrices d'Ets-1 au niveau de ces promoteurs. Les mécanismes sous-jacents restent inconnus à ce jour. Néanmoins, il est envisageable que la fixation d'une protéine SUMO de 10 kDa à proximité d'un site crucial pour l'interaction avec les co-activateurs CBP et p300 puisse créer une gêne stérique

empêchant leur recrutement. Une autre possibilité est la formation de complexes avec des co-répresseurs, tels que des histones désacétylases (ou HDACs), par l'intermédiaire des protéines SUMO comme cela est démontré pour d'autres facteurs de transcription [77].

Acétylation

En réponse au TGF- β dans les fibroblastes du derme, la protéine Ets-1 est acétylée sur des résidus non identifiés induisant un relargage des co-activateurs CBP et p300 (voir Chapitre II §IV-3). De façon surprenante, ceci conduit à l'augmentation de l'expression de certains gènes, tels que ceux des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 1$ du collagène de type I (ou collagène $\alpha 2(I)$ et $\alpha 1(I)$) [79]. Il s'avère en fait que ces gènes ne sont pas des cibles directes d'Ets-1 mais de Smad3, un autre facteur activé par le TGF- β [79]. Des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits de fibroblastes de derme montrent que le relargage de CBP et de p300 par Ets-1 acétylée est concomitant à leur recrutement par Smad3 qui peut alors stimuler leur expression. De plus, la surexpression d'Ets-1 bloque l'activation des promoteurs du collagène $\alpha 2(I)$ et $\alpha 1(I)$ induite par le TGF- β , et ce en interférant avec l'action de p300 [79]. Par conséquent, il existe une compétition entre Ets-1 et Smad3 pour les co-activateurs CBP et p300. En absence de signaux, tels que le TGF- β , Ets-1 recrute CBP et p300 afin d'activer ses gènes cibles, tels que la collagénase-1. Par contre, en présence de TGF- β , Ets-1 libère ces facteurs sous l'effet de l'acétylation et ce au profit de Smad3 qui pourra alors activer ses gènes cibles, tels que ceux du collagène $\alpha 2(I)$ et $\alpha 1(I)$. Il est important de noter que dans ce contexte particulier des fibroblastes de derme, Ets-1 et Smad3 possèdent des rôles antagonistes à l'inverse de la coopérativité transcriptionnelle mise en évidence dans des cellules de carcinome mammaire invasif sur un promoteur différent, le promoteur P3 du gène de la PTHrP (voir Chapitre IV §II-2-1-b).

Ubiquitination

Parmi les modifications post-traductionnelles responsables de la régulation d'Ets-1, son ubiquitination correspond à un signal de dégradation par le protéasome. La protéine PIASy, enzyme E3 d'activation pour la sumoylation (voir Chapitre II §IV-2-2), protège Ets-1 de la dégradation par le protéasome sans réduire son niveau d'ubiquitination et de façon indépendante de sa sumoylation [76].

II-3/ Régulation par des partenaires protéiques

Les interactions protéine-protéine sont impliquées dans chaque étape de la signalisation cellulaire. Elles régulent la réception du signal cellulaire, la sélection des gènes cibles, la fixation à l'ADN et l'activité transcriptionnelle.

L'activité de régulateur transcriptionnel d'Ets-1 est modulée par interaction physique et fonctionnelle avec une variété de facteurs de transcription, des kinases et des acétyltransférases. La majorité de ces partenaires protéiques interagissent directement avec le domaine ETS de liaison à l'ADN (Figure 27). D'autres interagissent avec le domaine de transactivation, la partie N-terminale comprenant le domaine Pointed ou la région codée par l'exon VII.

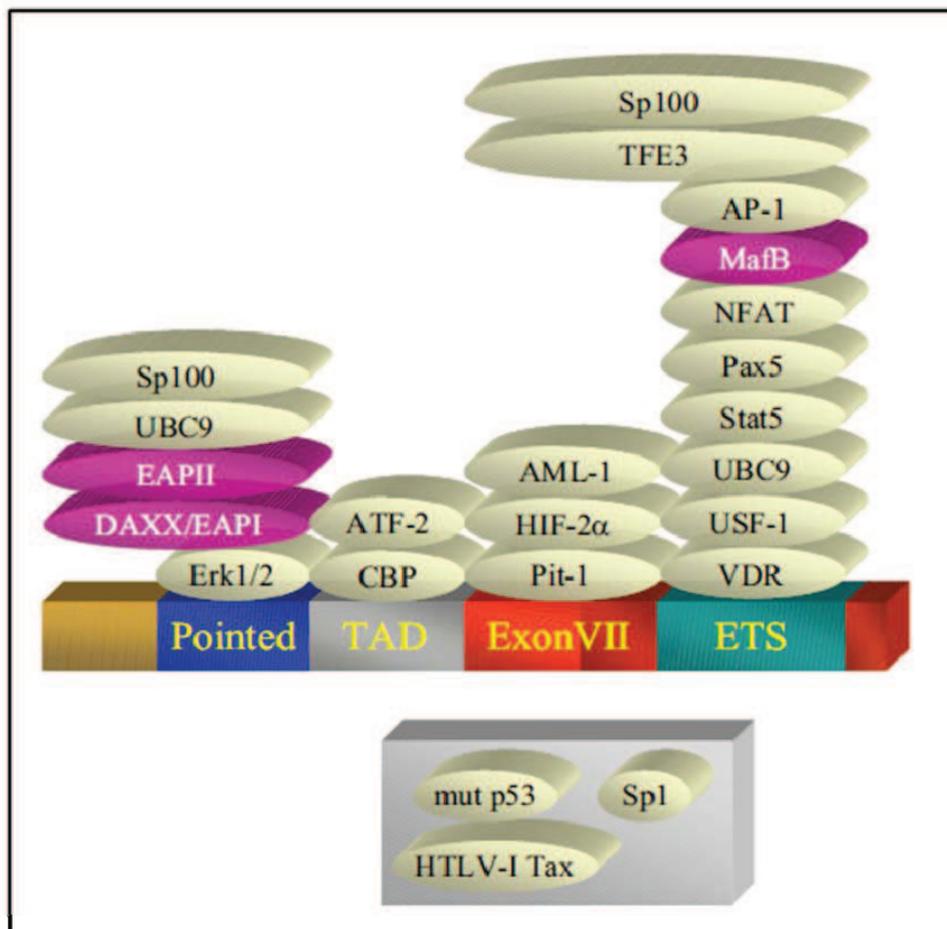


Figure 25 : Schéma représentant les partenaires d'interaction connus d'Ets-1 (liste non exhaustive).

Ets-1 p51 interagit avec divers partenaires protéiques représentés au niveau du domaine protéique avec lequel ils interagissent. Les protéines qui interagissent avec Ets-1 de façon coopérative pour activer les gènes cibles sont représentées en gris. Les protéines qui répriment l'activité d'Ets-1 ou qui agissent en synergie avec Ets-1 pour réprimer l'activation des gènes cibles sont représentées en rose. Les protéines présentées dans l'encadré sont des protéines dont les sites spécifiques de fixation n'ont pas encore été mis en évidence. Les domaines protéiques d'Ets-1 sont indiqués en bleu pour le domaine PNT, en gris pour le domaine TAD, en rouge pour le domaine codé par l'exon VII et en vert pour le domaine ETS. D'après [168].

II-3-1/ Facteurs de transcription activateurs d'Ets-1

Beaucoup de facteurs de transcription ont leurs sites de liaison à l'ADN adjacents à des EBS. L'interaction combinatoire entre Ets-1 et ces facteurs de transcription au niveau de leurs éléments de réponse permet de contrôler la transcription de nombreux gènes de façon spécifique dans certains tissus. Dans ce contexte, différents facteurs de transcription ont pu être mis en évidence (Tableau 4).

Partenaires d'interaction	Gènes de réponse	Domaine d'interaction	Références
AML-1	<i>TCRα</i> , <i>TCRβ</i> , <i>ostéopontine</i>	Exon VII	[95, 169-171]
HIF-2 α	<i>Flk-1</i> , <i>VE-cadherine</i>	Exon VII	[172, 173]
GHF-1/Pit-1	<i>prolactine</i>	Exon VII	[51, 52, 174]
AP-1 (c-Fos/c-Jun)	<i>collagénase-1</i> , <i>ctromélysine-1</i> , <i>TIMP-1</i>	ETS	[46, 104, 105, 159, 175-177]
TFE-3	Gène codant les chaînes lourdes des I μ	ETS, domaine inhibiteur N-terminal	[97]
Pax-5	<i>mb-1</i>	ETS	[53, 178, 179]
NF κ B	<i>HIV-LTR</i>	ETS	[180]
USF-1	<i>HIV-LTR</i> , <i>DOR</i>	ETS	[101, 181]
Tax-1	<i>HTLV-1-EER-1</i> , <i>IL-5</i> , <i>PTHrP</i>	Non connu	[182, 183]
Sp1	<i>FasL</i> , <i>PTHrP</i> , <i>HTLV-1- EER-1</i> , <i>MRG-1</i>	Non connu	[184-187]
C/EBP α	<i>EOS47</i>	Non connu	[181]
VDR, ER α	<i>prolactine</i>	ETS	[188]
PPAR α et AR	-	Non connu	[188, 189]
p53 mutée	<i>MDR-1</i>	Non connu	[190]

Tableau 4 : Partenaires protéiques coopérant avec Ets-1 pour l'activation de gènes cibles.

II-3-1-a/ AML-1 (appelée également PEBP2 α , CBF α 2 ou Runx-2)

Interaction dans la régulation du gène de TCR α et de TCR β

Le rôle d'Ets-1 dans la différenciation des lymphocytes T est à relier à sa capacité de réguler des gènes codant les chaînes α et β du TCR dans les pré-lymphocytes T. La synthèse de ces chaînes joue un rôle fondamental dans leur maturation. Au niveau moléculaire, Ets-1 et

AML-1 (aussi nommée PEBP2 α (« polyomavirus enhancer binding protein 2 α »), CBF α 2 (« core binding factor α 2») ou Runx-2 (« Runt-related transcription factor-2 »)), protéine de la famille Runt spécifique des cellules T [191], se lie de façon coopérative au niveau de leurs sites adjacents présents sur l'« enhancer » du gène de la chaîne α du TCR. Cette interaction permet une levée mutuelle de leur auto-inhibition de liaison à l'ADN, formant ainsi un complexe trimérique avec le dimère AML-1 (PEBP2 α sur la Figure 28) [169].

Néanmoins, ce complexe est incapable d'activer l'« enhancer » étant donné qu'il est instable. Pour augmenter sa stabilité, Ets-1 recrute une troisième protéine ATF/CREB (« activating transcription factor/CREB») qui se fixe sur un site non-adjacent présent sur l'autre extrémité de l'« enhancer » (Figure 28). L'interaction avec cette protéine dépend d'une quatrième protéine, LEF-1 (« lymphocyte enhancer factor-1 »), un facteur de transcription spécifique de l'hématopoïèse qui, en se fixant au milieu de l'« enhancer », induit une courbure de l'ADN pour rapprocher Ets-1 d'ATF/CREB facilitant ainsi leur interaction (Figure 28). Ceci génère un grand complexe nucléoprotéique nécessaire pour activer l'« enhancer » du gène de TCR α [169].

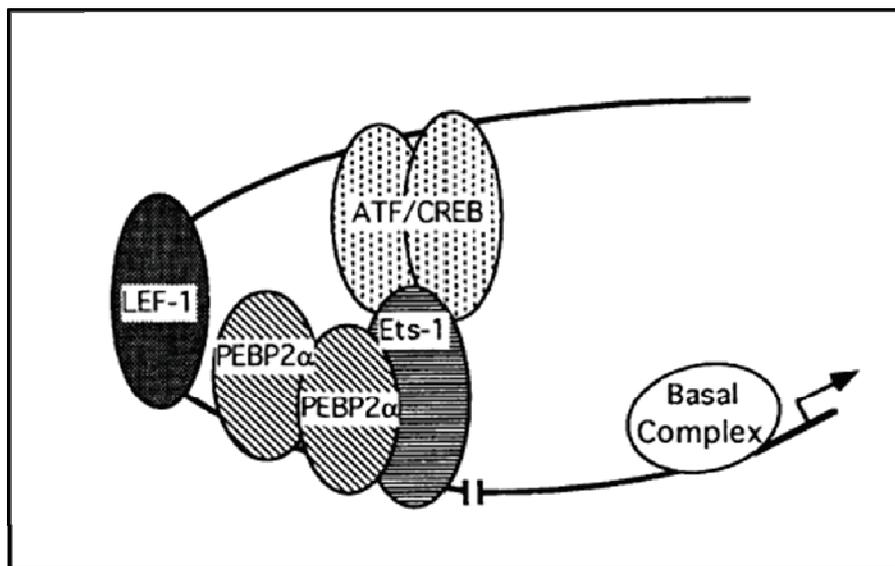


Figure 26 : Modèle du complexe multiprotéique formé au niveau de l'« enhancer » du gène de TCR α . LEF-1 qui induit une courbure de l'ADN augmente la fixation du complexe PEBP2 α -Ets-1 sur leurs sites *via* l'interaction avec la protéine ATF/CREB. Ceci permet l'assemblage d'un grand complexe multiprotéique nécessaire pour la transactivation du gène de TCR α . D'après [169].

Quant à l'« enhancer » de la chaîne β du TCR, son activité est contrôlée par la coopération d'Ets-1 avec AML-1 comme décrit dans le Chapitre III §III-2-1-b [95, 170].

Interaction dans la régulation du gène de l'ostéopontine

Dans un autre contexte, Ets-1 agit en synergie avec le facteur de transcription AML-1, *via* leurs domaines de liaison à l'ADN, pour activer la transcription du gène de l'ostéopontine dans les cellules ostéoblastiques, MC3T3-E1 [171]. L'ostéopontine est une glycoprotéine sécrétée par de nombreux types cellulaires et qui joue un rôle dans des processus variés comme la morphogenèse de l'os, l'activation de cellules immunitaires et la cancérisation. Dans les cellules de cancer colorectal, CT-26, Ets-1 agit également en synergie avec AML-1, pour activer la transcription du gène de l'ostéopontine [150]. L'expression de l'ostéopontine dans les cellules CT-26 leur permet de former des métastases hépatiques [150].

II-3-1-b/ HIF-2 α

Ets-1 est impliquée dans la régulation du gène *Flk-1* (« fetal liver kinase-1 ») codant VEGF-2, un récepteur tyrosine kinase co-exprimé avec Ets-1 notamment au cours de l'angiogenèse embryonnaire et tumorale [192]. Cette régulation nécessite une interaction coopérative entre Ets-1 et HIF-2 α , facteur de transcription spécifique de l'hypoxie, au niveau de leurs éléments de réponse présents dans le promoteur du gène *Flk-1*. Cette action synergique entre Ets-1 et HIF-2 α , impliquant le domaine codée par l'exon VII d'Ets-1, induit une transactivation optimale du gène dans les cellules endothéliales [193]. Ets-1 agit également en synergie avec le facteur de transcription du groupe Forkhead, Foxo-1, pour activer l'expression du gène *Flk-1* [172].

Une autre étude a montré qu'Ets-1 induit, en synergie avec HIF-2 α , la transactivation du gène de la VE-cadherine, qui code une protéine transmembranaire permettant l'adhésion intercellulaire [173]. Cette synergie résulte très probablement d'une interaction physique entre les deux protéines, comme mis en évidence dans la régulation du gène *Flk-1*.

II-3-1-c/ GHF-1/Pit-1

Ets-1 régule l'expression de la prolactine, neurohormone peptidique agissant au niveau de récepteurs situés à la surface des cellules de la glande mammaire, des ovaires, des testicules et de l'utérus. La prolactine est sécrétée majoritairement par les cellules de l'antéhypophyse, mais aussi par les cellules déciduales de la muqueuse utérine [194].

La relation entre Ets-1 et la prolactine est illustrée dans les cellules pituitaires de rat, GH4, dans lesquelles le blocage des propriétés d'Ets-1 (induit par l'utilisation d'un dominant négatif) réduit le niveau d'expression intracellulaire de la prolactine et sa sécrétion dans le

milieu extracellulaire [195]. Cette relation résulte très probablement de la régulation directe du gène de la prolactine par Ets-1, comme mis en évidence dans d'autres travaux.

En effet, une étude montre qu'Ets-1 active le promoteur du gène de la prolactine de rat et ceci en coopération avec GHF-1/Pit-1. Le promoteur de ce gène contient un site composite EBS/Pit-1, qui recrute Ets-1 préférentiellement à GABP α , une autre protéine Ets [174]. Il a pu être montré qu'Ets-1 interagit avec GHF-1/Pit-1, *via* une région de 70 acides aminés contenant le domaine codé par l'exon VII et la partie C-terminale de son domaine transactivateur, alors qu'Ets-2 en est incapable [51, 52].

II-3-1-d/ AP-1 (c-Fos/c-Jun)

De nombreux travaux démontrent qu'Ets-1 active les gènes des métalloprotéases matricielles, tels que ceux de la collagénase-1, de la stromélysine-1, de la gélatinase-B, mais aussi ceux de la gélatinase-A (MMP-2) et de la collagénase-3 (MMP-13). Au sein des promoteurs des gènes codant les MMPs, les EBS sont souvent associés à un site AP-1 de façon à former des unités de réponse à la voie Ras, connues sous le nom de RRE.

Dans les cellules T humaines, Ets-1 interagit directement avec AP-1. Cette interaction met en jeu le domaine basique de Jun et le domaine ETS de liaison à l'ADN d'Ets-1. Jun, en interaction avec Ets-1, est alors capable de recruter Fos pour former un complexe trimérique. Cette interaction physique entre Ets-1 et AP-1 est nécessaire pour activer les gènes cibles dont le promoteur contient le site composite EBS/AP-1 [175].

Interaction dans la régulation du gène de la collagénase-1

Au niveau des cellules endothéliales humaines, une étude montre que la répression d'Ets-1 (induite par l'utilisation d'ARN anti-sens spécifiques) réduit l'expression de la collagénase-1 en réponse à des facteurs angiogéniques [131, 196]. De plus, une diminution conjointe de l'expression d'Ets-1 et de la collagénase-1 est détectée dans des cellules du ligament périodontal humain, HPDL, suite au traitement avec un antibiotique, la roxithromycine, qui interfère avec l'activation induite par le TNF- α [197]. Certains mécanismes à la base de la régulation de la collagénase-1 par Ets-1 ont pu être disséqués. Au niveau moléculaire, Ets-1 est capable de réguler de façon directe l'expression du gène de la collagénase-1. Cette régulation peut être modulée par les partenaires protéiques d'Ets-1. En effet, le promoteur du gène de la collagénase-1 est transactivé par Ets-1 seule ou en coopération avec c-Jun [176]. La synergie transcriptionnelle avec c-Jun s'effectue *via* un élément de réponse à Ras, RRE, présent dans le promoteur de ce gène [46, 159].

Interaction dans la régulation du gène de la stromélysine-1

La protéine Ets-1 est détectée de façon simultanée à celle de la stromélysine-1 dans des contextes cellulaires variés, tels que dans les cellules de mélanome humain [198], dans les cellules endothéliales murines, MSS31 [171] et dans des fibroblastes synoviaux de lapin, HIG-82 [108]. La régulation de l'expression du gène de la stromélysine-1 par Ets-1 est particulière puisqu'il existe au sein de son promoteur deux EBS organisés en palindrome et séparés par quatre paires de bases (voir Chapitre III §III-2-2) [105]. Cette configuration n'est présente dans aucun autre promoteur des MMPs [199]. Des études démontrent qu'Ets-1 et Ets-2 ont la capacité d'activer le promoteur *via* ces EBS en palindrome. De façon plus précise, des travaux menés par notre équipe ont mis en évidence que les trois isoformes humaines d'Ets-1 (Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27) ne présentent pas les mêmes capacités transactivatrices au niveau de ces sites. Ainsi, l'isoforme Ets-1 p51 induit une forte stimulation du promoteur qui résulte d'une synergie transcriptionnelle entre deux molécules formant un complexe ternaire avec l'ADN (voir Chapitre III §III-2-2), alors que l'isoforme Ets-1 p42 n'a qu'un faible pouvoir transactivateur (voir Chapitre III §IV) [107]. Quant à Ets-1 p27, elle inhibe l'effet transactivateur d'Ets-1 p51 en rentrant en compétition avec elle pour sa fixation au niveau des EBS en palindrome du promoteur de la stromélysine-1.

En plus des EBS en palindrome, le promoteur du gène de la stromélysine-1 contient un élément de réponse à Ras, RRE. Les protéines Ets-1 et Ets-2 peuvent participer à une synergie transcriptionnelle avec c-Fos/c-Jun au niveau de ce RRE [104, 105]. Il est également à noter que l'activation de la transcription induite par Ets-1 et Ets-2 passe par le recrutement des co-activateurs CBP et p300 comme décrit dans le §II-2-1-a de ce Chapitre [163].

Interaction dans la régulation du gène de TIMP-1

Les TIMPs (« tissue inhibitor of metalloproteinases ») sont des inhibiteurs de métalloprotéases matricielles. Il en existe quatre, désignés TIMP-1 à TIMP-4. Le gène *TIMP-1* est activé par Ets-1 en synergie avec c-Fos/c-Jun. Ceci nécessite une interaction physique *via* le domaine ETS de liaison à l'ADN d'Ets-1 [177].

L'action synergique entre Ets-1 et AP-1 a été mis en évidence au niveau d'autres gènes que ceux des MMPs, tels que les gènes du GM-CSF [200] et de l'« enhancer » de polyome [159].

II-3-1-e/ TFE-3

Ets-1 régule le gène codant les chaînes lourdes des immunoglobulines μ (Ig μ) qui sont cruciales pour la différenciation cellulaire. Des travaux démontrent que l'« enhancer » de ce gène est activé par Ets-1 de concert avec TFE-3 et Pu-1, membre de la famille Ets. Ces trois facteurs se fixent au niveau de sites spécifiques dans l'« enhancer » dénommés μ A pour Ets-1, μ B pour Pu-1 et μ E3 pour TFE-3. De façon plus précise, TFE-3 interagit physiquement avec Ets-1 et pas avec Pu-1, ce qui augmente l'affinité pour la liaison à l'ADN d'Ets-1. Cette interaction implique deux domaines d'Ets-1 : le domaine ETS de liaison à l'ADN et le domaine inhibiteur N-terminal. Ceci induit la levée de l'auto-inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1 et donc sa fixation au niveau du site μ A en synergie avec TFE-3 [97].

II-3-1-f/ Pax-5

Ets-1 active de façon directe la transcription du gène *mb-1*, codant la chaîne α du récepteur des lymphocytes B, nécessaire à leur développement [98]. C'est l'interaction d'Ets-1 *via* son domaine de liaison à l'ADN avec Pax-5, facteur spécifique et précoce des cellules B, qui facilite son recrutement au niveau d'un site composite présent dans le promoteur du gène *mb-1* comme décrit dans le Chapitre III §III-2-1-a [53, 178, 179].

II-3-1-g/ NF κ B et USF-1

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH, HIV en anglais) est un rétrovirus qui infecte les cellules humaines par l'intermédiaire du marqueur membranaire CD4 qui est reconnu par la glycoprotéine gp120 du VIH. Ainsi, les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales qui possèdent ce marqueur peuvent être infectées par le VIH. Il existe deux types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2.

La transcription des gènes viraux dans la cellule infectée est sous le contrôle d'un « enhancer », désignée LTR (« long terminal repeat »). Une étude menée sur des cellules T montre qu'Ets-1 est recrutée au niveau du LTR du VIH-1 dans une région, dite U3, nécessaire à la croissance virale *in vitro* [201]. La régulation de la transcription des gènes viraux du VIH par Ets-1 implique des partenaires protéiques, notamment :

(1) le facteur NF κ B. Ils agissent de façon coopérative au niveau de leurs sites présents dans les « enhancers » des VIH-1 et VIH-2 [180]. Cette régulation nécessite l'interaction

d'Ets-1 *via* son domaine ETS avec NFκB *via* son domaine RelHD (« 300-amino-acid Rel homology domain ») en présence d'ADN [180],

(2) le facteur USF-1. Ils transactivent de façon synergique l'« enhancer » du VIH-1. Cet effet résulte de la formation d'un complexe comprenant Ets-1 et USF-1 recrutées au niveau de leur site composite EBS/E-box [181]. Dans ce cas, l'interaction entre Ets-1 et USF-1 implique leur domaine de liaison à l'ADN respectif [181].

Il est à noter que la protéine USF-1 agit également en synergie avec Ets-1 pour activer la transcription du gène du récepteur aux opioïdes δ, DOR (« delta-opioid receptor ») [101]. Ceci suggère la liaison coopérative d'Ets-1 et d'USF-1 au niveau de leurs éléments de réponse adjacents EBS/E-box présents sur le promoteur de ce gène [97].

II-3-1-h/ Tax-1 et Sp1

Le virus T-lymphotropique humain (HTLV-1) (« human T-cell lymphotropic virus type-1 ») est le premier rétrovirus infectant l'homme à avoir été découvert. Il est responsable du déclenchement de divers cancers notamment des leucémies et des lymphomes.

Le LTR du HTLV-1 contient deux éléments activateurs de réponse à Ets-1. L'un d'entre eux, désigné EER-1, contient des EBS recrutant la protéine Ets-1 [202]. Ets-1 et Ets-2 sont capables de transactiver l'« enhancer » de ce virus en agissant au niveau de cette région EER-1. Celle-ci contient également un élément de réponse à Tax-1 (« transactivator of pX-1 »), facteur codé par le virus HTLV lui-même [27]. D'ailleurs, une étude démontre l'existence d'une synergie d'action entre Ets-1 et Tax-1 au niveau d'un site composite appartenant à cet EER-1 pour stimuler l'« enhancer » de ce virus [182].

Il est à noter que la coopération entre Ets-1 et Tax-1 est également décrite dans le contexte de l'activation du gène de l'IL-5. Cette synergie résulte très probablement de l'interaction physique entre Ets-1 et Tax-1.

Cette interaction a pu être mise en évidence dans le cadre de la régulation de l'expression du gène de PTHrP, codant une protéine qui agit de façon autocrine et paracrine *via* les récepteurs à l'hormone thyroïdienne. En effet, le promoteur de ce gène contient des sites de fixation d'Ets-1 et du facteur à doigt de zinc Sp1. Ets-1 interagit en synergie avec Sp1 au niveau de leurs éléments de réponse pour activer la transcription du gène de PTHrP (voir le §II-3-1-i de ce Chapitre). Néanmoins, une étude a montré que Tax-1 est importante pour une transactivation optimale du gène, et ce *via* son interaction physique avec Ets-1. Ceci facilite l'interaction d'Ets-1 avec Sp1 au niveau de leurs éléments de réponse et donc la formation d'un complexe transcriptionnel nécessaire pour l'expression du gène PTHrP [182, 183].

L'interaction d'Ets-1 avec Sp1 a été également mise en évidence dans les cellules SVMC pour activer l'expression du gène *FasL* (« Fas ligand »), codant le ligand Fas qui active le récepteur Fas pour transmettre un signal de mort intracellulaire. Ces deux protéines interagissent de façon coopérative au niveau d'un site composite constitué du consensus de liaison de chacune de ces protéines [184].

Sp1 agit également en synergie avec Ets-1 pour activer la transcription du gène de la PTHrP [185], de HTLV-1-EER-1 [186] et de MRG-1 (« MSG1 (« melanocyte-specific gene-1 »)-related gene-1 ») [187].

II-3-1-i/ C/EBP α

Chez le poulet, le gène codant l'antigène EOS47, un marqueur précoce et spécifique de la différenciation des éosinophiles, est activé de façon synergique par les facteurs de transcription Ets-1 et C/EBP α (« CCAAT/enhancer binding protein α ») au niveau d'un site composite constitué du consensus de liaison de chacun de ces facteurs [181]. Cette interaction est médiée par les domaines de liaison à l'ADN des deux protéines, à savoir le domaine ETS pour Ets-1 et le domaine BR-LZ (« basic region-leucine zipper») pour C/EBP α .

II-3-1-j/ Récepteurs nucléaires : VDR, ER α , PPAR α et AR

En présence d'Ets-1, le récepteur nucléaire à la vitamine D (VDR pour « vitamin D receptor ») active le promoteur du gène de la prolactine au niveau de son élément de réponse VDRE (« vitamin D response element »), et ceci de façon indépendante de son ligand. Cette stimulation nécessite l'interaction du VDR avec Ets-1 *via* leurs domaines de liaison à l'ADN respectifs. La capacité du VDR à agir de façon indépendante de son ligand résulte de changements conformationnels activateurs induits par l'interaction avec Ets-1 [188].

Un tel effet d'Ets-1 est également détecté avec le récepteur α à l'œstradiol (ER α pour « estradiol receptor α »). En présence d'Ets-1, l'ER α stimule la transcription du promoteur du gène de la prolactine de façon indépendante de l'œstradiol au niveau de son site de réponse ERE (« estradiol response element ») [188]. Il s'avère qu'Ets-1 est également capable d'interagir avec d'autres récepteurs nucléaires tels que PPAR α [188] et le récepteur aux androgènes AR (« androgen receptor ») [189]. Néanmoins, l'effet de cette interaction sur leurs propriétés transcriptionnelles n'a pas encore été étudié.

De façon très intéressante, l'ensemble de ces données suggère l'existence d'un nouveau mécanisme d'activation des récepteurs nucléaires en absence de leurs ligands grâce à l'interaction avec Ets-1 [188].

II-3-1-k/p53 mutée

La protéine p53 est un facteur de transcription qui se fixe de manière spécifique sur les régions régulatrices de gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération cellulaire. La forme mutée de p53 agit en synergie avec Ets-1 pour activer l'expression du gène de MDR-1 (« multi drug resistance-1 »), une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans les échanges entre la MEC et le milieu intracellulaire [190]. L'expression de MDR-1 bloque l'apoptose cellulaire induite par des drogues utilisées en chimio-thérapie [187, 203, 204]. Des expériences de GST pull-down *in vitro* et de co-immunoprécipitation dans la cellule ont montré qu'Ets-1 interagit physiquement avec p53 mutée [190]. La protéine p53 sauvage est incapable de stimuler ce promoteur, ce qui est en corrélation avec sa fonction de « gardien du génome ».

De nombreuses études ont mis en évidence une action synergique entre Ets-1 et une autre protéine pour réguler l'expression des gènes cibles d'Ets-1. Néanmoins, aucune interaction physique n'a été mise en évidence. C'est l'exemple de :

- la transactivation du gène de la cycline D1 par Ets-1 en synergie avec HIF-1 α [171].
- la transactivation des gènes cibles spécifiques de la différenciation myéloïde par Ets-1 en synergie avec le facteur de transcription GATA-1 sur un site composite EBS/GATA [153, 205, 206]
- la transactivation du gène de l'angiopoïétine II en synergie avec GATA-2 [207].
- la transactivation du gène de la PTHrP en synergie avec la protéine Smad3 [30].
- la transactivation du gène de la sous-unité α 4 des intégrines par Ets-1 en synergie avec c-Myb *via* leurs sites consensus respectifs présents dans le promoteur de ce gène. Dans les cellules hématopoïétiques, la stimulation de ce promoteur induite par Ets-1 seule est réprimée par ZEB, facteur de différenciation tissulaire. Néanmoins, l'effet transactivateur synergique d'Ets-1 et de c-Myb n'est pas affectée par le facteur ZEB [208, 209].

II-3-2/ Partenaires répresseurs de l'activité d'Ets-1

L'effet activateur d'Ets-1 p51 peut être inversé par l'interaction avec des partenaires protéiques, et ce dans des conditions spécifiques. Dans ce contexte, différentes protéines d'interaction ont pu être mises en évidence (Tableau 5).

Partenaires d'interaction	Gènes de réponse	Domaine d'interaction	Références
EAP1/Daxx	<i>Bcl-2, collagénase-1, Flt-1</i>	Pointed	[15, 210, 211]
MafB	Récepteur de la transferrine	ETS	[212, 213]
EAP2	<i>collagénase-1</i>	Pointed, ETS	[214]
TIP-30	<i>ostéopontine</i>	Pointed	[215]
p53 sauvage	<i>IKKα, TXSA</i>	Non connu	[29, 216]
Sp100	<i>collagénase-1, uPA</i>	Pointed, Exon VII, ETS	[217, 218]

Tableau 5 : Partenaires protéiques réprimant l'activité d'Ets-1.

II-3-2-a/ EAP1/Daxx

Des travaux *in vitro* montrent qu'Ets-1 stimule la transcription du gène du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (« B-cell lymphoma-2 ») et celle du gène de la collagénase-1. Néanmoins, cet effet transactivateur est aboli par la co-expression d'Ets-1 avec le facteur EAP1 (« ETS1 associated protein 1 »)/Daxx. Cette répression nécessite une interaction physique entre les deux partenaires qui implique la région N-terminale d'Ets-1 (139 acides aminés incluant le domaine PNT) et la région C-terminale d'EAP1/Daxx (173 acides aminés) [15].

Dans une autre étude, une corrélation positive entre l'expression d'Ets-1 et celle de Flt-1 (récepteur 1 au VEGF) est observée dans les cellules endothéliales microvasculaires de gliomes humains [219]. Cette corrélation observée *in vivo* résulte très probablement de la régulation directe du gène *Flt-1* par Ets-1. En effet, des études *in vitro* montrent qu'Ets-1 active la transcription du gène *Flt-1*. Cette stimulation nécessite un site composite EBS/CRE ainsi qu'un EBS isolé, ce dernier étant utilisé par les facteurs Ets-1, Ets-2 et Erg-1 [210]. Néanmoins, les propriétés activatrices d'Ets-1 au niveau de l'EBS isolé de ce gène sont réprimées en présence du facteur EAP1/Daxx. L'intervention d'une troisième protéine LANA (« latency-associated nuclear antigen ») restaure l'effet activateur d'Ets-1 et ce par séquestration d'EAP1/Daxx [211].

II-3-2-b/ MafB

Ets-1 réduit l'activité du promoteur du gène codant le récepteur de la transferrine, marqueur de la différenciation des érythrocytes [220]. Ce récepteur favorise l'entrée du fer complexé à la transferrine dans les érythrocytes, où il sert à la synthèse de l'hémoglobine. Ce pouvoir répresseur inattendu d'Ets-1 résulte, en fait, de son interaction, *via* son domaine de liaison à l'ADN, avec le facteur myéloïde MafB qui bloque ses propriétés transactivatrices [212, 213].

II-3-2-c/ EAP2

Ets-1 interagit avec la protéine EAP2 *via* la région N-terminale (acides aminés 1-139) contenant le domaine Pointed et la région C-terminale (acides aminés 282-441) comprenant le domaine ETS. Au niveau fonctionnel, EAP2 réprime la transactivation du promoteur de la collagénase-1 médiée par Ets-1 seule ou en synergie avec AP-1. Le mécanisme de cette répression n'est pas connu, mais les auteurs ont montré qu'EAP2 n'inhibe pas la fixation d'Ets-1 sur le promoteur de la collagénase-1. EAP2, en réprimant la transcription de la collagénase-1, inhibe la migration des cellules épithéliales de cancer de la prostate DU145 [214].

II-3-2-d/ TIP-30

A l'inverse de l'effet de l'interaction entre Ets-1 et AML-1 sur la transactivation du gène de l'ostéopontine, des travaux montrent que les capacités transactivatrices d'Ets-1 au niveau du promoteur de ce gène sont réprimées par le facteur TIP-30 (« 30 kDa Tat-interacting protein ») par interaction physique avec son domaine Pointed. Cette répression est associée à une réduction de la capacité de cellules de carcinomes hépatiques à former des métastases [215]. Ces données suggèrent donc qu'Ets-1 active l'expression de l'ostéopontine en faveur d'un phénotype invasif.

II-3-2-e/ p53 sauvage

Des études *in vitro* démontrent qu'Ets-1 active l'expression de gène d'IKK α (« IkB kinase α »), une kinase qui induit la phosphorylation de la protéine I κ B [29], ainsi que celui de la thromboxane synthase (TXSA) [216], une enzyme impliquée dans la voie de synthèse des thromboxanes, agents vasoconstricteurs et hypertensifs qui favorisent l'agrégation des plaquettes. Néanmoins, l'activité d'Ets-1 au niveau du promoteur de ces gènes peut être

abolie, et ce *via* l'interaction physique d'Ets-1 avec la protéine p53 sous sa forme sauvage [29, 216]. Par contre, la forme mutée de p53 est incapable de bloquer cette transactivation induite par Ets-1.

II-3-2-f/ Sp100

L'association d'Ets-1 avec Sp100, protéine localisée dans des corps nucléaires (organite subnucléaire), potentialise la transactivation du promoteur du gène de la collagénase-1 *in vitro* [217]. Cette interaction met en jeu deux régions d'Ets-1 : la région N-terminale comprenant le domaine Pointed et la région C-terminale comprenant le domaine ETS et le domaine codé par l'Exon VII. Le mécanisme de cette activation est expliqué par un changement conformationnel induit par l'interaction. Ce changement permet d'exposer le domaine TAD d'Ets-1 nécessaire à la transactivation du gène.

Au contraire, une autre étude a montré que Sp100 réprime l'activation des promoteurs de la collagénase-1 et de l'uPA induite par Ets-1 dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, HUVEC (« human umbilical endothelial cell ») [218]. L'interaction directe entre les deux protéines empêche la fixation d'Ets-1 à son site EBS isolé.

L'effet de Sp100 sur les propriétés transcriptionnelles d'Ets-1 au niveau du promoteur de la collagénase-1 semble donc dépendant du contexte. De façon cohérente avec la répression des gènes de la collagénase-1 et de l'uPA qui sont impliqués dans l'invasion tumorale, la surexpression de Sp100 inhibe l'invasion des cellules MDA-MB-231 exprimant Ets-1 [218].

II-3-3/ Kinases et enzymes

II-3-3-a/ Erk-1/-2

Ets-1 est le siège de plusieurs modifications post-traductionnelles comme décrit dans le Chapitre II §IV. La phosphorylation est la modification la plus étudiée. En effet, Ets-1 est phosphorylée au niveau du résidu thréonine 38. La phosphorylation de ce résidu est catalysée par les MAPKs Erk-1/-2. Dans le cas d'Erk-2 et donc très probablement dans celui d'Erk-1, cette réaction nécessite l'interaction de la MAPK avec Ets-1 au niveau du site plate-forme présent dans le domaine PNT (voir Chapitre II §III-2-2) [45, 47, 60]. Cette modification post-traductionnelle stimule les propriétés transactivatrices d'Ets-1 au niveau des promoteurs cibles contenant des éléments de réponse RRE, et ce en favorisant le recrutement des co-

activateurs, CBP et p300. Elle est également nécessaire pour stimuler la transcription de gènes cibles en partenariat avec d'autres facteurs (voir Chapitre IV §II-2-1-a).

II-3-3-b/ CaMKII

Ets-1 est également phosphorylée, dans la majorité des cas, par la CaMKII au niveau de sa région riche en sérines dans le domaine codé par l'exon VII (voir Chapitre II §IV-1). Cette modification post-traductionnelle en réponse au calcium est responsable du renforcement de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 p51 et donc d'une répression de son activité transcriptionnelle [55]. De plus, l'action de la CaMKII inhibe la synergie transcriptionnelle entre Ets-1 et AML-1 au niveau du promoteur du GM-CSF (voir Chapitre III §III-1).

II-3-3-c/ Ubc-9 et PIASy

La sumoylation d'Ets-1, comme décrit dans le Chapitre II §IV-2-2, nécessite des interactions avec différentes enzymes : (1) Ubc-9, l'enzyme E2 de conjugaison [72], interagit *via* son site de reconnaissance des substrats avec les domaines PNT et ETS d'Ets-1 [74, 75] et (2) PIASy, l'enzyme E3 d'activation, recrute Ets-1 par l'intermédiaire de son domaine TAD [76]. Ets-1 est désumoylée par la SUMO-protéase SENP-1. Cette action résulte très probablement de leur interaction physique.

La sumoylation d'Ets-1 induit une répression de son activité transcriptionnelle comme décrit dans le chapitre IV §II-2-2-b [77].

II-3-4/ Co-régulateurs

II-3-4-a/ CBP et p300

Les protéines CBP et p300 jouent un rôle fondamental dans l'initiation de la transcription en connectant la machinerie basale de transcription, contenant l'ARN polymérase II, et les facteurs de transcription présents au niveau des promoteurs. De plus, ces protéines sont capables d'acétyler les histones de façon à rendre la chromatine accessible aux facteurs de transcription [78, 221].

CBP/p300 :

L'activité acétyl-transférase de CBP et p300 est nécessaire à l'activation de promoteurs cibles d'Ets-1 tels que celui du gène de la stromélysine-1 [163]. Cet effet

nécessite une interaction directe qui implique le domaine PNT et le domaine TAD indispensable à la transactivation des gènes cibles [44, 163] (voir §II-2-1-a de ce Chapitre).

D'autres travaux montrent qu'Ets-1 recrute les co-activateurs CBP et p300 afin de transactiver le gène du TNF- α , une cytokine libérée par différents types cellulaires comme les globules blancs et les cellules endothéliales. Des études *in vivo* démontrent que la transcription du gène *TNF- α* est activée dans les macrophages suite à leur stimulation par le lipopolysaccharide (LPS), endotoxine de la paroi des bactéries à Gram négatif. Cette stimulation induit la fixation de plusieurs facteurs de transcription dont Ets-1 sur leurs éléments de réponse présents dans le promoteur de ce gène (Figure 29). Néanmoins, l'assemblage de ce complexe transcriptionnel dépend de recrutement de CBP/p300, connu pour interagir avec chacun des facteurs de transcription. Ceci indique qu'Ets-1 fait parti d'un grand complexe protéique nécessaire pour la transactivation du gène de TNF- α [222].

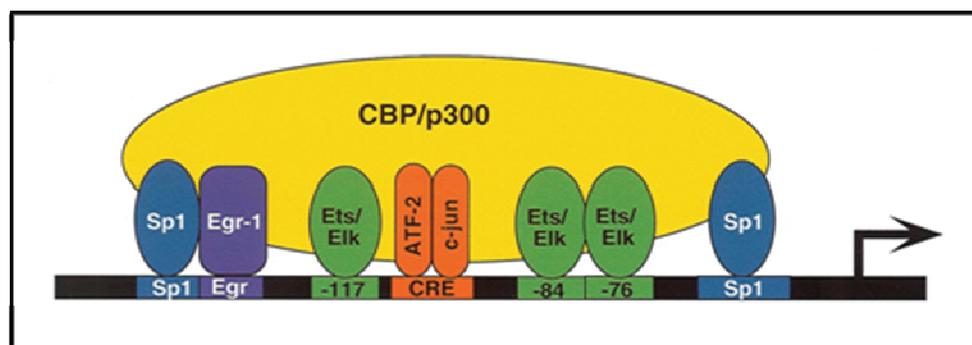


Figure 27 : Modèle du complexe transcriptionnel nécessaire pour la transactivation du promoteur du gène de TNF- α .

Après stimulation par le LPS, les facteurs de transcriptions Sp1, Egr-1, Ets-1, Ets-2, ATF-2 et c-Jun se fixent sur leurs éléments de réponse respectifs présents au niveau du promoteur de TNF- α . Ces facteurs recrutent alors le complexe CBP/p300, connu pour interagir avec chacun de ces protéines, pour induire la transcription du gène de TNF- α . D'après [222].

CBP :

Dans les cellules souches embryonnaires de souris (ES) dépourvues en Ets-1, une corrélation positive entre l'expression d'Ets-1 et celle de l'ARNm de Mdm2 (« murin double minute 2 ») (homologue murin de Hdm2) est mise en évidence en réponse aux UV, et ce au cours d'une analyse par micro-array [112]. Les travaux menés sur ces cellules démontrent que la transcription du gène de Mdm2 est activée en réponse aux UV par p53 en présence d'Ets-1. Dans ces conditions, l'interaction d'Ets-1 avec le co-activateur CBP est nécessaire pour permettre : (1) la fixation de p53 au niveau de son élément de réponse dans le promoteur du gène de Mdm2, et (2) l'interaction de p53 avec CBP [112].

p300 :

Ets-1 est capable de réguler le gène $p21^{waf1/cip1}$ codant un inhibiteur de Cdks (« cyclin-dependent kinases ») [223]. Une étude par micro-array montre que la surexpression d'Ets-1 induit celle de l'ARNm de $p21^{waf1/cip1}$ dans les cellules HUVEC [224]. Cette corrélation d'expression résulte d'une régulation directe. En effet, des travaux montrent qu'Ets-1 interagit avec p300 pour activer la transcription du gène $p21^{waf1/cip1}$ via un EBS situé en position -1350. Par contre, l'EBS plus distal en -1577 est incapable de recruter Ets-1 [223].

II-3-4-b/ HMG-A1

HMG-A1 (« high mobility group protein-A1 ») est un co-activateur transcriptionnel qui facilite l'assemblage des grands complexes nucléoprotéiques. Cette protéine est un co-activateur d'Ets-1 nécessaire pour activer le gène d'Ig μ . Ceci est le résultat d'une interaction physique entre les deux protéines qui facilite la fixation d'Ets-1 à l'ADN au niveau de son site μ A présent dans l'« enhancer » du gène d'Ig μ [225].

Par ailleurs, HMG-A1 facilite également la fixation de TEF-3 [226] et de Pu-1 au niveau de leurs sites respectifs μ E3 et μ B sur l'« enhancer » du gène d'Ig μ . Ceci suggère qu'Ets-1, Pu-1 et TEF-3 forment un complexe dont l'interaction avec le co-activateur HMG-A1 facilite leur fixation au niveau de leurs sites respectifs sur l'« enhancer » [227].

II-3-4-c/ SRC-1 et AIB1

Dans les cellules primaires de cancer de sein et dans la lignée de cellules de cancer de sein SKBR3, les facteurs de croissance bFGF et EGF induisent : (1) la fixation d'Ets-1 sur son élément de réponse présent au niveau du promoteur du gène de HER2 (« human epidermal growth factor receptor 2 ») et (2) le recrutement par Ets-1 des coactivateurs SRC-1 (steroid receptor coactivator-1 ») et AIB1 (« amplified in breast cancer 1 »). Ces interactions sont responsables de l'induction de l'expression du gène de HER2.

II-3-5/ Partenaires protéiques régulés par Ets-1

L'interaction d'Ets-1 avec ses partenaires protéiques n'est pas exclusive à la régulation de l'activité d'Ets-1, mais il existe des interactions où c'est Ets-1 qui régule l'activité de son partenaire protéique. Les partenariats avec les protéines Stat-5 (« signal transducer and activators of transcription-5 ») et GF11 (« growth factor independent 1 ») sont deux exemples où Ets-1 active et réprime, respectivement, l'activité transcriptionnelle de ces partenaires.

II-3-5-a/ Stat-5

La protéine Stat-5 est un facteur de transcription qui joue un rôle dans la différenciation cellulaire et les réponses immunitaires induites par les cytokines. En réponse à l'IL-2, la protéine Stat-5 est activée par phosphorylation dans le cytoplasme. Stat-5 activée est alors transloquée dans le noyau où elle interagit avec Ets-1 *via* la région C-terminale d'Ets-1 comprenant le domaine ETS. Ce complexe va pouvoir se fixer sur l'élément de réponse de Stat-5, GAS (« gamma interferon (IFN γ) activated site ») pour activer la transcription des gènes cibles de Stat-5 [228, 229].

II-3-5-b/ GF11

Une étude menée *in vitro* montre qu'Ets-1 bloque la transcription du gène pro-apoptotique *bax* (« bcl-2-associated x ») induite par le facteur GF11 [119]. Cette interférence nécessite l'interaction d'Ets-1, *via* son domaine ETS de liaison à l'ADN, avec GF11 sur leur site composite présent dans le promoteur de *bax*. Etant donné qu'Ets-1 et GF11 sont co-exprimées au cours de l'hématopoïèse et de la leucémogénèse dans les lymphocytes T, il est probable que l'interférence d'Ets-1 dans l'activation de *bax* s'effectue dans ce contexte [119].

II-3-6/ Partenaires protéiques d'Ets-1 p42

Puisqu'Ets-1 p42 n'est pas auto-inhibée pour sa liaison à l'ADN, elle se fixe à l'ADN sans l'intervention de partenaires, réduisant ainsi sa spécificité de reconnaissance des promoteurs cibles par rapport à Ets-1 p51. De plus, étant donné la structure protéique d'Ets-1 p42, son patron de partenaires d'interaction est probablement différent de celui d'Ets-1 p51. En effet, et bien que les seules protéines d'interaction identifiées pour Ets-1 p42 (EAP1/Daxx et EAP2) soit communes aux deux isoformes (Figure 30) [15] [214], l'absence du domaine codé par l'exon VII sous-entend la perte de l'interaction avec les facteurs recrutés par ce domaine. Par contre, la formation d'une séquence jonction suggère la liaison de nouveaux partenaires.

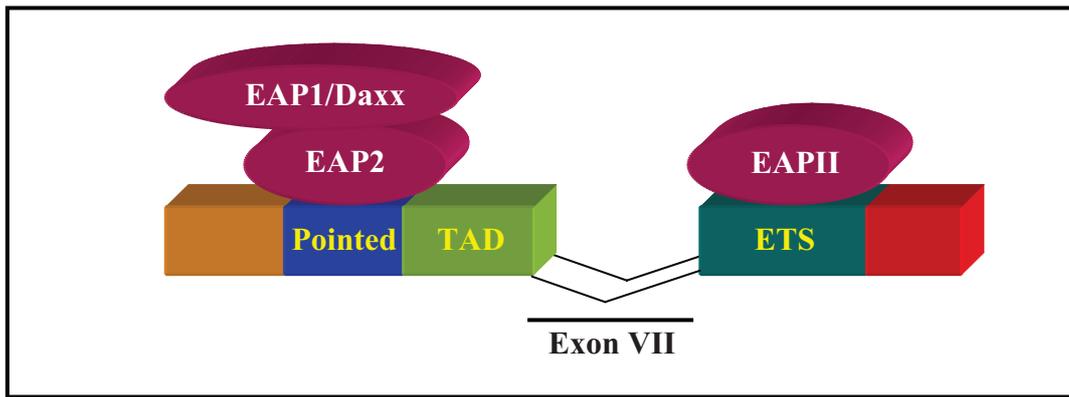


Figure 28 : Schéma représentant les partenaires d'interaction connus d'Ets-1 p42.

Ets-1 p42 interagit avec EAP1/Daxx et EAP2. Les partenaires sont représentés au niveau du domaine protéique avec lequel ils interagissent. Les domaines protéiques d'Ets-1 p42 sont indiqués : en bleu pour le domaine Pointed, en vert pour le domaine TAD et en vert foncé pour le domaine ETS.

En conclusion de ce Chapitre, il ressort que la protéine Ets-1 est assujettie à une régulation extrêmement fine :

- de son expression *via* l'activité de son promoteur,
- de son activité *via* :
 - (1) l'expression de variants d'épissage alternatif,
 - (2) des modifications post-traductionnelles induites par différentes voies de signalisation,
 - (3) l'interaction avec des partenaires protéiques.

L'existence d'une telle régulation assigne à la protéine Ets-1 une fonction biologique importante. En effet, quel est l'intérêt de mettre en œuvre tant de mécanismes de contrôle de l'activité d'Ets-1, si celle-ci n'a pas de conséquences importantes pour la cellule ? Nous tenterons donc d'illustrer ce postulat en mettant en lumière les rôles biologiques d'Ets-1 dans des contextes physiologiques et pathologiques. Ceci sera développé dans le Chapitre suivant

CHAPITRE V : Rôles biologiques d'Ets-1

I/ Rôles physiologiques d'Ets-1

I-1/ Développement embryonnaire

Au cours du développement murin, l'expression d'Ets-1 est détectée de façon précoce. Dès le 8^{ème} jour embryonnaire (E8), Ets-1 est mise en évidence dans le sac vitellin. Son expression est corrélée à la présence des hémangioblastes, précurseurs communs des lignées vasculaire et hématopoïétique. A peine 12 heures plus tard (E8,5), des transcrits d'Ets-1 sont trouvés dans des structures du système nerveux, telles que le tube neural et les crêtes neurales, et dans des structures vasculaires, comme le plexus vasculaire péri-optique [230, 231]. Par la suite (E11,5), Ets-1 est détectée dans le réseau vasculaire en formation, au niveau du cœur et de l'aorte dorsale, ainsi que dans les capillaires se développant au sein du système nerveux central. Durant les premières étapes de la morphogenèse (entre E12,5 et E16), Ets-1 est exprimée dans de nombreux tissus lymphoïdes, comme le thymus et la rate, mais également dans d'autres types de tissus, tels que les reins, les poumons, la langue et la peau [231]. L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* a mis en évidence qu'Ets-1 est présente uniquement dans les cellules mésenchymateuses des organes en formation, qui possèdent des capacités de migration et d'invasion importantes [230]. Néanmoins à E16, l'expression d'Ets-1 diminue et se restreint à certains organes : reins, poumons, cœur, cerveau et thymus. Par ailleurs, Ets-1 est détectée dans les bourgeons de membres et les vertèbres au sein desquels a lieu un développement osseux [230]. Après la naissance, l'ARNm d'Ets-1 devient difficilement décelable, il est surtout synthétisé dans la rate et le thymus à un faible niveau [230].

I-2/ Hématopoïèse

L'hématopoïèse permet de générer les différents types cellulaires qui constituent le système sanguin à partir d'une cellule souche précurseur qui subit des différenciations successives (Figure 31). Celles-ci sont orchestrées par des signaux particuliers, telles que des cytokines, et par la combinaison de certains facteurs de transcription qui garantissent la spécificité de chaque lignée. Parmi ces facteurs, Ets-1 joue un rôle prépondérant dans les dernières étapes de formation de la lignée lymphoïde (lymphocytes T, lymphocytes B,

cellules NK (« natural killer »)), et elle participe à l'établissement de la lignée myéloïde (mégacaryocytes, érythrocytes).

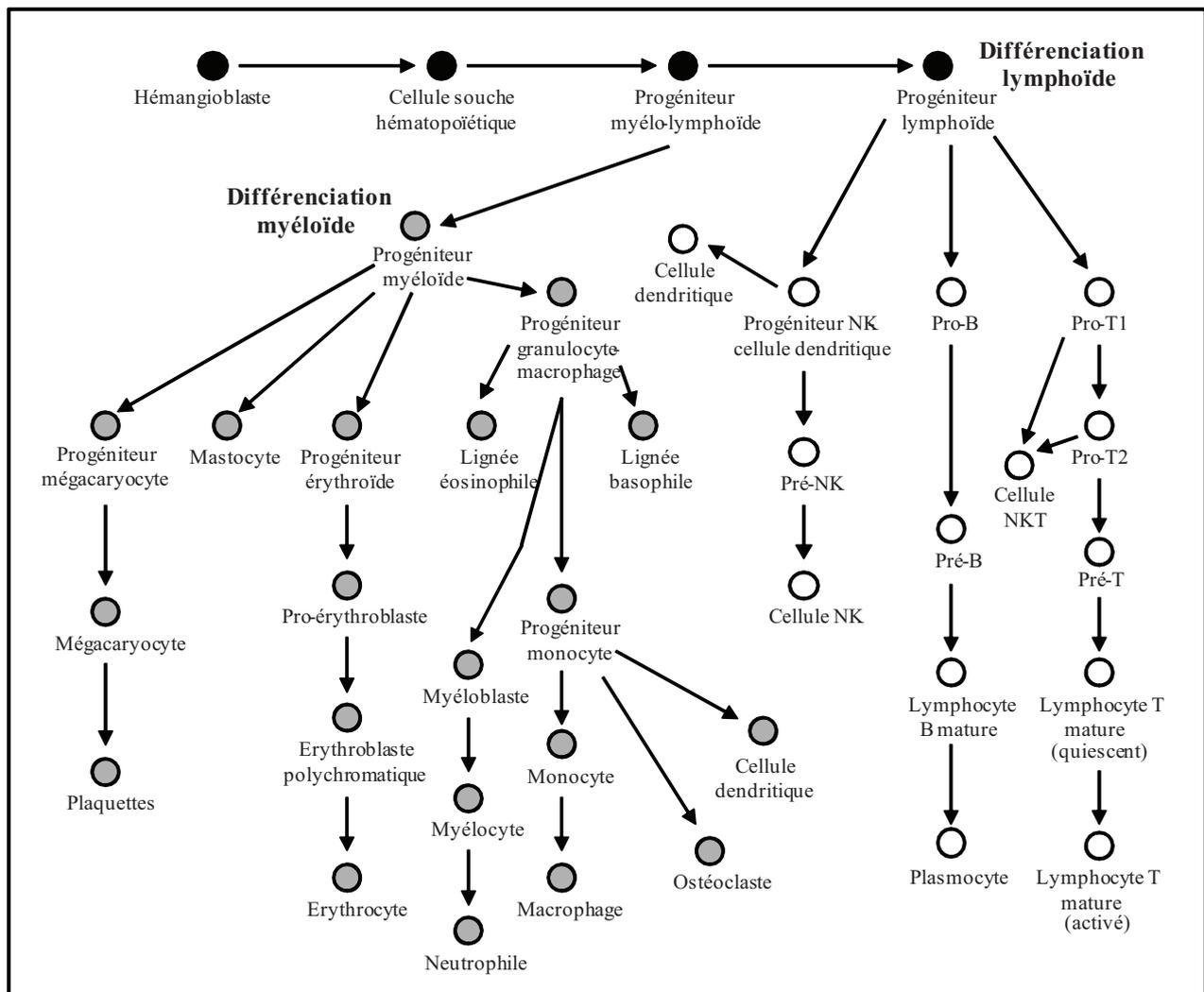


Figure 29 : Etapes de différenciation lymphoïde et myéloïde au cours de l'hématopoïèse.
D'après [232].

I-2-1/ La lignée lymphoïde

Au cours de l'établissement de la lignée lymphoïde, Ets-1 intervient dans le développement des lymphocytes B et T ainsi que des cellules NK, comme démontré par l'étude de souris transgéniques déficientes pour l'expression d'Ets-1 [170, 233-235].

I-2-1-a/ Les lymphocytes B

Dans les lymphocytes B, l'expression d'Ets-1 est observée aux différents stades de maturation mais elle diminue au cours de la différenciation terminale en plasmocytes (Figure 31) [230]. *In vivo*, l'inhibition de l'expression d'Ets-1 dans les lymphocytes de souris

génétiquement modifiees conduit à des défauts de développement des pré-lymphocytes B et à une augmentation considérable du nombre de plasmocytes [170, 236]. En plus de l'altération de la différenciation terminale des lymphocytes B, l'absence d'Ets-1 déclenche une hypersensibilité de ces cellules au TLR-9 (« toll-like receptor-9 ») et le développement de maladies auto-immunes [237]. L'ensemble de ces données indique qu'Ets-1 est nécessaire à la maturation des précurseurs des lymphocytes B et au blocage de la différenciation terminale en plasmocytes. Ceci est en lien direct avec les propriétés transcriptionnelles d'Ets-1 qui agit dans les lymphocytes B à différents stades de maturation :

(1) dans les pro-lymphocytes B

Ets-1 est capable d'induire la transcription du gène de la chaîne α du récepteur des lymphocytes B (gène *mb-1*) [98], qui s'exprime de façon précoce au sein des pro-lymphocytes B et est nécessaire au développement de la lignée. Le contrôle de la transcription de ce gène met en jeu la fixation de Ets-1 au niveau de son promoteur grâce à l'action de Pax-5, facteur spécifique et précoce des cellules B (voir Chapitre IV §II-3-1-f) [53, 178, 179].

(2) dans les pré-lymphocytes B

Ets-1 régule le gène codant les chaînes lourdes des immunoglobulines μ (Ig μ) qui est crucial pour la différenciation. Comme décrit dans le Chapitre IV §II-3-1-e, l'« enhancer » de ce gène est activé par Ets-1 de concert avec TFE-3 et Pu-1, un membre de la famille Ets jouant un rôle important dans l'hématopoïèse [225].

(3) dans les lymphocytes B matures

Ets-1 agit comme un régulateur négatif de leur différenciation terminale en cellules plasmatiques. Pour ce faire, il interfère avec les propriétés transcriptionnelles de Blimp-1 (« B lymphocyte-induced maturation protein-1 »), facteur inducteur de cette différenciation [238]. Ets-1 bloque la répression médiée par Blimp-1 de gènes tels que ceux de Pax-5 et du CIITA (« class II trans-activator »), activateur du CMH (« complexe majeur d'histocompatibilité ») de classe II [238]. L'action d'Ets-1 dans la différenciation des lymphocytes B se situe également dans la régulation du gène *HLA-DR* (« human leukocyte antigens-DR ») qui code la sous-unité α du CMH de classe II. Le promoteur de ce gène est activé de façon directe par la protéine Ets-1 alors que les facteurs de la famille Ets, Ets-2 et Pu-1, n'ont pas d'effet [239].

I-2-1-b/ Les lymphocytes T

Ets-1 est exprimée aux différents stades de maturation des lymphocytes T mais devient indétectable après leur activation (Figure 31) [26]. Au contraire, l'expression d'Ets-2 est

complémentaire de celle d'Ets-1 puisqu'elle est détectée exclusivement dans les lymphocytes T matures activés. Ceci indique qu'Ets-1 et Ets-2 possèdent des rôles biologiques différents dans le développement de cette lignée [26]. L'utilisation de souris déficientes pour l'expression d'Ets-1 au niveau des lymphocytes a mis en évidence le rôle primordial joué par Ets-1 dans la survie et le maintien des lymphocytes T matures à l'état de quiescence [234, 236]. En effet, les lymphocytes T matures de ces souris génétiquement modifiées présentent une apoptose accrue ainsi qu'un défaut de prolifération en réponse à une stimulation de leurs récepteurs. De plus, l'altération de l'expression d'Ets-1 dans des souris transgéniques induit des défauts dans les dernières étapes de la sélection thymique avec une absence de production de cellules T CD8⁺ [240]. Il est également à noter que la répression de l'expression d'Ets-1 dans des souris transgéniques induit une réduction de la production de cellules NKT (« natural killer T ») (Figure 31) dans le thymus, la rate et le foie [235].

L'implication d'Ets-1 dans la différenciation des lymphocytes T est à relier à sa capacité à réguler la transcription des gènes codant les chaînes α et β du TCR qui jouent un rôle fondamental dans la maturation des pré-lymphocytes T. Cette régulation dépend de l'interaction d'Ets-1 avec AML-1 comme décrit dans le Chapitre IV §II-3-1-a [95, 170].

I-2-1-c/ Les cellules NK

Afin de déterminer *in vivo* le rôle d'Ets-1 dans le développement des cellules NK, des souris déficientes pour l'expression d'Ets-1 dans tous les tissus ont été générées. Il apparaît que ces animaux ont un nombre de cellules NK matures fortement diminué, montrant l'importance d'Ets-1 pour le développement de ces cellules [233]. De plus, les cellules NK *ets-1* ^{-/-} sont incapables de lyser des cellules tumorales, empêchant le rejet de tumeurs dans un modèle murin. Enfin, ces cellules présentent un important défaut de sécrétion d'interféron- γ , une cytokine essentielle pour la réponse immunitaire [233]. Ces expériences sont en faveur du rôle fondamental d'Ets-1 dans les fonctions des cellules NK. Des travaux complémentaires sont néanmoins nécessaires pour identifier les cibles moléculaires d'Ets-1 dans ces cellules.

I-2-2/ La lignée myéloïde

Au cours de l'établissement de la lignée myéloïde, Ets-1 stimule la différenciation des mégacaryocytes alors qu'elle agit comme un frein à l'achèvement de celle des érythroïdes. En effet, sa surexpression promeut la différenciation des mégacaryocytes [153] alors qu'elle entraîne un blocage de la maturation des érythroblastes polychromatiques en érythrocytes [153, 220].

I-2-2-a/ Mégacaryocytes

Les mégacaryocytes sont des cellules géantes de la moelle osseuse dont le cytoplasme se fragmente pour produire les plaquettes sanguines (Figure 31). Ets-1 est exprimée tout au long de la différenciation mégacaryocytaire pour activer ses gènes cibles spécifiques de cette lignée [153]. Parmi eux, nous pouvons compter ceux codant la glycoprotéine IIb (CD41) [205] et le récepteur de la thrombopoïétine (CD110) [206], qui sont des protéines membranaires exprimées à la surface des cellules à des stades précoces de la différenciation mégacaryocytaire. Leurs promoteurs sont activés au niveau d'un site composite EBS/GATA par Ets-1 en synergie avec GATA-1, un facteur de transcription spécifique de la différenciation myéloïde [153, 205, 206]. Le rôle d'Ets-1 dans le développement de cette lignée inclut également le contrôle de la transcription de GATA-1 et GATA-2 (facteur capable de favoriser la différenciation des mégacaryocytes) [26, 153, 241].

I-2-2-b/ Erythrocytes

Les érythrocytes, plus communément appelés hématies ou globules rouges, assurent le transport des gaz respiratoires dans le sang et présentent un cytoplasme riche en hémoglobine. Ets-1 est exprimée durant les premiers stades de la différenciation érythrocytaire puis décroît et devient indétectable à partir du stade érythroblaste polychromatique (Figure 31) [153]. D'ailleurs, la surexpression d'Ets-1 entraîne un blocage de la maturation des érythroblastes polychromatiques en érythrocytes [153, 220]. Certains aspects moléculaires de cet effet ont pu être identifiés. Ainsi, la sur-expression de Ets-1 dans ces érythroblastes conduit à une augmentation de la synthèse du facteur de transcription GATA-2, codant un facteur néfaste au développement de la lignée érythroïde mais favorable à celui des mégacaryocytes [153, 241]. Ceci s'accompagne également d'une diminution de l'expression de GATA-1, facteur nécessaire à l'érythropoïèse normale [153, 242], ainsi que celles de l'hémoglobine et du récepteur de la transferrine, qui sont des marqueurs de la différenciation des érythrocytes [220].

Il s'avère qu'Ets-1 contrôle la transcription de certains de ces gènes. En effet, le promoteur de GATA-2 est directement activé par Ets-1 dans un contexte cellulaire, suite à sa liaison au niveau du promoteur [153, 241]. De plus, des travaux ont montré qu'Ets-1 est capable de réduire l'activité des promoteurs de GATA-1 et du récepteur de la transferrine. L'effet d'Ets-1 sur le promoteur de la transferrine est du à son interaction avec MafB, un facteur spécifique des cellules myéloïdes (voir Chapitre IV §II-3-2-b) [212, 213]. L'effet

d'Ets-1 sur l'expression de GATA-1 est donc antagoniste dans les cellules mégacaryocytaires (activateur) et érythroïdes (répresseur). L'ensemble de ces données illustre bien que la répression d'Ets-1 est nécessaire à l'achèvement de la différenciation des érythrocytes.

I-3/ Angiogenèse

1-3-1/ Mécanisme général

L'angiogenèse est un processus physiologique correspondant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux qui sont préexistants. Pour cela, les cellules endothéliales sont activées en réponse à un stimulus. Ceci conduit de façon successive : (1) à la déstabilisation de la paroi vasculaire pré-existante, (2) au déplacement des cellules endothéliales à travers le vaisseau, (3) à la dégradation de la membrane basale, (4) à la digestion de la MEC environnante et (5) à la migration orientée des cellules endothéliales suivie d'une phase proliférative. Ces étapes clés sont sous la dépendance de signaux pro-angiogéniques, tels que le VEGF et le bFGF, qui induisent la sécrétion de protéases par les cellules endothéliales. Grâce à des contacts intercellulaires, il se forme alors des tubes constituant la lumière du futur vaisseau sanguin dont la formation est achevée par le recrutement des péricytes et des cellules SVMC.

I-3-2/ Ets-1 dans l'angiogenèse

I-3-2-a/ Expression associée à l'angiogenèse

Au cours du développement embryonnaire, Ets-1 est exprimée dans les structures vasculaires en formation, au niveau du cœur, des artères, des capillaires et des méninges [231]. A l'opposé, Ets-1 n'est plus détectée dans les vaisseaux matures après leur différenciation, indiquant qu'elle est associée au processus même de l'angiogenèse [231]. De plus, son expression est induite lors de la régénération endothéliale suite à la dénudation d'une mono-couche de cellules endothéliales [171].

De nombreuses expériences réalisées *in vivo* ont permis de désigner Ets-1 comme un acteur clé de l'angiogenèse. En effet, l'inhibition de l'expression d'Ets-1 à l'aide d'ARN antisens spécifiques est capable de bloquer l'angiogenèse induite *in vivo* par H₂O₂ [243], NO [144] ou HGF [244]. De la même façon, l'utilisation d'un dominant négatif interférant avec l'action d'Ets-1 prévient l'angiogenèse induite par le bFGF et le VEGF dans un modèle murin [245]. De plus, lorsqu'Ets-1 est surexprimée *in vivo* dans un modèle d'ischémie du membre chez le rat, une augmentation de la densité des capillaires et du flux sanguin est observée

[246]. Cependant, les souris déficientes pour l'expression d'Ets-1 ne présentent pas de défaut de vascularisation, bien que 50% des animaux décèdent de façon inexplicable avant sevrage [233]. Ceci laisse supposer l'existence d'un mécanisme de compensation par un autre facteur Ets. En particulier, Fli-1, qui est absolument requis pour la formation des vaisseaux chez l'embryon, possède un patron d'expression chevauchant celui d'Ets-1 au cours du développement [247].

I-3-2-b/ Rôle dans les cellules endothéliales

Le rôle d'Ets-1 dans l'angiogenèse est également illustré par des travaux menés dans des lignées de cellules endothéliales. Ceux-ci montrent que la suppression de la synthèse d'Ets-1 réduit la migration des cellules induite par le VEGF [248] et la formation de tubes stimulée par le CCL-2 [139]. A l'inverse, la surexpression d'Ets-1 dans des cellules endothéliales augmente leurs capacités invasives, leur permettant d'acquérir un phénotype angiogénique [249]. De façon remarquable, les facteurs pro-angiogéniques utilisés dans ces expériences sont connus pour activer l'expression d'Ets-1 (voir Chapitre IV §I-2-1).

La fonction d'Ets-1 dans les cellules endothéliales puise son origine dans la régulation de nombreux gènes cruciaux pour leurs propriétés angiogéniques (*Flt-1*, *Flk-1*, et *VE-cadhérine*), leurs capacités invasives (*collagénase-1*, *stromélysine-1*, *uPA* [129] et *gélatinase-B*), ainsi que pour leur migration (*intégrine $\beta 3$* [249]) (voir Chapitre IV, tableau 4 et 5).

I-3-2-c/ Rôle dans les cellules SVMC

L'implication d'Ets-1 dans l'angiogenèse ne concerne pas uniquement les cellules endothéliales, mais également les cellules musculaires lisses vasculaires, SVMC. En premier lieu, l'expression d'Ets-1 est induite par des facteurs modulant les propriétés de ces cellules, tels que le PDGF-BB et l'endothéline-1 [122] (voir Chapitre IV §I-2-1).

Bien que les données fonctionnelles soient peu abondantes, une étude a mis en évidence qu'Ets-1 est capable d'activer la croissance des cellules SVMC [250]. Cet effet est en corrélation avec des travaux montrant qu'Ets-1 active le promoteur de gènes codant : (1) PDGF-A et PDGF-D, des facteurs stimulant la croissance de ces cellules [133, 250] et (2) PDGF-R α , un récepteur à certains facteurs de croissance de la famille du PDGF [251]. Comme l'indiquent certaines expériences, Ets-1 pourrait également participer à la dédifférenciation des cellules SVMC [252], ce qui est associée à une augmentation de leur prolifération et de leur migration. D'ailleurs, ce processus est stimulé par le PDGF-BB, connu pour induire l'expression du gène *ets-1*. De plus, Ets-1 prend part à ce processus en réduisant

l'expression de la SM α -actine (« smooth muscle α -actin »), marqueur de différenciation des cellules SVMC, en réponse au PDGF-BB [252].

I-4/ Ostéogenèse

I-4-1/ Mécanisme général

Au cours du développement embryonnaire, les os sont formés suivant deux mécanismes distincts : l'ossification endoconjonctive (ou intramembraneuse) et l'ossification endochondrale. Durant l'ossification endoconjonctive, des cellules du mésenchyme prolifèrent et se différencient en ostéoblastes. Ces cellules vont produire la matrice osseuse, qui subira une calcification (minéralisation). De façon parallèle, la matrice est remodelée après recrutement de cellules spécialisées, les ostéoclastes. Ce mécanisme donne naissance aux os plats. Lors de l'ossification endochondrale, des cellules du mésenchyme se différencient en chondroblastes qui synthétisent la matrice cartilagineuse. Ce tissu précurseur est résorbé en partie par les chondroclastes, ce qui permet l'invasion par les vaisseaux sanguins. La matrice osseuse est alors mise en place par l'action des ostéoblastes et remodelée par les ostéoclastes. Ce mécanisme est responsable de la formation des os longs.

I-4-2/ Ets-1 dans l'ostéogenèse

L'expression d'Ets-1 est détectée dans les structures osseuses en formation au cours du développement, mais pas dans le cartilage [230]. A l'inverse, Ets-2 est mis en évidence dans le cartilage en formation, suggérant des rôles distincts au cours de l'ostéogenèse [231]. L'utilisation d'un modèle cellulaire d'ostéoblastes, la lignée MC3T3-E1, a permis d'éclaircir le rôle propre d'Ets-1 au cours de l'ostéogenèse. Cette lignée forme des nodules osseux en une période de 30 à 35 jours de culture. Le développement nodulaire à partir des cellules MC3T3-E1 s'effectue en trois phases successives, caractérisées par : (1) une prolifération accrue de ces cellules, (2) une différenciation accompagnée de la synthèse d'une matrice osseuse, et (3) une minéralisation de la matrice [128]. Dans ce modèle cellulaire, Ets-1 s'exprime uniquement lors de la phase de prolifération alors qu'Ets-2 est synthétisée durant les phases suivantes [127].

Le rôle d'Ets-1 au cours de la phase de prolifération de la lignée MC3T3-E1 est lié à sa capacité de réguler l'expression : (1) du gène de la PTHrP, un médiateur du remodelage osseux [128], et (2) du gène de l'ostéopontine, un constituant de la matrice osseuse, qui est

activé par Ets-1 en synergie avec le facteur de transcription AML-1 (voir Chapitre IV §II-3-1-a) [171].

I-5/ Développement du système nerveux central

I-5-1/ Mécanisme général

Le système nerveux central se développe avec l'apparition de la plaque neurale, issue de l'épaississement de l'ectoderme. Celle-ci s'invagine, et se renferme pour donner le tube neural. Deux types de cellules prolifèrent au sein de ce tube : les neuroblastes et les glioblastes. Les neuroblastes donnent naissance aux neurones après migration, par guidage axonal, et différenciation. Les glioblastes se différencient pour former les cellules gliales, telles que les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales. La partie antérieure du tube neural est destinée à former le cerveau et la partie postérieure, la moelle épinière.

I-5-2/ Ets-1 dans le développement du système nerveux

Ets-1 est exprimée précocement au sein du système nerveux central en formation, au niveau du tube neural, puis plus tardivement, dans le cortex cérébral en développement [230, 231]. De plus, elle est induite lors de la différenciation neuronale des cellules embryonnaires, P19, en réponse à l'acide rétinoïque [230]. La synthèse d'Ets-1 est également détectable dans des astrocytes en culture [31]. D'un point de vue moléculaire, le rôle d'Ets-1 dans le développement du système nerveux est associé à la régulation du gène du récepteur δ aux opioïdes, qui est également exprimé dans le cortex cérébral en développement (voir Chapitre IV §II-3-1-g) [101] et celui de la prolactine, qui est activé dans l'hypophyse (voir Chapitre IV §II-3-1-c) [161].

I-6/ Prolifération cellulaire

Ets-1 est impliquée dans différentes phases du cycle cellulaire, contribuant au contrôle de la progression du cycle. Son effet prolifératif a été décrit dans des rétinopathies [136], des gliomes [253] ou encore des carcinomes gastriques [254]. Dans ce dernier cas, la croissance induite par Ets-1 est liée à ses propriétés de liaison à l'ADN, car elle est bloquée suite à l'utilisation d'oligonucléotides (double brins de séquence consensus d'Ets-1) qui entrent en compétition avec les sites naturels de fixation d'Ets-1 [254]. Un certain nombre de gènes cibles d'Ets-1 en faveur de la prolifération sont décrits dans la littérature :

- Le gène de la cycline D1 : En réponse à l'hypoxie, Ets-1 contrôle l'activité du promoteur et l'expression de la cycline D1, qui favorise la progression en phase G1 (« growth 1 ») du cycle cellulaire [171].

- Le gène du facteur c-Myc : La surexpression d'Ets-1 restaure la réponse mitogène des fibroblastes embryonnaires murins, NIH3T3, qui sont incapables d'entrer en phase S (« synthesis ») après stimulation par le CSF-1 (« colony stimulating factor-1 ») [255]. La reprise de leur croissance est associée à l'activation de l'oncogène *c-myc* qui est rendue possible grâce au recrutement d'Ets-1 au niveau du promoteur de ce gène [255].

- Les gènes du facteur NFκB et de la kinase IKKα : Des études *in vitro* démontrent qu'Ets-1 active l'expression des gènes de NFκB [256] et d'IKKα [29]. La régulation de ces gènes par Ets-1 est en faveur de la stimulation des propriétés de NFκB et donc de la prolifération.

Par ailleurs, Ets-1 agit sur la transcription de gènes impliqués dans le blocage du cycle cellulaire, tels que :

- Le gène de la protéine p53 : Une étude a mis en évidence que le promoteur du gène suppresseur de tumeur *p53*, dont le produit coordonne l'arrêt du cycle cellulaire en réponse au stress génotoxique, est transactivé par Ets-1 (voir Chapitre III §III-2-2) [106].

- Le gène du facteur Mdm2 (voir Chapitre IV §II-3-4-a)

- Le gène du facteur p21^{waf1/cip1} et GADD153 : Ets-1 régule l'expression du gène de p21^{waf1/cip1} [223], un inhibiteur de Cdks et du gène de réponse aux dommages à l'ADN, *GADD153* (« growth arrest and DNA damage inducible gene 153 ») [257].

I-7/ Sénescence

La sénescence est étroitement liée au cycle cellulaire, en ce sens qu'elle correspond à un arrêt permanent de la croissance des cellules. Elle peut être déclenchée par l'activation constitutive et prolongée de la voie Ras-MAPK qui, en régulant des protéines telles que p53, Rb (« retinoblastoma protein »), p19^{ARF} et p16^{INK4a}, favorise le blocage de la prolifération dans la sénescence [258].

Le rôle d'Ets-1 dans la sénescence se situe au niveau du contrôle transcriptionnel du gène *p16^{INK4a}*, codant un inhibiteur de Cdks. Dans des fibroblastes humains normaux, l'expression de p16^{INK4a} est induite au moment de la sénescence de façon corrélée à celle

d'Ets-1 endogène [259]. Cette coexpression résulte très probablement d'une régulation directe du gène *p16^{INK4a}* par Ets-1 puisque Ets-1 est capable d'activer le promoteur de ce gène en réponse à Ras. Cette transactivation nécessite la fixation d'Ets-1 sur un EBS du promoteur de *p16^{INK4a}*, comme démontré au niveau endogène dans des fibroblastes humains normaux [259].

I-8/ Apoptose

Dans des conditions physiologiques, l'apoptose, ou mort cellulaire génétiquement programmée, est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Les mécanismes de l'apoptose seront décrits dans la deuxième partie de l'introduction.

Ets-1 présente des propriétés bivalentes dans l'apoptose qui résultent de sa capacité de réguler des gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Le rôle d'Ets-1 dans l'apoptose dépend très fortement du contexte cellulaire.

I-8-1/ Cibles pro-apoptotiques

Différents travaux illustrent la capacité d'Ets-1 à induire l'apoptose. Une première étude montre que l'augmentation du taux de protéine Ets-1 stimule l'apoptose des cellules HUVEC, dans des conditions de faible concentration en sérum [224]. L'analyse par micro-array de ces cellules surexprimant Ets-1 [224] a permis de mettre en évidence que leur apoptose est associée à :

- (1) une activation de gènes pro-apoptotiques tels que ceux de Bid (« Bcl2 interacting protein »), du cytochrome p450, de la caspase-4, de p27 et de p21^{waf1/cip1},
- (2) une répression de gènes anti-apoptotiques tels que ceux de la cyclooxygénase-2, de l'IAP2 (« inhibitor of apoptosis protein 2 ») et de Hdm2 (« human double minute 2 protein »).

Néanmoins, cette étude ne permet pas de déterminer si ces gènes sont directement régulés par Ets-1. De plus, l'apoptose induite par Ets-1 dans les cellules HUVEC implique l'activation de caspases, protéases de la machinerie apoptotique, puisqu'elle est abolie par l'utilisation de leurs inhibiteurs [224].

Parmi les cibles directes pro-apoptotiques d'Ets-1, nous pouvons également citer le gène *FasL*, codant le ligand Fas. Celui-ci active le récepteur Fas pour transmettre un signal de mort intracellulaire (voir Chapitre IV §II-3-1-h) [184].

Les travaux décrits précédemment illustrent bien la fonction pro-apoptotique d'Ets-1 *via* ses propriétés transcriptionnelles. Néanmoins, une étude menée sur des cellules ES de

souris reste plus controversée. Dans ces cellules, la répression de l'expression d'Ets-1 empêche le déclenchement de l'apoptose normalement induite par les UV [112]. Par contre, l'analyse par micro-array de ces cellules, réprimées pour l'expression d'Ets-1, montre que le blocage de leur apoptose en réponse aux UV est associé à [112] :

- (1) une répression de gènes pro-apoptotiques tels que ceux de Perp (« p53 apoptosis effector related to PMP-22 ») et de Bax, ce qui est cohérent avec l'inhibition de l'apoptose,
- (2) une répression de gènes anti-apoptotiques tels que ceux de Mdm2 et de la cycline G, ce qui est contradictoire avec le blocage de l'apoptose.

I-8-2/ Cibles anti-apoptotiques

Bien que de nombreuses études décrivent Ets-1 comme un facteur pro-apoptotique, d'autres travaux ont mis en évidence des propriétés transcriptionnelles d'Ets-1 en faveur d'une fonction anti-apoptotique.

- Le gène du facteur Bax : bien que la protéine Bax ait des fonctions pro-apoptotiques, Ets-1 en inhibant l'expression du gène *bax* agit comme un facteur anti-apoptotique (voir Chapitre IV §II-3-5-b [119]).

- Le gène du facteur Bcl-2 [15] (voir Chapitre IV §II-3-2-a).

- Le gène de MDR-1 [190] (voir Chapitre IV §II-3-1-k).

L'implication d'Ets-1 dans le processus apoptotique a été également mise en évidence dans des études montrant que le niveau basal d'Ets-1 p51 diminue dans des cellules apoptotiques. En effet, l'inducteur de l'apoptose, curcumin, réduit la quantité de la protéine Ets-1 dans les cellules d'endomètre cancéreux humain, HEC-1-A [260]. De même, des analyses par cytométrie en flux et de microscopie confocale ont montré que l'expression d'Ets-1 est diminuée dans les cellules mononuclées du sang périphérique et les cellules bursales apoptotiques [261]. Le mécanisme à la base de cette diminution de la quantité d'Ets-1 dans les cellules apoptotiques n'est pas encore connu.

II/ Rôles pathologiques d'Ets-1

II-1/ Cancer

II-1-1/ Mécanisme général

Au niveau moléculaire, le cancer résulte de l'altération génétique, issue de facteurs héréditaires ou environnementaux, d'une cellule. Dans certaines conditions (étape d'induction), celles-ci vont conduire à l'acquisition d'un phénotype transformé qui est caractérisé par : (1) une prolifération accrue et illimitée, (2) une perte de l'inhibition de contact, (3) une indépendance vis-à-vis des signaux mitogènes et (4) une résistance à l'apoptose. Après déstabilisation de l'homéostasie tissulaire, de nombreux clones de cellules transformées parviennent à émerger (étape de promotion). Ceux-ci contribueront à former, par exemple dans le cas de cellules épithéliales, une tumeur *in situ*, désignée carcinome.

Dans ce cas, les cellules tumorales se dé-différencient progressivement par transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) puis acquièrent la capacité de rompre la lame basale et d'envahir la MEC environnante. Grâce à des interactions avec le stroma, diverses protéases sont sécrétées afin de digérer la matrice et de favoriser la migration des cellules issues de la tumeur primaire. Celles-ci pénètrent alors dans les vaisseaux sanguins par intravasation et pourront coloniser un autre tissu (métastases) par un processus inverse.

Dans l'environnement tumoral, de nouveaux vaisseaux sanguins se développent à partir de vaisseaux pré-existants sous l'effet de divers facteurs pro-angiogéniques sécrétés par la tumeur. Ce processus, nommé néo-angiogenèse tumorale, s'établit suivant le même mécanisme que l'angiogenèse normale et comme décrit dans le §I-3 de ce Chapitre. Il contribue, d'une part, à l'apport nutritif nécessaire au métabolisme accru de la tumeur et d'autre part, à la dissémination des cellules qui formeront des métastases.

II-1-2/ Ets-1 dans le cancer

II-1-2-a/ Expression associée au cancer

Chez l'homme, Ets-1 est peu ou pas exprimée dans les tissus sains adultes alors qu'elle est fortement détectée dans les tissus cancéreux [30]. De nombreuses tumeurs solides, que ce soit des carcinomes ou bien des sarcomes, ainsi que certaines tumeurs circulantes présentent un taux élevé d'Ets-1 (au niveau ARNm ou protéine) [30].

L'expression d'Ets-1 est généralement associée à la progression tumorale *in vivo*, désignant Ets-1 comme un facteur de mauvais pronostic, notamment dans les carcinomes

mammaires [30], les carcinomes pulmonaires [262], les carcinomes colorectaux [263], les carcinomes pancréatiques [213], les carcinomes ovariens [264], les carcinomes du col de l'utérus [265], les carcinomes prostatiques [266], les mélanomes [267], les méningiomes [151] et les angiosarcomes de la peau [268].

Au niveau cellulaire, Ets-1 est impliquée dans de nombreux processus associés à la progression tumorale tels que la prolifération, la transformation, la migration, l'invasion de la MEC, la formation métastatique et la néo-angiogenèse.

De façon intéressante, l'isoforme Ets-1 p27 est exprimée de façon endogène, mais à de faibles taux, dans différents tissus et modèles cellulaires cancéreux et elle est capable (dans des conditions de surexpression) de réprimer le phénotype tumoral de cellules de carcinome mammaire invasif [20]. Etant donné les rôles physiologiques et pathologiques variés d'Ets-1 p51, la modulation du ratio Ets-1 p51/Ets-1 p27 devrait être déterminante dans de nombreux processus biologiques.

Quant à l'isoforme Ets-1 p42, elle n'est pas détectée dans des explants d'adénocarcinome mammaire au contraire d'Ets-1 p51 [29]. Etant donné que l'expression exogène d'Ets-1 p42 induit l'apoptose dans une lignée de carcinome mammaire invasif (MDA-MB-231), il est envisageable qu'elle puisse jouer un rôle antagoniste à celui d'Ets-1 p51 dans le processus de cancérisation.

II-1-2-b/ Rôle dans la prolifération et la transformation cancéreuse

Le statut de proto-oncoprotéine d'Ets-1 est synonyme de son rôle dans la transformation cellulaire. En effet, l'expression exogène d'Ets-1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris, NIH/3T3, suffit à induire leur transformation et à les rendre tumorigéniques chez l'animal [26].

De plus, lorsque l'activité d'Ets-1 est bloquée (grâce à l'utilisation d'un dominant négatif) dans des cellules de carcinome thyroïdien, la transformation est inhibée et la croissance est réduite de façon drastique [269]. L'extinction de l'expression d'Ets-1 dans des cellules de gliome est également responsable d'une réduction de leur prolifération [253]. Ceci est directement relié au rôle d'Ets-1 dans le cycle cellulaire (voir Chapitre V §I-6).

Par ailleurs, Ets-1 est capable de bloquer l'apoptose de cellules de carcinome thyroïdien, ce qui pourrait accroître leurs propriétés transformantes [269].

Enfin, Ets-1 pourrait participer à la transformation des lymphocytes T par le HTLV-1, puisqu'il favorise la transcription de son « enhancer » de concert avec une protéine majeure de ce virus, Tax-1 (voir Chapitre IV §II-3-1-h) [202].

II-1-2-c/ Rôle dans la migration cancéreuse

Ets-1 participe également à la migration cellulaire. Ainsi, il a été mis en évidence que l'utilisation d'un dominant négatif [270] ou d'ARNs antisens spécifiques [151] d'Ets-1 réduit la migration de cellules de gliome. Ceci s'accompagne d'une inhibition de la synthèse de l'intégrine α_v [270].

Les intégrines jouent un rôle crucial dans la migration des cellules cancéreuses à travers leur fonction de récepteurs des composants de la MEC. Dans des cellules de mélanome malin [198], la surexpression d'Ets-1 est également capable de promouvoir la migration, ce qui est associée à l'augmentation de la synthèse de l'intégrine β_3 . La migration cellulaire au cours de la tumorigenèse est une composante essentielle de l'agressivité tumorale.

II-1-2-d/ Rôle dans l'invasion cancéreuse

Le rôle d'Ets-1 dans l'invasion tumorale est suggéré par deux observations réalisées *in vivo* sur des explants de carcinomes : l'expression d'Ets-1 est plus abondante dans les tumeurs invasives que dans les tumeurs *in situ*, et elle prédomine dans les fibroblastes du stroma [271, 272]. Dans ces explants, la synthèse d'Ets-1 est corrélée à celle de nombreuses protéases matricielles impliquées dans la dégradation d'un grand nombre de composants de la MEC. Ainsi, il est rapporté qu'Ets-1 est co-exprimée *in vivo* : (1) avec la collagénase-1 et la gélatinase-B dans le stroma de carcinomes colorectaux [273], ovariens [274] et mammaires [275], (2) avec l'uPA au sein de carcinomes mammaires [29], (3) avec la gélatinase-A dans le stroma de carcinomes ovariens [236] et (4) avec la stromélysine-1 dans le stroma d'adénocarcinomes de colon, et de carcinomes pulmonaires, mammaires et thyroïdiens [276]. L'ensemble des gènes codant ces protéases matricielles est régulé de façon directe par Ets-1 [29, 107, 129, 157, 277]. D'ailleurs, l'utilisation d'un dominant négatif interférant avec les propriétés d'Ets-1 affecte les capacités invasives de différents modèles cellulaires. Tout d'abord, elle réduit le potentiel des cellules de gliomes, U251, à envahir un gel de collagène en 3-dimensions, support simulant la MEC [278]. De plus, elle bloque la capacité des cellules de carcinome thyroïdien à former des tumeurs après xénotransplantation chez la souris [269]. Ces données illustrent bien le rôle d'Ets-1 dans l'invasion tumorale.

II-1-2-e/ Rôle dans la formation de métastases

L'activité tumorigène d'Ets-1 est directement liée à la formation de métastases. En effet, des études menées sur des cellules de gliome exprimant un dominant négatif d'Ets-1 montrent que la répression de l'activité d'Ets-1 réduit la capacité de ces cellules à développer des métastases hépatiques après injection dans la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulet [270].

Les propriétés d'Ets-1 dans ce processus résulte de la régulation de certains gènes cibles. Ainsi, le gène de la PTHrP, cible d'Ets-1, code une protéine exprimée par des tumeurs mammaires agressives dans lesquelles elle promeut la dissémination métastatique au niveau de l'os [279]. D'ailleurs, Ets-1 facilite la croissance des cellules de cancer du sein dans le microenvironnement osseux en stimulant l'ostéolyse [280]. Le modèle suivant concernant le rôle d'Ets-1 dans ce processus a été décrit : les cellules de cancer du sein exprimeraient de façon précoce l'IL-8, dont la transcription est activée par Ets-1, pour initier la dégradation osseuse (par activation des neutrophiles), alors que la PTHrP, détectée plus tardivement, serait responsable du maintien du cycle de destruction osseuse [281].

De plus, il est à noter que la transcription d'une enzyme impliquée dans la formation de métastases dans certains types de carcinomes, la N-acétyl-glucosaminyl-transférase V, est sous la dépendance d'Ets-1 [282, 283].

II-1-2-f/ Rôle dans la néo-angiogenèse cancéreuse

En plus d'agir de façon directe sur les capacités prolifératives, migratoires et invasives des cellules cancéreuses, Ets-1 contrôle l'environnement tumoral en favorisant la néo-angiogenèse. En effet, l'expression d'Ets-1 est détectée *in vivo* dans les vaisseaux qui irriguent diverses tumeurs [284], notamment celles de l'ovaire [285], du col de l'utérus [265] et de l'endomètre [286]. Celle-ci est corrélée avec la synthèse de VEGF ou de VEGFR-1 dans les vaisseaux de certains carcinomes [219, 287].

Le rôle d'Ets-1 dans la néo-angiogenèse tumorale, comme dans l'angiogenèse physiologique, est dû : (1) à l'induction de son expression par des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et (2) à sa capacité à réguler de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules endothéliales (voir Chapitre V §I-3-2-b).

II-2/ Autres pathologies

L'induction de l'expression d'Ets-1 par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1- α / β ou le TNF- α) ainsi que sa capacité à activer la synthèse de protéases matricielles (collagénase-1, gélatinase-B, stromélysine-1 et uPA, entre autres) font de cette protéine un acteur important dans certaines maladies inflammatoires et invasives.

II-2-1/ Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale s'accompagnant d'une dégradation du cartilage articulaire. *In vivo*, les tissus de patients atteints de cette pathologie expriment Ets-1 au niveau des fibroblastes composant la membrane synoviale, mais également au niveau des macrophages et des cellules endothéliales [152].

Dans des cellules synoviales de patients touchés par l'arthrite rhumatoïde, l'expression d'Ets-1 est corrélée à une augmentation de la collagénase-1, de la collagénase-3 et de la stromélysine-1, cibles transcriptionnelles d'Ets-1 [101].

II-2-2/ Pathologies rénales

La protéine Ets-1 est synthétisée dans le rein au cours de l'embryogenèse mais devient indétectable chez l'adulte [232], sauf dans certaines pathologies. En effet, Ets-1 est associée à la progression d'une maladie inflammatoire des glomérules rénaux, la glomérulonéphrite [268]. Son rôle dans cette pathologie est lié, entre autres, à sa capacité d'induire la synthèse de MMPs.

II-2-3/ Athérosclérose

Un rôle d'Ets-1 dans l'athérosclérose a été proposé sur la base de son action dans les processus de dé-différenciation et de prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, SVMC. En effet, Ets-1 est responsable (voir Chapitre V §I-3) : (1) de la diminution de la synthèse de marqueurs de différenciation de ces cellules (SM α -actine) et (2) de la stimulation de l'expression de certains gènes codant des facteurs favorisant leur prolifération (PDGF-A et PDGF-D). De manière intéressante, Ets-1 est détectée dans l'aorte d'un modèle murin d'athérosclérose en association avec le TNF- α et Erk-1/-2 phosphorylées [138].

L'exposé des rôles biologiques d'Ets-1 met en évidence un lien indéniable entre la fonction de ce facteur et ses propriétés transcriptionnelles. Cependant, la capacité d'Ets-1 à réguler certains gènes, tels que celui de la présiniline-1, laisse suggérer l'implication d'Ets-1 dans d'autres processus pathologiques, tels que le développement de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins à l'heure actuelle, aucune étude ne permet de confirmer un lien de cause à effet entre Ets-1 et le développement de cette pathologie.

Il ressort également de l'étude bibliographique exposée dans ce Chapitre, la fonction polyvalente d'Ets-1 dans divers aspects de la cancérisation. Ceci est d'ailleurs à l'origine du terme oncoprotéine fréquemment utilisé pour la désigner. Par conséquent, Ets-1 constitue une cible dont la répression pourrait bloquer ou freiner la progression tumorale.

DEUXIEME PARTIE : L'apoptose

CHAPITRE I : Définition et description de l'apoptose

I/ Définition

Le terme apoptose d'origine grecque, désigne la chute des feuilles d'un arbre en automne. Il a été proposé par Kerr et al. en 1972 pour décrire la mort programmée dans l'organisme, qui survient dans certains organes au cours de l'ontogenèse (développement d'un organisme à partir de l'œuf jusqu'à l'âge adulte) [288]. Ce processus de mort cellulaire représente une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro- ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante.

II/ Description de l'apoptose

L'apoptose se caractérise par des aspects morphologiques spécifiques la distinguant des autres types de mort cellulaire (nécrose, autophagie) et par une machinerie moléculaire particulière.

II-1/ Caractéristiques morphologiques

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques, qui permettent d'identifier ce type de mort cellulaire. Ces changements morphologiques se font en deux étapes (Figure 32):

1) Condensation de la chromatine associée à une agglomération des organites cytoplasmiques et particulièrement des mitochondries. La cellule s'arrondit, diminue de volume, se densifie et se détache des cellules voisines [288, 289].

2) la fragmentation du noyau et du cytoplasme en corps apoptotiques enveloppés d'une double membrane nucléaire et cellulaire. Ces corps apoptotiques s'individualisent les uns des autres pour être ensuite ingérés par les cellules voisines ou les phagocytes environnants, sans aucune réaction inflammatoire lymphocytaire ou polynucléaire (Figure 32). En effet, la formation de corps apoptotiques avec une membrane plasmique intacte prévient le relargage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire. A

terme, cette mort cellulaire, discrète et silencieuse, se déroule en quelques heures et ne laisse aucune trace [288, 289].

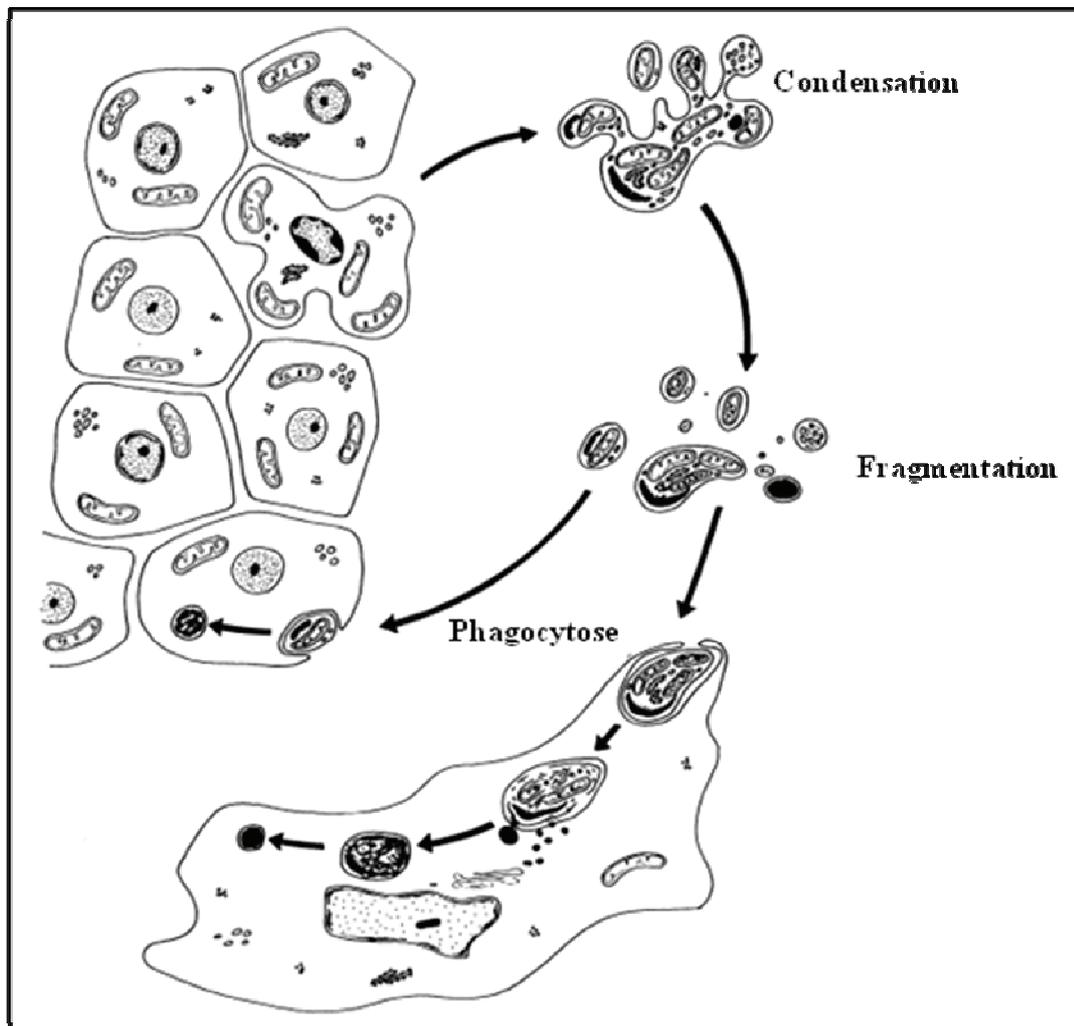


Figure 30 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

L'apoptose correspond à une rétraction progressive de la cellule avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation du noyau et du cytoplasme en corps apoptotiques. D'après [288].

Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, qui aboutit à un éclatement de la cellule. La nécrose survient accidentellement lorsque la cellule a subi des dommages importants, qui peuvent être produits par l'exposition à de très fortes doses d'agents cytotoxiques [290].

II-2/ Caractéristiques biochimiques

La traduction biochimique la plus marquante de la mort apoptotique est le clivage enzymatique de l'ADN nucléaire entre les nucléosomes, qui survient lors de la condensation de la chromatine. Ce clivage génère des fragments réguliers d'environ 180-200 paires de

bases, taille de l'ADN d'un nucléosome [291]. De plus, les phosphatidylsérines, phospholipides présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules normales, se déplacent dans le feuillet externe pour être exposés à la surface de la cellule apoptotique [292, 293]. Ceci permet à ces cellules d'être reconnues par les macrophages pour la phagocytose [294]. Une autre caractéristique de l'apoptose, pas moins importante, est le clivage de certaines protéines cellulaires par des protéases spécifiques de la machinerie apoptotique, les caspases [295]. Cette protéolyse a comme conséquence soit l'activation ou l'inactivation des protéines cibles. Ceci participe, dans certains cas, à l'amplification de la mort cellulaire programmée.

Les modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose sont déclenchées par des mécanismes moléculaires hautement régulés. Nous tenterons donc, dans les Chapitres suivants, de mettre en lumière ces mécanismes, ainsi que ses principaux acteurs.

CHAPITRE II : Déroulement de l'apoptose

Le processus apoptotique se déroule en trois phases successives :

1) **Phase d'initiation ou d'induction** : c'est une phase réversible correspondant à la réception par les cellules des signaux inducteurs d'apoptose.

2) **Phase effectrice ou d'exécution** : c'est une phase régulable correspondant à l'intégration du signal apoptotique et l'activation des caspases.

3) **Phase de dégradation** : c'est une phase irréversible correspondant à l'étape où le processus apoptotique est enclenché de manière irrémédiable. Cette étape marque le début de la phase de destruction cellulaire avec les caractéristiques morphologiques et biochimiques précédemment décrites.

I/ Phase d'induction

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose :

1) **La voie extrinsèque** : encore appelée voie des récepteurs de mort, est initiée au niveau de la membrane plasmique cellulaire par l'activation de récepteurs de mort, membres de la famille des récepteurs du TNF-R (« tumor necrosis factor-receptor »), tels que : (i) le récepteur TNF-R1 du TNF- α , (ii) le récepteur Fas (encore appelé Apo-1 ou CD95) du FasL et (iii) les récepteurs DR4 (« death receptor 4») et DR5 du TRAIL (« TNF-related apoptosis inducing ligand ») [296].

2) **La voie intrinsèque** : encore appelée voie mitochondriale, est induite par des signaux de stress cellulaire, tels que : (i) l'exposition à des radiations UV, (ii) une irradiation γ , (iii) des dommages à l'ADN, (iv) une carence en facteurs de survie ou encore (v) suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseur de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimio-thérapeutiques [297, 298].

Ces deux voies de signalisation conduisent au phénomène central de l'apoptose qui est l'activation de la cascade des caspases.

I-1/ La voie des récepteurs de mort

Les récepteurs de la famille TNF-R sont caractérisés par un domaine extracellulaire conservé riche en cystéines et un domaine intracellulaire appelé domaine de mort (« death

domain » ou DD) (Figure 33). Après fixation de leur ligand respectif, les récepteurs de mort se trimérisent et recrutent grâce à leur domaine de mort DD, une protéine dite adaptatrice, la protéine FADD (« Fas-associated death domain »), soit directement (pour les récepteurs Fas, DR4 et DR5) soit indirectement par l'intermédiaire de TRADD (« TNFR-associated death domain ») (pour le récepteur TNF-R1) [299-302]. La protéine FADD recrute à son tour les caspases initiateuses inactives, les procaspases-8 ou -10, et ce *via* le domaine effecteur de mort, le domaine DED (« death effector domain ») présents à la fois sur FADD et sur les caspases initiateuses [303, 304] (Figure 33). Le complexe multiprotéique formé à la membrane plasmique porte le nom de DISC (« death-inducing signaling complex ») [305].

Les caspases initiateuses (procaspases) vont ensuite s'activer par auto-clivage et activent en aval d'autres caspases, dites effectrices qui vont finalement cliver des protéines cellulaires bien définies conduisant aux caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose.

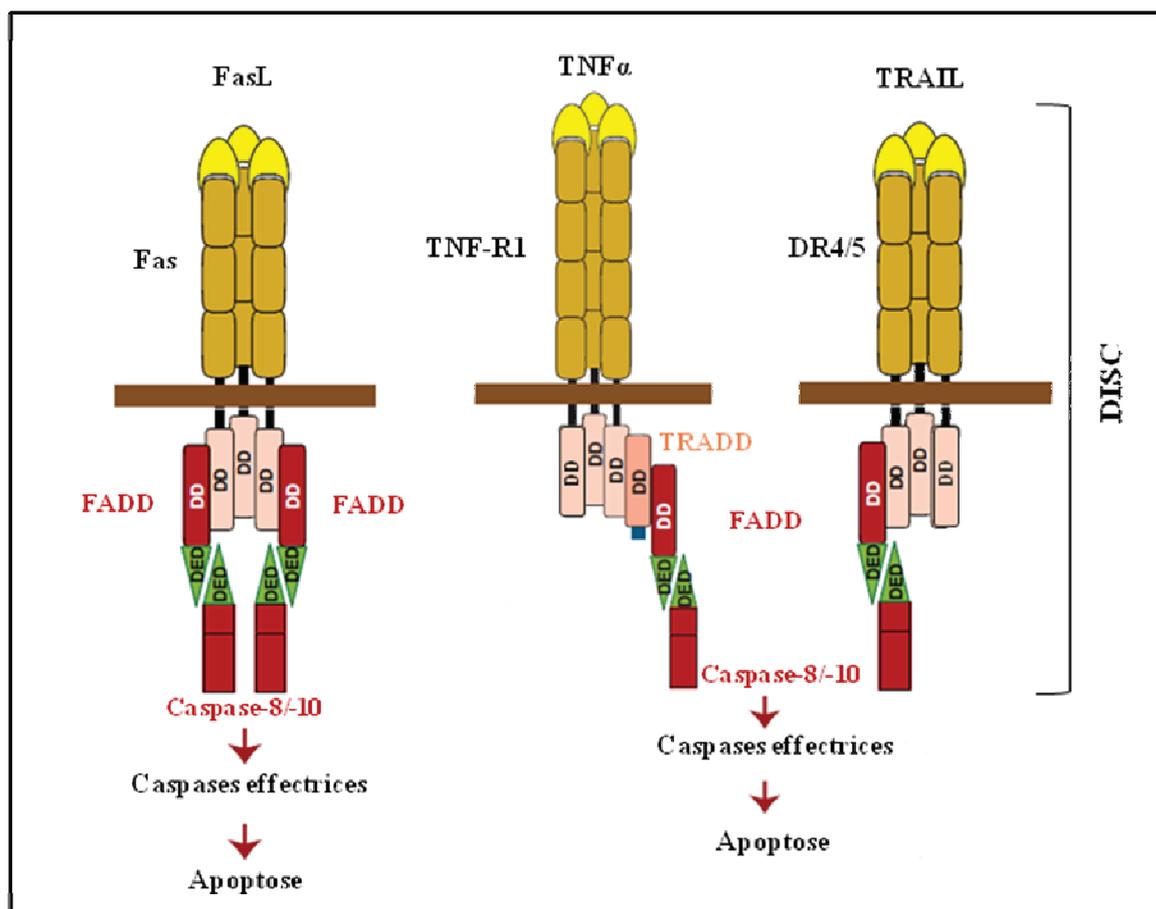


Figure 31 : La voie extrinsèque de l'apoptose ou la voie des récepteurs de mort.

Après fixation de leur ligand respectif, les récepteurs de mort se trimérisent et recrutent grâce à leur domaine de mort (DD) la protéine FADD, soit directement (Fas, DR4/5) soit indirectement par l'intermédiaire de TRADD (TNF-R1). Les protéines FADD recrutent, grâce à leur domaine effecteur de mort (DED en vert), les caspases initiateuses, les procaspases-8 ou -10, formant ainsi un complexe appelé DISC. Les procaspases-8 ou -10 s'activent par auto-clivage et activent à leur tour les caspases effectrices. D'après [296].

I-2/ La voie mitochondriale

Dans cette voie d'induction par des signaux de stress cellulaire, la membrane mitochondriale devient perméable, ce qui entraîne la libération dans le cytosol de molécules apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire mitochondriale. Il s'agit de cytochrome c, de Smac/Diablo (« second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI ») [306], d'AIF (« apoptosis-inducing factor ») [307], d'Omi/HtrA2 (« Omi/high temperature requirement protein A2 ») [308] et de l'Endonucléase G [309] (Figure 34).

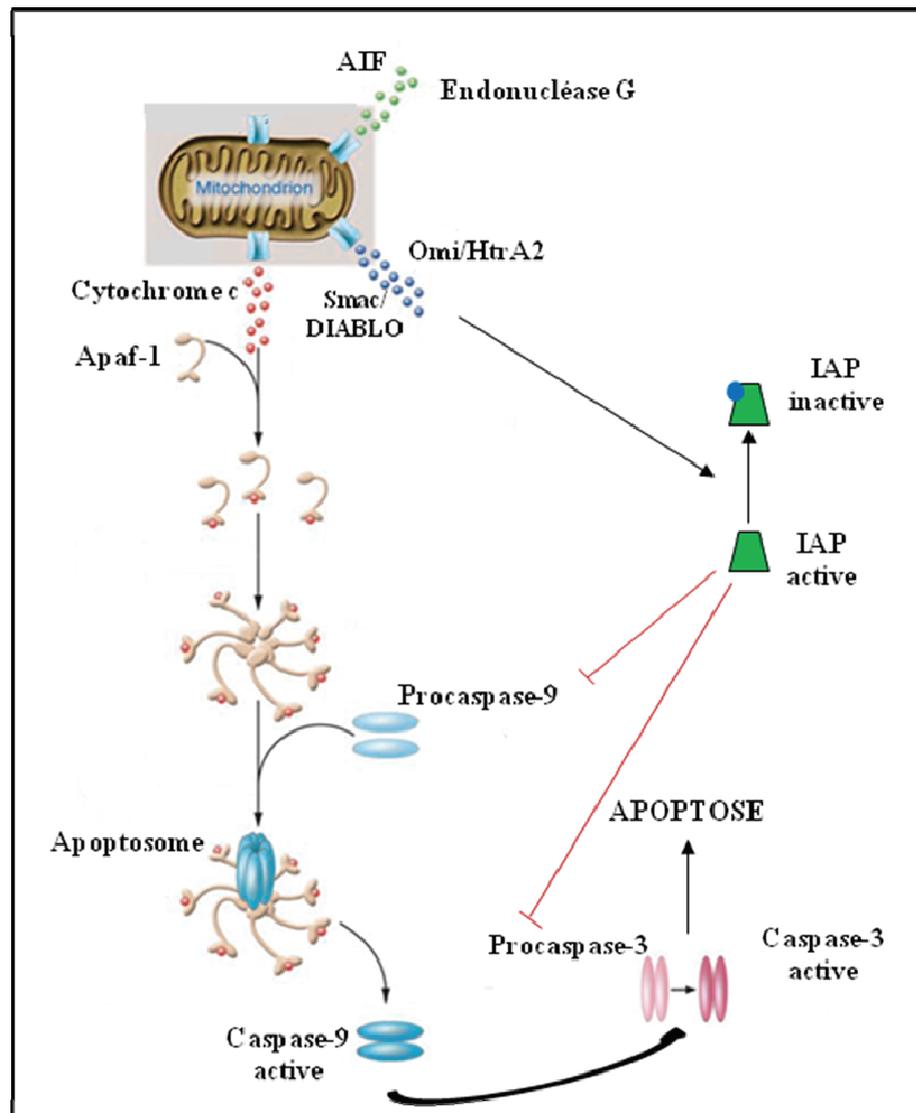


Figure 32 : La voie intrinsèque de l'apoptose ou la voie mitochondriale.

L'induction de l'apoptose engendre la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale permettant le relargage dans le cytoplasme de cytochrome c, de Smac/Diablo, d'AIF, d'Omi/HtrA2 et de l'Endonucléase G. Le cytochrome c se fixe à Apaf1, qui à son tour fixe les procaspases-9, formant un complexe appelé « Apoptosome ». Ce dernier génère la caspase-9 active qui active à son tour la procaspase-3. Les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 se fixent aux IAPs et empêchent leur rôle d'inhibition de la maturation des procaspases-9 et -3. L'AIF et l'Endonucléase G, relarguées de la mitochondrie, migrent vers le noyau pour cliver l'ADN. D'après [310].

Une fois relargué de la mitochondrie, le cytochrome c va se fixer à une protéine adaptatrice équivalente à FADD de la voie extrinsèque : la protéine Apaf-1 (« apoptotic protease activating factor-1 ») et va l'activer [311, 312]. Une fois activée, Apaf-1 est capable de se lier à la procaspase-9. Il se forme alors un complexe trimoléculaire appelé « Apoptosome » constitué par le cytochrome-c/Apaf-1/procaspase-9 qui permet, par un mécanisme de protéolyse, l'activation de la procaspase-9 [311, 313]. La caspase-9 active pourra à son tour activer d'autres caspases effectrices, notamment la caspase-3 [312].

Les protéines mitochondriales Smac/Diablo et Omi/HtrA2 une fois libérées se fixent aux IAPs, protéines inhibitrices de la maturation des procaspases-3 et -9 (Figure 34). Ceci conduit à l'inactivation des IAPs, empêchant ainsi l'inhibition de la maturation des procaspases-3 et -9 [314]. L'AIF et l'Endonucléase G, relarguées de la mitochondrie, migrent vers le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire et clivent l'ADN en plusieurs fragments (Figure 34) [307, 309].

II/ Phase d'exécution

En dépit de la diversité des signaux inducteurs d'apoptose, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Cette signalisation aboutit alors à l'activation irréversible des caspases effectrices. L'activation de ces caspases est induite par un phénomène de cascade qui va amplifier la réponse de la cellule au stimulus initial.

Etant donné le rôle important joué par les caspases dans le processus apoptotique, nous essayerons dans le Chapitre suivant d'expliquer plus en profondeur les caspases, leur structure, leur activation et surtout leurs substrats.

CHAPITRE III : Les Caspases

I / Définition

Les caspases sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartate (D), d'où leur nom générique cysteinyl-aspartate-specific protease [295]. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces [315].

Les caspases ont été découvertes par l'étude de l'apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, dont une partie de ses cellules est éliminée par apoptose durant le développement. L'analyse génétique de ces cellules a permis de mettre en évidence trois gènes clés impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée : *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (« *Caenorhabditis elegans death* »). Les gènes *ced-3* et *ced-4* sont nécessaires pour l'exécution de l'apoptose, alors que *ced-9* protège de l'apoptose [316]. Des homologues de ces gènes, ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose, ont été découverts chez les mammifères. Ainsi, l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β , ICE des mammifères, présente des homologies avec la protéine CED-3 et sa surexpression est capable d'induire l'apoptose dans les cellules de mammifères [317]. Bien qu'elle ne semble pas jouer de rôle primordial dans l'apoptose et qu'elle soit plutôt impliquée dans le déroulement du processus inflammatoire, la protéine ICE a permis d'identifier une famille de protéases à cystéine, les caspases, qui sont responsables de l'exécution du processus apoptotique chez les mammifères. L'ICE, qui fut chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été tout naturellement rebaptisée caspase-1 [295].

II/ Classification

A ce jour, la famille des caspases comporte 14 membres chez les mammifères. Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14 ont été mises en évidence chez l'homme. Les caspases-11 et -12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris et la caspase-13 est un homologue bovin de la caspase-4 [318, 319]. Cependant, il existe chez l'homme une « pseudo-caspase-12 » non fonctionnelle exprimée par un gène portant plusieurs mutations ponctuelles [320]. Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat.

Les caspases peuvent être subdivisées en trois grands groupes selon leur fonction biologique (Figure 35).

Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5 qui contrôlent les réponses inflammatoires et ne jouent pas de rôle important dans l'apoptose. La caspase-14 intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme [321]. Les deux autres groupes sont constitués des caspases impliquées dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices (caspases-2, -9, -8 et -10), qui sont activées suite à des signaux extra- ou intracellulaires et d'autre part les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), qui sont activées par les caspases initiatrices. Ainsi, les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices.

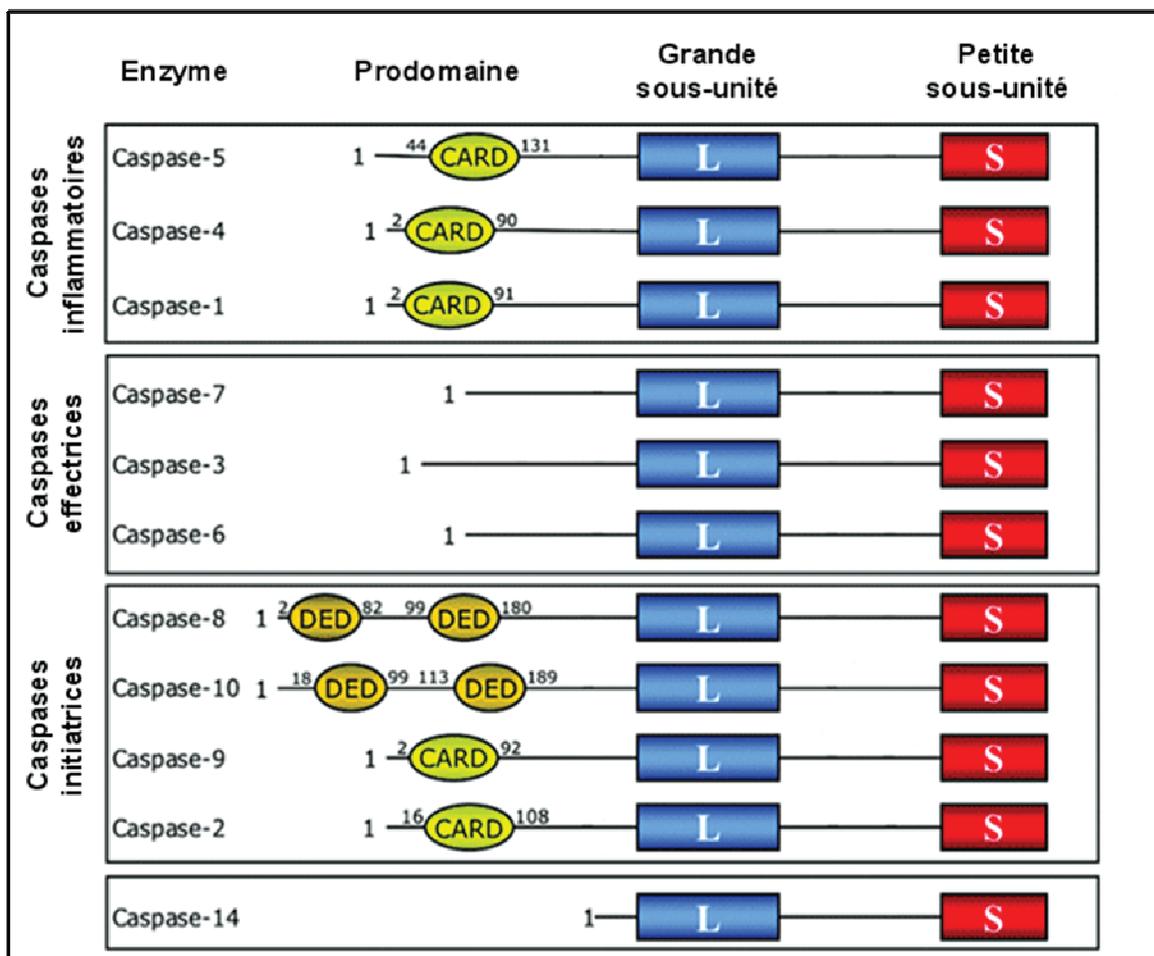


Figure 33 : Représentation des différents groupes des caspases humaines.

Les caspases de 1 à 10 ont été classées en trois groupes selon la distinction physiologique entre les caspases inflammatoires, initiatrices et effectrices. La caspase-14 est une caspase « non apoptotique ». Les domaines protéiques ont été représentés, à savoir la petite sous-unité (S) en rouge, la grande sous-unité (L) en bleu, le domaine CARD en jaune clair et le domaine DED en jaune foncé. D'après [322].

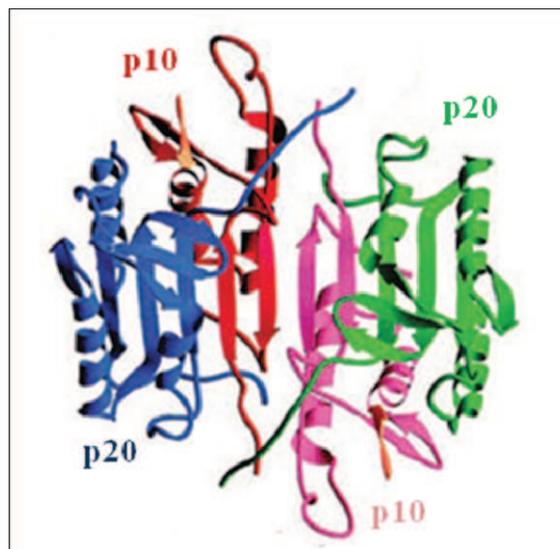
III/ Structure

Les caspases ont une structure très conservée. Elles sont exprimées sous forme de précurseurs inactifs, procaspases ou zymogènes, constitués de trois parties : un prodomaine à l'extrémité N-terminale, suivi d'une grande sous-unité (20 kDa) p20 et d'une petite sous-unité (10 kDa) p10. Ces deux sous-unités s'associent pour former un hétérodimère et deux hétérodimères s'associent pour former un tétramère, qui est la forme active des caspases (Figure 36). Chaque hétérodimère p20/p10 est formé principalement de feuillettes β parallèles pris en sandwich par des hélices α . Deux hétérodimères interagissent de façon antiparallèle formant ainsi un seul feuillet β à 12 brins.

Chaque grande sous-unité p20 contient un site catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine (C) inclus dans une séquence peptidique de type QACxG (où x est une arginine (R), une glutamine (Q) ou une glycine (G)). Ce site est spécifique des membres de la famille des caspases qui leur confère leur activité enzymatique [1].

Figure 34 : Structure tridimensionnelle de la caspase-3 humaine active.

La caspase-3 active est un tétramère composé de deux hétérodimères p20/p10 (un en Bleu et rouge, l'autre en vert et rose). Chaque hétérodimère est constitué des deux sous-unités p20 (en bleu et en vert) et p10 (en rouge et rose). D'après [1].



Les caspases initiatrices possèdent généralement un long prodomaine contenant un des deux motifs caractéristiques (Figure 35) : DED (caspases-8 et -10) ou CARD (« caspases recruitment domain ») (caspases-2 et -9) [323]. Ces domaines permettent l'interaction avec d'autres protéines résultant ainsi à l'activation de ces caspases. Ainsi, le domaine DED permet la liaison aux protéines adaptatrices FADD ou TRADD (voir Partie 2, Chapitre II §I-1) et le domaine CARD permet l'interaction entre caspases, ainsi qu'avec une grande variété de protéines adaptatrices ou régulatrices. Les caspases effectrices-3, -6 et -7 sont caractérisées

par un prodomaine de petite taille et sont responsables du clivage d'un certain nombre de protéines dans la cellule (Figure 35).

IV/ Activation

La cellule utilise trois mécanismes distincts pour activer les caspases : (1) activation par d'autres caspases, (2) activation par proximité induite et (3) activation par association avec une sous-unité activatrice [324].

IV-1/ Activation par d'autres caspases

Ce mécanisme est utilisé pour l'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices et est à l'origine de la cascade de caspases, qui a également pour but d'amplifier le signal apoptotique. La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une caspase mature active nécessite deux clivages protéolytiques en aval d'un résidu aspartate (Figure 37) : (1) un clivage entre la grande et la petite sous-unité libérant la petite sous-unité du reste de la protéine et (2) un deuxième clivage entre le prodomaine et la grande sous-unité, qui libère le prodomaine. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active composée de deux grandes et de petites sous-unités avec deux sites QACxG actifs par dimère [325, 326].

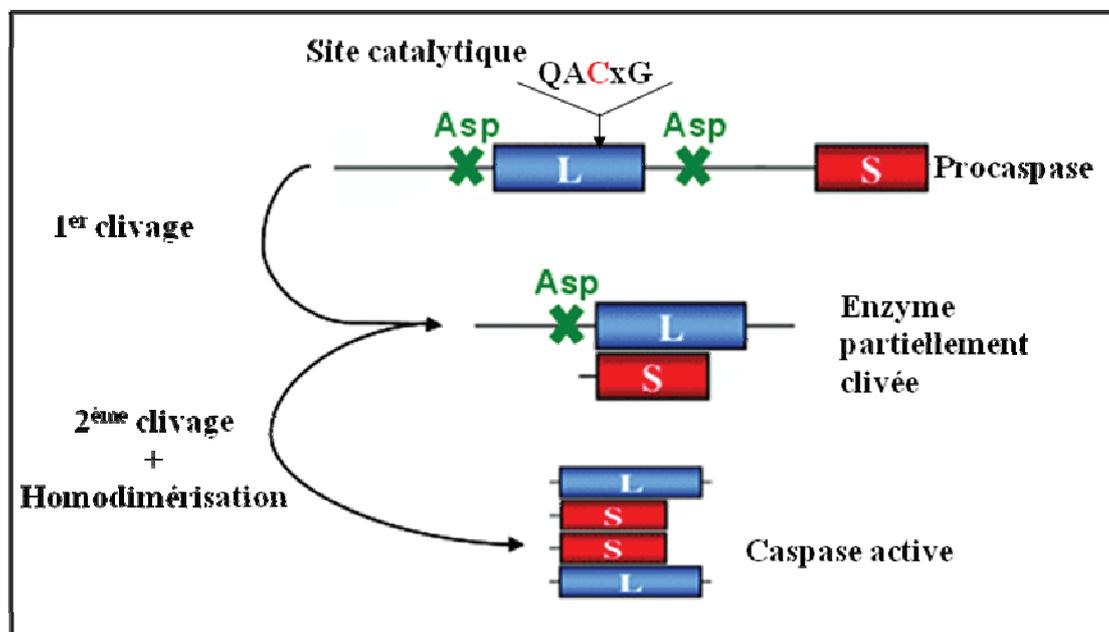


Figure 35 : Activation des caspases par d'autres caspases.

Dans leur forme inactive (procaspases), ces enzymes sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité (L) (portant le site catalytique) et d'une petite sous-unité (S). Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande, conduit à la formation de la forme active de l'enzyme. Celle-ci est composée de deux grandes et de petites sous-unités avec deux sites QACxG actifs par dimère. D'après [322].

Les autres mécanismes d'activation concernent uniquement les caspases initiatrices. Ils sont provoqués par des interactions avec des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique.

IV-2/ Activation par proximité induite

Cette activation est due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs procaspases favorisant ainsi leur auto-activation. Ceci a été observé pour la caspase-8 lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Ces récepteurs, une fois activés, sont à l'origine d'un regroupement de procaspases-8. Cette haute concentration locale de précurseurs ainsi que la présence d'une faible activité intrinsèque de ceux-ci leur permet de s'auto-activer. Les caspases-10 et -2 sont activées de façon similaire [327, 328].

IV-3/ Activation par association avec une sous-unité activatrice

L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité activatrice. C'est le cas de la procaspase-9. En effet, l'activation de cette dernière nécessite l'interaction avec les cofacteurs Apaf-1 et le cytochrome c, pour former un complexe multiprotéique, l'apoptosome (voir Partie 2, Chapitre II §I-2) [311, 312]. La formation de ce complexe s'effectue en deux étapes, et ce suite à la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme. On assiste d'abord à un changement de conformation d'Apaf-1, grâce à sa liaison avec le cytochrome c [329]. Puis, sept sous-unités d'Apaf-1 s'oligomérisent et recrutent plusieurs procaspases-9 qui vont alors être activées par changement conformationnel [330] (Figure 34).

En résumé, les caspases sont activées en réponse aux deux voies de signalisation intra- et extrinsèque. Ces deux voies provoquent le clivage de caspases initiatrices spécifiques de chaque voie par des interactions protéiques. Ces caspases initiatrices vont ensuite cliver en cascade les caspases effectrices identiques pour les deux voies (Figure 38).

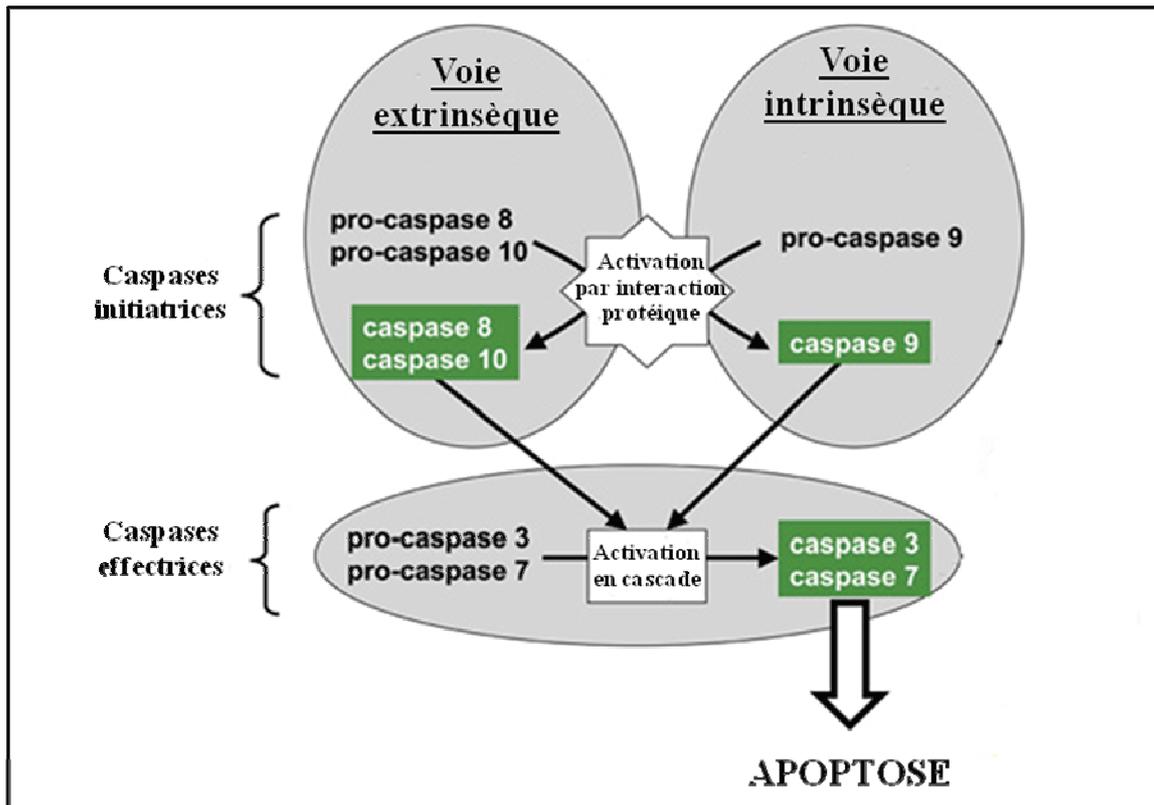


Figure 36 : Schéma récapitulatif des deux voies d'activation des caspases au cours de l'apoptose, et de leur interconnexion.

Les caspases initiatrices des deux voies extrinsèque et intrinsèque sont activées par des interactions protéine-protéine pour activer les caspases effectrices communes aux deux voies. Ceci aboutit au déclenchement de la phase de dégradation avec les caractéristiques morphologiques et biochimiques précédemment décrites. D'après [322].

V/ Substrats

V-1/ Sites de clivage par les caspases

Au cours de la mort cellulaire, l'activation des caspases conduit au clivage d'un grand nombre de protéines cellulaires aboutissant au démantèlement de la cellule et à sa mort. Néanmoins, il ne se produit pas une digestion aléatoire des protéines cellulaires. Les caspases possèdent une spécificité de substrats qui repose sur la reconnaissance d'une séquence térapeptidique P4-P3-P2-P1 bien définie. L'acide aminé en position P1 est une aspartate (D) après laquelle le clivage aura lieu [331, 332]. Les deux résidus P2 et P3 ont un effet limité sur le clivage du substrat [331]. En revanche, le résidu P4 est important pour les spécificités des différentes caspases.

Ainsi, les caspases humaines sont divisées en trois groupes selon leur site spécifique de reconnaissance du substrat (Tableau 6) :

- groupe I, qui inclut les caspases-1, -4 et -5, reconnaissant une séquence consensus optimale WEHD,

- groupe II, constitué des caspases-2, -3 et -7, reconnaissant une séquence optimale DEXD (où X est un acide aminé quelconque),

- groupe III, constitué des caspases-6, -8, -9 et -10, possédant une préférence pour le site (I/V/L)EXD (où X est un acide aminé quelconque).

Le clivage par les caspases n'entraîne donc pas la dégradation de l'ensemble des protéines cellulaires [333].

Groupe	Enzyme	P4-P3-P2-P1	Consensus optimal
Groupe I	Caspase-1	W E H D	WEHD
	Caspase-4	(W/L) E H D	
	Caspase-5	(W/L) E H D	
Groupe II	Caspase-2	D E H D	DEXD
	Caspase-3	D E V D	
	Caspase-7	D E V D	
Groupe III	Caspase-6	V E H D	(I/V/L)EXD
	Caspase-8	L E T D	
	Caspase-9	L E H D	
	Caspase-10	L E X D	

Tableau 6 : Spécificités de substrat des caspases humaines.

X est un acide aminé quelconque. D'après [333].

V-2/ Les substrats des caspases

Les caspases clivent un très grand nombre de protéines impliquées dans des fonctions variées. Le Tableau 7 montre les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose. Ces protéines cibles regroupent des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, ainsi que des kinases. Des protéines impliquées dans la transduction du signal, l'expression de gènes, la régulation du cycle cellulaire, les maladies génétiques ou des protéines de régulation de l'apoptose sont aussi substrats des caspases [334].

Classe de substrat	Exemples
Régulateurs de l'apoptose	Bad, Bcl-2, Bcl-xL, Procaspases...
Adhésion cellulaire	β -caténine, E-cadhérine, Desmoglénine-3...
Cytosquelette et protéines structurales	Lamine, α -Actine, Kératine, α -Tubuline...
Cycle cellulaire	Cycline A, Cdc-27,c-Abl...
Synthèse, clivage et réparation de l'ADN	ICAD, ATM, DNA-PKcs, PARP-1...
Facteurs de transcription	FLI-1, Sp1, Stat-1...
Métabolisme de l'ARN	Nucléoline, hnRNPs, RHA...
Cytokines	Pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-IL-16...
Récepteurs membranaires	EGF-R, RET...
Transduction du signal	CaMK II α , PKC, PP2A...
Neurodégénérescence	Ataxine-3, Huntington, APLP1...
Protéines virales	CrmA, p35...

Tableau 7 : Exemples de substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose.
D'après [334].

Dans la plupart des cas, le clivage de ces protéines conduit à leur inactivation, avec une perte de leur activité biologique. Néanmoins, dans certains cas, la protéolyse par les caspases peut se traduire par un gain de fonction.

V-2-1/ Perte de fonction

Les caspases sont à l'origine de la dissociation de certains constituants cellulaires par clivage de protéines de structure, comme les lamines nucléaires dont la dégradation par la caspase-6 conduit à l'altération de la membrane nucléaire [335]. Ces protéases induisent également une désorganisation du cytosquelette, notamment par clivage des protéines constituant les filaments intermédiaires comme la kératine-18 [336]. Des protéines des jonctions adhérentes assurant les interactions entre les cellules, comme la β -caténine, sont aussi dégradées par les caspases [337].

Les caspases inactivent aussi des protéines de réparation de l'ADN comme la PARP-1 (« poly (ADP-ribose) polymérase-1 ») [338] ou Rad51 [339], des protéines de régulation du cycle cellulaire [340] et des protéines de transduction de signaux comme AKT (aussi appelée protéine kinase B) qui une fois clivée, n'exerce plus sa fonction de facteur de survie [341].

Le clivage de certaines protéines par les caspases conduit à une conversion de leur fonction. C'est le cas de protéines anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases, FLIP (« FLICE-like inhibitory protein ») et IAP [342] ou les protéines Bcl-2 et Bcl-XL (« Bcl-extra large »), dont le clivage résulte en la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques [343].

Plusieurs facteurs de transcription sont inactivés pendant l'apoptose. C'est l'exemple de CREB, HSF-1 (« heat shock factor protein-1 ») et NFκB. Ainsi, le clivage de la sous-unité p65 de NFκB génère un fragment qui est encore capable de se lier à l'ADN, mais perd ses activités transcriptionnelles, jouant ainsi un rôle de dominant négatif [344].

Un autre exemple de facteurs de transcription substrats des caspases est celui de Fli-1, membre de la famille Ets [345]. Les conséquences de ce clivage sur les propriétés de cette protéine ne sont pas connues. Néanmoins, étant donné les fonctions anti-apoptotiques de Fli-1, nous suggérons que son clivage participe à l'amplification de la mort cellulaire.

V-2-2/ Gain de fonction

Les caspases peuvent également induire un gain de fonction de certaines protéines pro-apoptotiques, soit directement, comme c'est le cas des caspases elles-mêmes ou la protéine Bid qui n'est active qu'après clivage, soit indirectement par dissociation de domaines régulateurs ou inhibiteurs. Ainsi, la protéine CAD (« caspase-activated DNase ») est associée dans le cytosol à une protéine inhibitrice appelée ICAD (« inhibitor of caspase-activated DNase »). Le clivage d'ICAD libère CAD qui pénètre dans le noyau et clive l'ADN [346].

Il est toutefois à noter que certains substrats ne sont pas clivés dans tous les types cellulaires. L'actine, par exemple, est clivée dans la lignée myélomonocytaire U937 [347], dans les neurones et dans les thymocytes [348], mais pas dans les autres types cellulaires durant l'exécution du programme apoptotique [349, 350]. De plus, certains substrats sont clivés à des sites différents selon le type cellulaire. Ainsi, la topoisomérase I a un profil de clivage différent selon qu'il s'agisse de cellules de cancer de poumon (A549) ou de cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) [282]. Cette hétérogénéité pourrait soit refléter l'activation de caspases différentes, soit des variations dans l'accessibilité des substrats par les protéases, soit une combinaison des deux.

Les données exposées jusqu'à maintenant fournissent des informations sur le déroulement de l'apoptose ainsi que ses principaux acteurs. Néanmoins, ce processus est sous le contrôle de nombreuses protéines le régulant négativement, pour éviter son déclenchement de façon inopinée, ou positivement, pour amplifier la mort cellulaire. Ceci sera abordé dans le Chapitre suivant.

CHAPITRE IV : Régulation de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène hautement régulé. A chaque étape de l'apoptose, il existe des molécules pro- ou anti-apoptotiques qui régulent le système et permettent à la cellule de survivre ou de mourir. Ainsi, comme nous avons montré précédemment, les caspases représentent les principaux effecteurs de l'apoptose. Elles sont donc parmi les cibles les plus importantes des mécanismes de régulation initiant ou bloquant l'apoptose.

I/ Régulation transcriptionnelle

Bien que l'apoptose, dans la majorité des types cellulaires, ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines [351], plusieurs observations suggèrent que la régulation de l'expression des gènes de procaspases puisse avoir une importance dans certaines conditions. La caspase-3, par exemple, est fortement exprimée dans de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes matures, alors qu'elle n'est que faiblement présente dans l'épithélium mammaire et dans les neurones normaux [352]. De plus, le niveau d'expression des procaspases n'est pas statique. Des études ont décrit que dans des conditions d'induction de l'apoptose *in vitro*, des neurones exprimaient un niveau d'ARNm de la caspase-3 plus élevé [353].

L'interféron- γ est un des facteurs ayant une grande influence sur l'expression des gènes de plusieurs caspases. Un traitement des cellules U937 à l'interféron- γ augmente très sensiblement l'expression de caspases ainsi que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose [354].

II/ Régulation par des inhibiteurs

Afin d'éviter une activation intempestive des caspases qui pourrait avoir des conséquences dévastatrices, les caspases sont inhibées par différents inhibiteurs.

II-1/ Inhibiteurs naturels

II-1-1/ CrmA et p35

Les caspases sont régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus par élimination des cellules infectées. Certains virus ont donc développé des systèmes de résistance qui agissent sur les caspases et inhibent l'apoptose comme CrmA (« cytokine

response modifier A ») et p35. Ainsi, les protéines CrmA du virus de la vaccine (cowpox virus) et p35 exprimée par le baculovirus, empêchent l'activation des procaspases en masquant leur site de clivage. Comme chaque caspase peut en activer une autre et que l'apoptose est le résultat de cette cascade, CrmA et p35 inhibent tout le processus d'apoptose en bloquant la première étape [355-357].

II-1-2/ IAPs et FLIP

La famille des IAPs a été découverte initialement chez le baculovirus [358]. Tous les membres de cette famille portent une ou plusieurs copies du motif BIR (« baculovirus IAP repeats ») nécessaires pour lier et inactiver les caspases [359]. Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine, ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées [360]. Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 libérées par la mitochondrie pendant l'apoptose. Celles-ci se lient aux IAPs et les inhibent [314] (Figure 34).

Concernant la protéine FLIP, celle-ci régule l'activation de la voie extrinsèque. En effet, FLIP est un homologue inactif de la procaspase-8 qui présente des domaines DED permettant son recrutement au niveau des protéines adaptatrices FADD. FLIP entre alors en compétition avec la procaspase-8 et bloque le recrutement de cette dernière au niveau du complexe du récepteur de mort (voir Partie 2, Chapitre II §I-1) [361].

II-2/ Inhibiteurs peptidiques

Les chercheurs ont également développé des inhibiteurs peptidiques pour les caspases [362]. Ces inhibiteurs sont basés sur la spécificité du térapeptide P4-P3-P2-P1 du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase [363]. L'introduction au niveau de l'extrémité C-terminale de ce térapeptide d'un groupement aldéhyde ou d'un groupement méthylcétone permet la synthèse d'un inhibiteur, respectivement, réversible ou irréversible [364]. Ces inhibiteurs sont largement utilisés pour démontrer l'implication des caspases et de l'apoptose dans certains processus.

III/ Régulation par les membres de la famille Bcl-2

Les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Chez les mammifères, cette famille compte environ vingt

membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (« Bcl-2 homology domain »). Selon leur fonction et la présence des domaines BH, on distingue les membres anti-apoptotiques, qui constituent la sous-famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques, subdivisés en deux groupes : la sous-famille BAX et la sous-famille BH3 (tableau 8) [365].

Protéines anti-apoptotiques <u>Sous-famille BCL-2</u>	Bcl-2, Bcl-XL, A1 Bcl-W, Mcl-1
Protéines pro-apoptotiques <u>Sous-famille BAX</u> <u>Sous-famille BH3 (ou « BH3-only »)</u>	Bax, Bak, Bok Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma

Tableau 8 : Les principaux membres de la famille Bcl-2.
D'après [365].

La régulation de la mort programmée par cette famille passe principalement par la modulation de la voie apoptotique mitochondriale. Ainsi, les membres pro-apoptotiques, tels que Bax, Bik et tBid (la forme active de Bid) s'oligomérisent et s'intègrent dans la membrane mitochondriale, contribuant ainsi à la perméabilisation de la membrane externe et à la libération de protéines apoptogènes comme le cytochrome c dans le cytoplasme [366-369]. Au contraire, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 protègent les cellules de nombreux stimuli de mort cellulaire, en bloquant les pores mitochondriaux. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et aussi Bcl-XL, inhibent la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/procaspase-9 nécessaire au déclenchement de l'apoptose [370, 371].

La réponse cellulaire à un signal apoptotique dépend donc du ratio entre les membres pro- et anti-apoptotiques de cette famille.

D'après les données exposées dans les Chapitres précédents, nous concluons que le processus apoptotique met en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, qui est bien régulée. Néanmoins, quel est l'intérêt de l'existence d'un tel processus

dans l'organisme ? Et quelles sont les conséquences de la dérégulation de cette mort cellulaire programmée. Nous tenterons donc de brièvement illustrer cela en mettant en lumière les rôles biologiques de l'apoptose dans des contextes physiologiques et pathologiques. Ceci sera abordé dans le Chapitre suivant.

CHAPITRE V : Rôles biologiques de l'apoptose

I/ Rôles physiologiques

L'apoptose est essentielle au développement de l'organisme. Elle permet l'élimination de structures inutiles ou mal formées. Elle participe notamment à la morphogénèse des doigts. En effet, les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose [372, 373]. De même, au cours du développement des amphibiens, l'augmentation des quantités d'hormones thyroïdiennes circulantes induit l'apoptose des cellules de la queue et fait disparaître cet organe [374]. La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose, où elle assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencie.

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau [375] ou à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent par apoptose, de même que les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs.

L'apoptose peut également être activée par des stimuli pathologiques. En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydant, par des altérations génétiques, par la maladie, par un choc thermique ou par l'exposition à des agents génotoxiques (chimiothérapie et radiothérapie).

II/ Rôles pathologiques

Etant donné l'importance physiologique de l'apoptose, un dérèglement de ce processus ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, est à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies [376].

Ainsi, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [377], la sclérose latérale amyotrophique [378] ou la maladie de Parkinson [379]. Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale. De même, le virus de l'immunodéficience humaine active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (TH pour

« T-helper ») nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus [380].

Un déficit de l'apoptose peut aussi causer diverses affections telles que les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules auto-immunes réactives. Une absence d'apoptose peut également favoriser la survie et la croissance de cellules anormales, normalement destinées à mourir, et ainsi induire des processus de cancérogénèse [381]. Certaines cellules cancéreuses ont d'ailleurs développé des mécanismes de résistance aux processus physiologiques de l'apoptose [382].

Contexte et sujet de Thèse

Contexte et sujet de Thèse

Comme illustré dans la première partie de l'introduction, les interactions protéine-protéine jouent un rôle important dans la régulation de l'activité d'Ets-1. Ainsi, l'interaction d'Ets-1 avec ses partenaires protéiques permet : (1) la levée de son auto-inhibition de liaison à l'ADN, favorisant ainsi la régulation de l'expression de ses gènes cibles, (2) la formation de grands complexes nucléoprotéiques indispensables à l'activation de certains gènes cibles et (3) la modification post-traductionnelle d'Ets-1 qui participe à la modulation de son activité transcriptionnelle. Ces éléments sont impliqués dans la spécificité d'action d'Ets-1 au niveau de ses promoteurs cibles.

Les deux variants d'épissage alternatif Ets-1 p42 et Ets-1 p27, ayant des structures différentes, possèdent des propriétés et des fonctions différentes de celles de la protéine Ets-1 de pleine longueur. De plus, l'absence de domaines fonctionnels dans leur structure sous-entend la perte de l'interaction avec les facteurs recrutés par ces domaines. Par contre, la formation d'une séquence jonction suggère la liaison de nouveaux partenaires.

L'ensemble de ces données nous a orienté vers une étude qui porte sur l'identification et la caractérisation de nouveaux partenaires protéiques des isoformes d'Ets-1. Cette étude a été réalisée suivant deux temps.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un système procaryote de production de protéines recombinantes biotinylées, en utilisant la protéine Ets-1 p51 de pleine longueur comme modèle. Nous avons ensuite étudié les propriétés fonctionnelles de cette protéine biotinylée, et ce pour mettre en évidence que l'étiquette biotine n'altère pas les propriétés de la protéine étiquetée. Ce travail, auquel j'ai participé, a donné lieu à la publication N°1 présentée dans ce mémoire.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé les isoformes d'Ets-1 biotinylées pour copurifier par affinité sur des billes de streptavidine la protéine Ets-1 associée à ses partenaires d'interaction. Après identification de ces partenaires protéiques par spectrométrie de masse, nous avons confirmé les interactions dans un contexte cellulaire. Par la suite, nous avons évalué les conséquences fonctionnelles de l'interaction d'Ets-1 avec les partenaires identifiés. Cette étude a débouché sur la publication N°2 présentée dans ce mémoire qui est sous-pressé dans « Biochemical and Biophysical Research Communications ».

Dans un autre contexte, étant donné le rôle joué par Ets-1 dans l'apoptose, nous nous sommes intéressés au devenir de ses isoformes dans des cellules apoptotiques, d'autant plus que des données bibliographiques ont montré la diminution de la quantité des protéines Ets-1 dans ces cellules (voir Partie 1, Chapitre V §I-8). Néanmoins, aucune étude ne permettait de déterminer le mécanisme responsable d'une telle diminution. Dans le cadre de cette Thèse, nous avons identifié le mécanisme moléculaire engendrant la diminution du taux de la protéine Ets-1 pendant l'apoptose, décrite dans la deuxième partie de l'introduction. Nous avons également étudié les conséquences fonctionnelles de cette sous-régulation. Ces travaux ont débouché sur la publication N°3 présentée dans ce mémoire qui est en révision pour publication dans « Biochemical Journal ».

RESULTATS

PUBLICATION N°1

Système de production de la protéine Ets-1 biotinylée chez Escherichia coli : un outil efficace pour l'étude des interactions d'Ets-1 avec ses partenaires

I/ Préambule

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article rédigé en anglais et publié dans le journal « Protein Expression and Purification ». Ceux-ci seront discutés et analysés à la vue de l'intérêt qu'ils représentent dans l'étude des interactions protéiques.

II/ Résumé

Dans cette publication, nous avons mis au point un système de production de la protéine recombinante Ets-1 biotinylée chez *Escherichia coli*. Pour cela, nous nous sommes inspirés du système de production de protéines recombinantes natives « IMPACT™-T7 » de la société New England Biolabs® que nous avons adapté de façon à induire la biotinylation. Nos résultats montrent que :

- la protéine recombinante Ets-1 biotinylée est obtenue avec un bon niveau de pureté et un rendement de production attractif,
- elle conserve les propriétés de liaison à l'ADN, de transactivation et d'interaction avec des partenaires protéiques connus de la protéine Ets-1 native,
- elle constitue un outil efficace pour l'étude de l'interaction d'Ets-1 avec ses partenaires.

Un tel système est applicable à de nombreuses protéines (autres qu'Ets-1) permettant ainsi l'étude d'interactions protéiques variées. Dans le cas d'Ets-1, il devrait nous permettre de mettre en évidence les partenaires d'interaction des différentes isoformes : Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27.



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjprep

Efficient system for biotinylated recombinant Ets-1 production in *Escherichia coli*: A useful tool for studying interactions between Ets-1 and its partners

Clélia Laitem, Souhaila Choul-li, David Baillat, Agnès Bègue, Marc Aumercier *

CNRS Unité Mixte de Recherche 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille 1 and Lille 2, IFR 142, B.P. 447, 1 rue du Prof. Calmette, 59021 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2008
and in revised form 19 June 2008
Available online 28 June 2008

Keywords:

Oncogenes
Transcriptional regulation
Biotinylated recombinant Ets-1
Escherichia coli biotinylated protein
production system
Affinity purification

ABSTRACT

Identification of Ets-1 interaction partners is critical for understanding its properties. Ets-1 DNA-binding is governed by an intramolecular mechanism called autoinhibition. Ets-1 increases its DNA-binding affinity by counteracting autoinhibition through binding either to a particular organization of Ets binding sites (EBS) in palindrome, as in the Stromelysin-1 promoter, or to EBS adjacent to DNA-binding sites of its partners by combinatorial interactions, as in the Collagenase-1 promoter. Identification of new Ets-1 interaction partners should allow the identification of new functions for this transcription factor. To this end, we fused a biotin tag to Ets-1 protein in order to copurify it and its partners by affinity. For the first time, we cloned, produced in *Escherichia coli* and purified a biotinylated recombinant Ets-1 protein using the T7-Impact™ system (New England Biolabs®), adapted to induce biotinylation. Nearly 100% biotinylation was attained without altering Ets-1 properties. Biotinylated Ets-1 bound to and transactivated the Stromelysin-1 promoter the same way as native Ets-1 did. It also conserved interactions with known Ets-1 partners such as c-Jun, Erk-2 and Runx-1. In addition, streptavidin pull-down and surface plasmon resonance assays demonstrated that biotinylated Ets-1 is a useful tool for qualitative and quantitative studies of Ets-1 interaction with its partners.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Ets-1 is the founding member of the Ets family of transcription factors, which are characterized by a well-conserved DNA-binding domain (DBD),¹ called the ETS domain. It recognizes specific DNA elements, called Ets binding sites (EBS), that are present in promoters of target genes [1,2]. By binding to these elements, Ets-1 activates the transcription of various genes involved in a range of processes, including development, angiogenesis, tumor invasion and apoptosis [3]. DNA-binding of Ets-1 is governed by an intramolecular mechanism, called autoinhibition, associated with the existence of two inhibitory domains which flank and interact with the ETS domain [4,5]. Therefore, Ets-1 increases its DNA-binding affinity by counter-

acting autoinhibition through combinatorial interactions with cofactors at adjacent DNA elements [1,2]. For instance, Ets-1 is recruited cooperatively with AP-1 transcription factors (c-Fos/c-Jun) to EBS adjacent to the AP-1 site in the Collagenase-1 (MMP-1) promoter. Ets-1 can also bind cooperatively with the Runx-1 transcription factor to EBS adjacent to the Runx-1 binding site contained in the T-cell receptor (TCR) β promoter [6–8]. Interestingly, Ets-1 can act as its own partner as demonstrated with an EBS palindrome found in the Stromelysin-1 (MMP-3) promoter [5,9]. We showed that, at these sites, Ets-1 overcomes autoinhibition through cooperative binding that leads to the formation of a ternary Ets-1–DNA–Ets-1 complex [5]. Autoinhibition is a mechanism that increases transcription factor specificity because autoinhibited proteins require interaction with partners or particular configurations of binding sites to regulate transcription. On that basis, studying and identifying Ets-1 partners are essential for understanding the mechanism of action of Ets-1, for detecting new target promoters and for discovering new functions.

Until now, Ets-1 interaction partners such as Runx-1 [8], Ubc-9 [10], USF-1 [11] and EAPII [12] have primarily been identified through yeast two-hybrid or GST pull-down experiments but these techniques have drawbacks. It is now well known that detecting protein–protein interactions using yeast two-hybrid screening does not prove that this interaction actually occurs and further experiments are required before the putative interaction can be

* Corresponding author. Fax: +33 320 871 111.

E-mail address: marc.aumercier@ibl.fr (M. Aumercier).

¹ Abbreviations used: DBD, DNA-binding domain; EBS, ETS-binding site; AP-1, activator protein-1; TCR, T-cell receptor; Ubc-9, ubiquitin-conjugating enzyme 9; USF-1, upstream stimulating factor-1; EAPII, Ets-1-associated protein II; GST, glutathion-S-transferase; SPR, surface plasmon resonance; *E. coli*, *Escherichia coli*; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; DTT, dithiothreitol; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; HEK, human embryonic kidney; Erk-2, extracellular signal-regulated kinase 2; HRP, horseradish peroxidase; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; WT, wild-type; M1, mutant site 1; M2, mutant site 2; M1M2, mutant sites 1 and 2; RU, resonance unit; CBD, chitin binding domain; HSP-70, heat shock protein-70.

validated [13]. In a GST pull-down assay, fusion of the GST tag (220 amino acids) to the protein of interest may change the protein's conformation due to the tag's large size and to its ability to form dimers [14,15]. Consequently, the GST tag could alter protein properties. This poses a real problem for Ets-1 due to its particular auto-inhibited structure.

To study interactions between Ets-1 and its partners, Ets-1 must be fused to a tag that does not alter the protein's properties and that can be tightly bound to any solid support so that interaction partners can be copurified by affinity under various conditions. To that aim, the streptavidin/biotin system offers several advantages [16]. The biotin tag is very small (16 amino acids), decreasing the chance of altering fusion protein conformation [17]. Moreover, the non-covalent streptavidin/biotin interaction is one of the strongest ones known in nature ($K_D = 10^{-15}$ M) [18]. Therefore, biotinylated recombinant proteins bound to a streptavidin resin can be subjected to very stringent conditions that allow copurification of interaction partners. The biotin tag contains a lysine residue; biotin is covalently attached to this lysine residue by a protein-biotin ligase. The bacterial BirA enzyme is the most commonly used exogenous biotin ligase [19].

Biotinylation systems using co-expression of tagged recombinant proteins and BirA biotin ligase were previously described. For instance, two prokaryotic proteins (TufB, GyrA) as well as two eukaryotic nuclear receptors (GR, SHP) fused to a multi affinity tag including a biotin tag were biotinylated in *Escherichia coli* by the exogenously expressed BirA biotin ligase before being purified for subsequent experiments [20]. In mouse erythroleukemic (MEL) cells, stable transfection of vectors encoding GATA-1 transcription factor fused to a biotin tag and BirA biotin ligase allowed expression of biotinylated GATA-1 directly in cells [21,22]. To date, Ets-1 has never been biotinylated. In this study, we developed a prokaryotic system of recombinant protein biotinylation, potentially applicable to various proteins. This system can easily be implemented and should facilitate the study of protein partner interactions, present in numerous cellular environments.

We cloned, produced and purified biotinylated Ets-1 protein using the T7-Impact™ System (New England Biolabs®) adapted to induce biotinylation. Biotinylation reached nearly 100% without altering Ets-1 properties: neither DNA-binding, transactivation nor partner recruitment properties were affected. In addition, pull-down and surface plasmon resonance (SPR) assays were performed to check and validate the usefulness of biotinylated Ets-1 for the study of interactions between Ets-1 and its partners.

Materials and methods

Construction of prokaryotic expression vectors

A pTyb2-tag-Ets-1 expression vector was constructed in two steps. First, the double-stranded synthetic oligonucleotide containing the sequence tag encoding for biotin acceptor peptide (represented as boldface letters) fused to NdeI and NotI adaptaters, 5'-**TATGGGCTGAACGACATCTTCGAAGCTCAGAAAATCGAATGGCACGA** AGC-3' and 5'-**GGCCGCTTCGTGCCATTTCGATTTCTGAGCTTCGAA** GATGTCGTTCCAGGCCA-3', was cloned into a pTyb2 vector (New England Biolabs®) previously digested by NdeI and NotI endonucleases. Second, the 1.3 kb human Ets-1 cDNA sequence, obtained by PCR amplification of human Ets-1 cDNA (using the following primers: 5'-GCGGCCGCAAGCGGCCGTCGATCTCAAG-3' and 5'-GGCCGCTTCGTGCCATTTCGCTTGAC-3') was digested by NotI and SfoI restriction enzymes and cloned into pTyb2-tag vector previously digested by NotI and SmaI endonucleases. SfoI and SmaI restriction enzyme cut sites have compatible ends. To produce a pTyb2-Erg-1 expression vector, human Erg-1 cDNA sequence, ob-

tained by PCR amplification of human Erg-1 cDNA (using the following primers: 5'-GCCAGCACTATTAAGGAAGCC-3' and 5'-GTAGTAAGTGCCAGATGAGA-3') was cloned into a pTyb2 vector obtained as follows. The pTyb2 vector was first digested by NcoI endonuclease and blunted by Klenow enzyme to obtain an ATG initiator codon and then digested by SmaI endonuclease. To produce a pTyb2-Fli-1 expression vector, human Fli-1 cDNA sequence, obtained by PCR amplification of human Fli-1 cDNA (using the following primers: 5'-GACGGGACTATAAGGAGGCT-3' and 5'-CTCCCTGGATCCATTCATGTG-3') was cloned into a pTyb2 digested vector as described above. Construction of a pTyb2-Ets-1 expression vector has been described previously [5]. A pCY216-BirA vector was generously provided by Dr. Stefan Berger.

Construction of eukaryotic expression vectors

A pcDNA3-tag-Ets-1 expression vector was constructed in two steps. First, the double-stranded synthetic oligonucleotide containing the sequence tag (represented as boldface letters) fused to HindIII and NotI adaptaters: 5'-AGCTTATGGGCTGAACGACATCTTCG AAGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAGC-3' and 5'-GGCCGCTTCGTG CCATTTCGATTTCTGAGCTTCGAAGATGTCGTTCCAGGCCATA-3', was cloned into a pcDNA3® vector (Invitrogen) previously digested by HindIII and NotI endonucleases. Second, human Ets-1 cDNA sequence, obtained by PCR amplification of human Ets-1 cDNA (using the following primers: 5'-GCGGCCGCAAGCGGCCGTCGATCTCAAG-3' and 5'-CTCGAGTCACTCGTCGGCATCTGGCTTGAC-3') was digested by NotI and XhoI endonucleases and cloned into pcDNA3-tag vector previously digested by the same enzymes. To produce a pcDNA3-Ets-1 expression vector, the human Ets-1 cDNA sequence obtained as described previously and digested by NotI and XhoI endonucleases was cloned into pcDNA3 vector digested by the same enzymes. To produce a pcDNA3-BirA expression vector, *E. coli* BirA cDNA sequence, obtained by PCR amplification of *E. coli* BirA cDNA (using the following primers: 5'-GGCAAGCTTATG AAGATAACACCGTGCCACTGAAA-3' and 5'-GGCGCGCCGCTTATT TTTCTGCACTACGCAGGGATAT-3') and digested by HindIII and NotI endonucleases, was cloned into a pcDNA3 vector previously digested by the same enzymes. Construction of a Stromelysin-1 promoter pGL3 reporter vector has been described previously [5].

Expression and purification of recombinant proteins

Ets-1, Erg-1 and Fli-1 recombinant proteins were produced from the pTyb2-Ets-1, pTyb2-Erg-1 and pTyb2-Fli-1 vectors, respectively, using the T7-Impact™ system according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs®). Biotinylated recombinant Ets-1 protein was produced using the principle of the T7-Impact™ system adapted to induce biotinylation: bacteria (*E. coli*, ER2566, New England Biolabs®) were cotransformed with two recombinant vectors, i.e. pTyb2-tag-Ets-1 and pCY216-BirA. Fresh overnight culture was diluted 1:25 in 250 ml of Luria-Bertani medium containing 30 mM glucose and incubated at 37 °C with shaking at 230 rpm. When culture density reached $A_{595} = 0.7$, medium was changed with 250 ml of Luria-Bertani containing 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 1.5 mM arabinose and 0.01 mM biotin. The culture was incubated at 30 °C and shaken for 3 h. The culture was harvested and the pellet was washed with phosphate-buffered saline solution and suspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals)). Bacteria were lysed with a French press with a pressure of 1,000 lbs./sq. in. Lysate was clarified by means of a 5 min centrifugation at 20,000g at 4 °C followed by a subsequent 15 min centrifugation at 20,000g at 4 °C. Clarified lysate was applied to a 5-ml chitin bead column (New England Bio-

labs[®]) initially equilibrated with 10 volumes of column buffer (lysis buffer without protease inhibitors). The column was washed with 20 volumes of column buffer and rapidly flushed with three volumes of elution buffer (column buffer without Triton X-100) containing 30 mM dithiothreitol (DTT) (Roche Molecular Biochemicals). The column was then stored for 16 h at 4 °C for peptide cleavage. Proteins were eluted with 10 ml of elution buffer in 1 ml fractions. Fractions were pooled and concentrated by passing them through a Vivaspinn ultrafiltration spin column (Vivascience) with 15 min centrifugation at 3000g at 4 °C. Yield was estimated by comparison against known protein standards (bovine serum albumin) by sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), followed by Coomassie blue staining.

Cell culture

HEK-293, human embryonic kidney cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. HIG-82, rabbit synovial fibroblastic cells were obtained commercially (ATCC, Manassa, VA, USA, CRL-1832) and routinely cultured in F-12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. Experiments were carried out between 7 and 14 passages. Jurkat, human acute T cell leukemia cells were cultured in suspension in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. Cultures were maintained at a concentration between 1×10^5 and 1×10^6 cells/ml.

Production of cell lysates

HIG-82 cells were grown to reach 90% confluence and Jurkat cells were grown to reach 9×10^5 cells/ml (10 ml). Cultures were harvested and pellets were washed with phosphate-buffered saline solution and then suspended in 200 µl of lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, Complete[™] protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals)). Cells were lysed by 15 s sonication using 24 µm amplitude and lysates were clarified by a 15 min centrifugation at 20,000g at 4 °C. Yields were measured by colorimetry (Bio-Rad assay).

Western blot analysis

For recombinant protein expression in bacteria, uninduced and induced cultures (100 µl) were harvested and pellets, boiled in 2% β-mercaptoethanol Laemmli buffer (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue), were resolved by SDS–PAGE. For recovery of biotinylated Ets-1 after purification, 10 µl of each elution fraction were boiled in Laemmli buffer (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and resolved by SDS–PAGE. For protein expression after reporter gene assays, 25 µl of total cell lysates were boiled in Laemmli buffer and resolved by SDS–PAGE. For coimmunoprecipitations, 25 µl of elution fractions were boiled in Laemmli buffer and resolved by SDS–PAGE. For pull-down assays, beads were boiled in 50 µl of Laemmli buffer from which 25 µl were resolved by SDS–PAGE. Proteins in gels were transferred to a Hybond[™]-C Extra membrane (Amersham Biosciences) and blocked for 1 h at room temperature in 5% nonfat milk in Tris-buffered saline solution. The membrane was then incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature in blocking buffer. Ets-1 was detected with a C-20 polyclonal antibody (Santa Cruz), c-Jun with an H-79 polyclonal antibody (Santa Cruz), Erk-2 with a C-14 polyclonal antibody (Santa Cruz) and Runx-1 with an H-65 polyclonal antibody (Santa Cruz). The washed membrane was then incubated for 1 h at room temperature with horseradish

peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz) in blocking buffer. Bound antibodies were visualized using Western Lightning[™] chemiluminescence detection system (Perkin Elmer Life Sciences).

Streptavidin–HRP assay

For recombinant protein expression in bacteria, uninduced and induced cultures (100 µl) were harvested and pellets, boiled in 2% β-mercaptoethanol Laemmli buffer, were resolved by SDS–PAGE. For recovery of biotinylated Ets-1 after purification, 10 µl of each elution fraction, boiled in Laemmli buffer, were resolved by SDS–PAGE. For protein expression after reporter gene assays, 25 µl of total cell lysates were boiled in Laemmli buffer and resolved by SDS–PAGE. Proteins in gels were transferred to a Hybond[™]-C Extra membrane (Amersham Biosciences) and blocked for 1 h at room temperature in 3% bovine serum albumin in Tris-buffered saline solution. The membrane was then incubated in the dark with the streptavidin–horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Sigma) for 30 min in blocking buffer and was then washed three times with blocking buffer containing 0.1% Igepal. Biotinylated proteins were visualized using Western Lightning[™] chemiluminescence detection system (Perkin Elmer Life Sciences).

Pull-down assay

For biotinylation efficiency, pooled elution fractions containing purified biotinylated Ets-1 (50 µl) were incubated with 30 min shaking at 4 °C with streptavidin sepharose[™] beads (Amersham Bioscience) (25 µl) and were centrifuged. The recovered supernatant (50 µl) was incubated again with streptavidin sepharose[™] beads (25 µl) under the same conditions and was centrifuged. Supernatants (50 µl) and beads (50 µl) were boiled in Laemmli buffer and analyzed by SDS–PAGE followed by Coomassie blue staining. In order to make this analysis quantitative, this experiment was performed and stopped after first precipitation in order to recover all of the supernatant (50 µl). Then, it was repeated and completed using the first supernatant to perform the second precipitation. To study interaction partners, biotinylated Ets-1 (10 µg), diluted in binding buffer (50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, Complete[™] protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals)), was incubated for 1 h at 4 °C with 250 µg of cell lysates (HIG-82, Jurkat). Streptavidin sepharose[™] beads (20 µl) were then added to reaction mixture for 1 h at 4 °C. After centrifugation, beads were washed three times with binding buffer containing 300 mM NaCl, boiled in 50 µl of Laemmli buffer and analyzed by Western blot with different antibodies.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Double-stranded synthetic oligonucleotides corresponding to the wild-type (WT) and mutants (M1, M2, M1M2) of the human Stromelysin-1 (–223/–193) promoter region (Fig. 3A) were end-labeled using T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP. Probes were subsequently purified by electrophoresis on a 20% polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 19:1, Euromedex) non-denaturing gel in TBE buffer (90 mM Tris–Borate, 1 mM EDTA). Recombinant proteins (5 pmol) were incubated with 0.5 ng of labeled probe in 40 µl binding reaction buffer (20 mM Tris pH 7.9, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 40 µg/ml poly[di-dC].poly[–di-dC] (Pharmacia), 10% glycerol) for 30 min on ice. Complexes formed were resolved on a 5% polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 29:1, Euromedex) non-denaturing gel in 0.25× TBE buffer at room temperature. Gels were dried and autoradiographed at –80 °C. For competition, 400 ng of non-labeled probe (800×) were added to the reaction mixture.

Transfection and reporter gene assay

HEK-293 cells were grown in 12-well plates to reach 60–80% confluence at the time of transfection. Transfections were then performed by incubating the Exgen 500 transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Euromedex) with (i) 200 ng of each Stromelysin-1 promoter pGL3 reporter vector, 1.25 ng normalization vector pRL-null (Promega), 175 ng Ets-1 pcDNA3 expression vector and a sufficient quantity of pUC19 to reach 500 ng DNA, or (ii) 200 ng of each Stromelysin-1 promoter pGL3 reporter vector, 1.25 ng normalization vector pRL-null, 175 ng tagged Ets-1 pcDNA3 expression vector and 125 ng BirA pcDNA3 expression vector. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed using 200 μ l of cell lysis buffer (1% Triton X-100, 25 mM glycylglycine pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM

DTT) and each supernatant was sequentially tested for firefly and *Renilla* luciferase activity (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega) using a CentroLB 960 (Berthold). Expression of target proteins (Ets-1, biotinylated Ets-1 and Erk-2) was tested by Western blot and streptavidin–HRP assays on total cell lysates.

Coimmunoprecipitation assay

Coimmunoprecipitations were performed using the Seize[®] X protein A immunoprecipitation kit according to the manufacturer's instructions (Pierce). Briefly, 20 μ g anti-Ets-1 antibody (C-20, Santa Cruz) were cross-linked with disuccinimidyl suberate (DSS) to 100 μ l of protein A beads into a Handee[™] spin cup column. At the same time, biotinylated Ets-1 (10 μ g) diluted in binding buffer was incubated for 1 h at 4 °C with 250 μ g cell lysates (HIG-82,

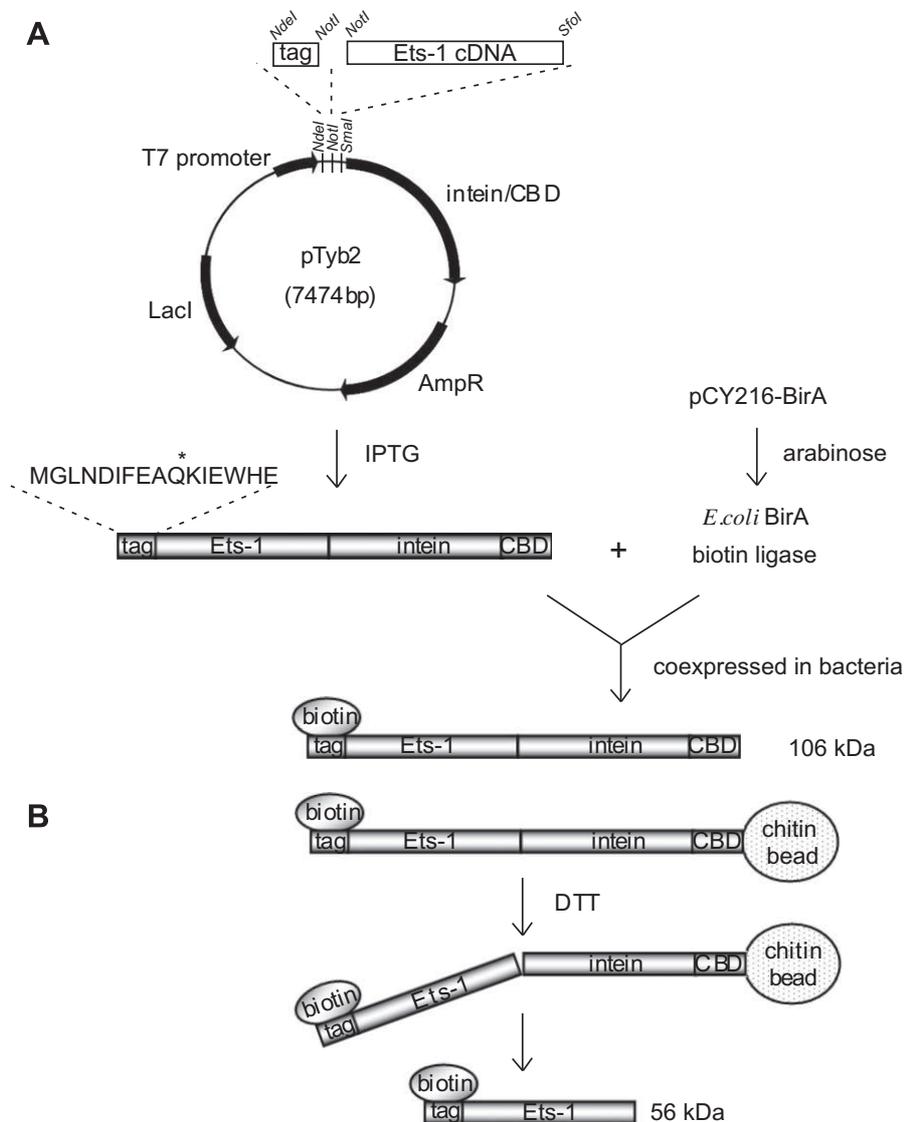


Fig. 1. Biotinylated Ets-1 production system. (A) Cloning and expression. The sequence tag was cloned into NdeI–NotI restriction sites of a pTyb2 vector and then NotI–SfoI digested human Ets-1 cDNA was cloned into NotI–SmaI restriction sites. Cut SfoI and SmaI restriction sites have compatible ends. Inserts were cloned in-frame with intein and chitin binding domain (CBD) genes of pTyb2 vector (New England Biolabs[®]). The LacI gene encodes for the lactose repressor which blocks transcription mediated by the T7 promoter in the absence of IPTG. The AmpR gene conveys ampicillin resistance to the host strain. The amino acid sequence of the tag is shown. The asterisk indicates the lysine residue that becomes specifically biotinylated by *E. coli* BirA biotin ligase, which is encoded by a pCY216-BirA vector after arabinose induction. The pTyb2-tag-Ets-1 and pCY216-BirA vectors, coexpressed in bacteria, produce biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide (106 kDa), after IPTG and arabinose induction. (B) Purification on a chitin bead affinity column. Biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide (106 kDa) is retained on the affinity column by CBD interaction with the chitin beads. Elution of biotinylated Ets-1 (56 kDa) is performed by intein-mediated self-cleavage by adding DTT to the elution buffer, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs[®]).

Jurkat). The mixture was then loaded onto the column for 1 h at 4 °C. Beads were washed three times with binding buffer and eluted with 50 μ l of a low pH buffer (pH = 2.5). Elution fractions were analyzed by Western blot with different antibodies.

SPR binding assay

Surface plasmon resonance (SPR) measurements were carried out using a BIAcore 2000 apparatus (Biacore®). Biotinylated Ets-1 protein was immobilized on a streptavidin-coupled CM5 Sensor Chip, which was prepared according to the standard protocol provided in the Amine Coupling Kit (Biacore®). HBS-EP BIA certified buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) polysorbate 20, Biacore®) was used as a running buffer. Briefly, flow rate was fixed at 10 μ l/min. Streptavidin was injected at 500 ng/ μ l in 10 mM sodium acetate pH 3.5, for 10 min.

Biotinylated Ets-1 was injected through a flow cell at 85 nM over the Sensor Chip until a stable signal of 4000 RU was obtained, whereas the buffer was injected through the control flow cell. Equilibrium binding experiments were carried out at 25 °C using a 20 μ l/min flow rate. Proteins were injected at the desired concentration (22.5, 45, 90, 180 and 360 nM for Erg-1; 5, 10, 20, 40 and 80 nM for Fli-1) in HBS-EP for 5 min. The Sensor Chip was regenerated between experiments by dissociating any formed complex in HBS-EP buffer for 30 min. Final curves were obtained by subtraction of the signal corresponding to the control flow cell. Association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants with their respective standard errors ($SE(k_a)$, $SE(k_d)$) as well as the dissociation constant at equilibrium (K_D) were obtained according to BIAevaluation software 3.1. Standard errors of K_D were calculated from the equation:

$$SE(K_D) = K_D \sqrt{[SE(k_d)/k_d]^2 + [SE(k_a)/k_a]^2}$$

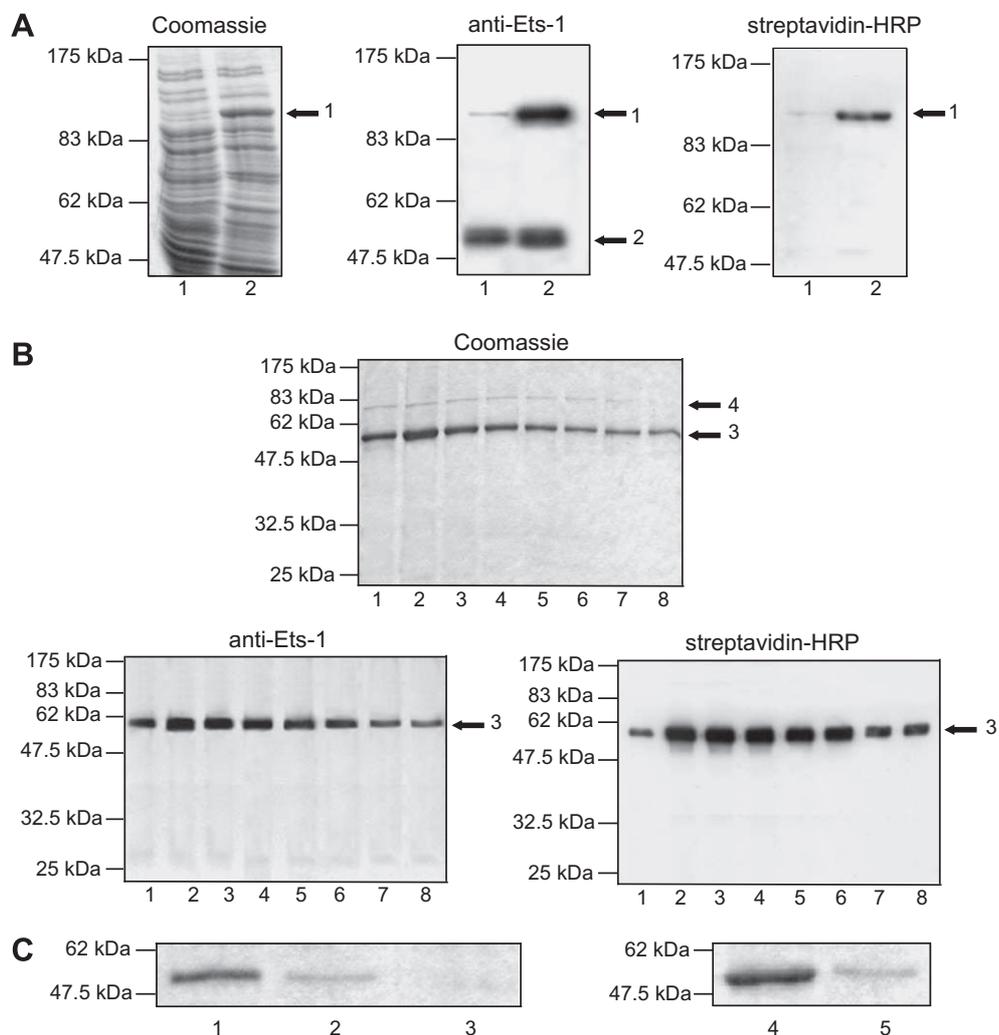


Fig. 2. Expression and purification of biotinylated Ets-1. (A) Expression of biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide in induced bacteria. Bacteria, cotransformed with pTyb2-tag-Ets-1 and pCY216-BirA vectors, were cultured for 3 h at 30 °C in the absence (lane 1) or in the presence (lane 2) of 0.3 mM IPTG, 1.5 mM arabinose and 0.01 mM biotin. 100 μ l of each bacteria culture were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining, then by Western blot using anti-Ets-1 antibody and by streptavidin-HRP assay. Arrow 1 indicates biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide (106 kDa) expressed after induction and arrow 2, a bacterial protein cross-reacting with anti-Ets-1 antibody. (B) Recovery of biotinylated Ets-1 in elution fractions. Lysate (10 ml) of induced bacteria was purified on a chitin bead affinity column (5 ml). Proteins were eluted in eight fractions (1 ml) (lanes 1–8) after intein-mediated self-cleavage at 4 °C with buffer (10 ml) containing DTT (30 mM). Ten microliters of each elution fraction were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining, then by Western blot using an anti-Ets-1 antibody and by streptavidin-HRP assay. Arrow 3 indicates purified biotinylated Ets-1 (56 kDa) and arrow 4, *E. coli* DnaK chaperon. (C) Biotinylation efficiency. After purification, elution fractions containing biotinylated Ets-1 were pooled. Resulting purified biotinylated Ets-1 solution (lane 1) (50 μ l) was incubated and initially precipitated with 25 μ l of streptavidin beads (lane 4). The resulting supernatant (lane 2) was once again incubated and precipitated with 25 μ l of streptavidin beads (lane 5) and final supernatant (lane 3) was recovered. Beads and supernatants were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

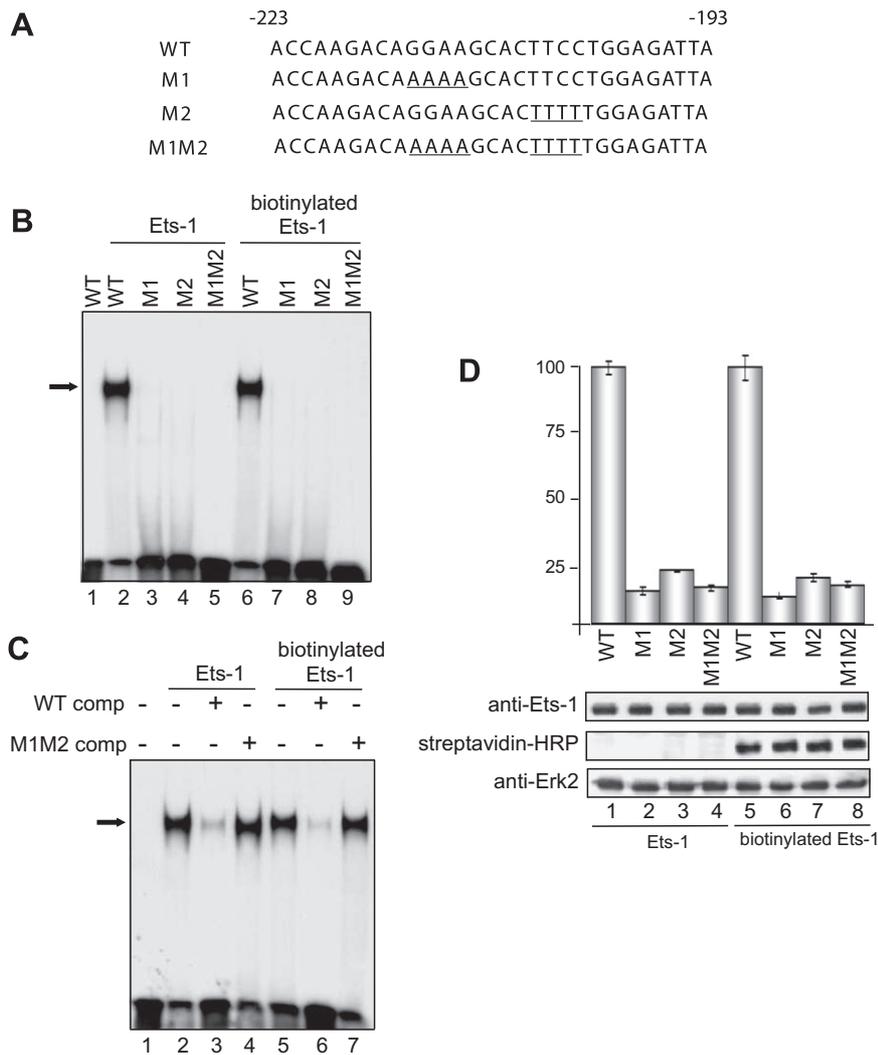


Fig. 3. Biotinylated Ets-1 binds to and transactivates the Stromelysin-1 promoter. (A) Sequences of the $-223/-193$ EBS palindrome of Stromelysin-1 promoter and its various mutants. Mutant EBS (M1, M2, M1M2) core sequences are represented as underlined letters in the sequence. (B) Electrophoretic mobility shift assay. Ets-1 (lanes 2–5) or biotinylated Ets-1 (lanes 6–9) (4 pmol) were incubated with WT (lanes 2 and 6), M1 (lanes 3 and 7), M2 (lanes 4 and 8) or M1M2 (lanes 5 and 9) 32 P-labeled DNA probes (0.5 ng). (C) Binding specificity of biotinylated Ets-1 to EBS palindrome. Ets-1 (lanes 2–4) or biotinylated Ets-1 (lanes 5–7) (4 pmol) were incubated with WT 32 P-labeled DNA probe (0.5 ng) in the absence (lanes 2 and 5) or in the presence of unlabeled competitors (WT 800 \times , lanes 3 and 6 or M1M2 800 \times , lanes 4 and 7). (B and C) Arrow indicates ternary Ets-1–DNA–Ets-1 complex. Lane 1 corresponds to the migration of WT 32 P-labeled DNA probe without protein. DNA–protein complexes were separated by electrophoresis on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel. (D) Relative activity of the wild-type (WT) and mutant (M1, M2, M1M2) Stromelysin-1 promoters induced by Ets-1 and biotinylated Ets-1. pGL3 luciferase reporter constructs (200 ng) were cotransfected in HEK-293 cells at 60–80% confluence, on the one hand, with Ets-1 pcDNA3 expression vector (175 ng) (lanes 1–4) and, on the other hand, with tagged Ets-1 pcDNA3 expression vector (175 ng) and BirA pcDNA3 expression vector (125 ng) (lanes 5–8). Luciferase activity, measured 48 h after transfection, is expressed as the percentage of WT construct activity. Results are the average of two representative experiments done in triplicates. Cell lysates (25 μ l) were analyzed by Western blot using anti-Ets-1 and anti-Erk-2 (as loading control) antibodies and by streptavidin–HRP assay.

Results

Biotinylated Ets-1 production system

A biotinylation tag, which has been reported to be efficiently biotinylated [17,23], was added to the N-terminal end of the human Ets-1 protein to form the fusion protein, referred to here as tagged Ets-1. Tagged Ets-1 was then biotinylated on the lysine residue of the tag by *E. coli* BirA biotin ligase to form biotinylated Ets-1 [24]. Biotinylated Ets-1 was obtained using the protein production T7-ImpactTM system (New England Biolabs[®]) adapted to induce biotinylation. For this purpose, a pTyb2-tag-Ets-1 vector was constructed to express the tagged protein and a pCY216-BirA vector was used to encode *E. coli* BirA biotin ligase (Fig. 1A) [25].

A pTyb2-tag-Ets-1 vector was made by inserting (i) the sequence tag into the NdeI–NotI digested pTyb2 vector (New

England Biolabs[®]) to produce a pTyb2-tag vector, followed by (ii) the 1.3 kb NotI–SfoI digested human Ets-1 cDNA into the NotI–SmaI digested pTyb2-tag vector. Protein expression in the pTyb2 vector is controlled by a T7 promoter which is repressed by a lactose repressor encoded by the *lacI* gene [26]. Therefore, addition of IPTG is necessary to induce protein expression. Another characteristic of the pTyb2 vector is the presence of intein and chitin binding domain (CBD) genes in-frame with the Ets-1 encoding sequence. After IPTG induction, the pTyb2-tag-Ets-1 vector produced tagged Ets-1 protein fused C-terminally to an intein/CBD peptide. To favor biotinylation, this protein was coexpressed in bacteria with *E. coli* BirA biotin ligase encoded by the pCY216-BirA vector. The latter is under the control of *araBAD* promoter and, therefore, requires arabinose induction for protein synthesis [27].

Biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide (106 kDa), expressed after IPTG and arabinose induction, was then purified

on a chitin bead affinity column (Fig. 1B). The protein was retained through interaction of CBD with chitin beads and biotinylated Ets-1 (56 kDa) was released by intein-mediated self-cleavage through addition of a reducing agent (DTT) in elution buffer [28,29].

Expression and purification of biotinylated Ets-1

Bacteria, cotransformed with the pTyb2-tag-Ets-1 and pCY216-BirA vectors, were maintained in catabolic repression with glucose in order to avoid inducer-independent expression. Synthesis of biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide was then activated in bacteria, also called induced bacteria, by changing the medium to one containing IPTG, arabinose and biotin, but not glucose. Uninduced bacteria, the negative control of the reaction, were cultured under the same conditions in medium without inducers (Fig. 2A). Bacteria cultures were then assessed for protein expression by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Implementing our biotinylation Ets-1 production system showed that induced bacteria (Fig. 2A, lane 2), compared to uninduced bacteria (Fig. 2A, lane 1), synthesize a protein (indicated by arrow 1) that had the expected molecular mass (106 kDa). This protein was also detected by Western blot with an anti-Ets-1 antibody and also by a streptavidin horseradish peroxidase (streptavidin-HRP) assay that is commonly used to detect biotinylated proteins. These results indicated that biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide was indeed expressed in induced bacteria. A 55 kDa protein was also detected with the anti-Ets-1 antibody (arrow 2 in Fig. 2A). Due to its presence in both uninduced and induced bacteria, this protein probably resulted from an antibody cross-reaction with a bacterial protein.

Biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide (106 kDa) was then purified on a chitin bead affinity column, as described above, and elution fractions were assessed for recovery of purified biotinylated Ets-1 (56 kDa). Analysis of the eight elution fractions of purified biotinylated Ets-1 by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining, Western blot for Ets-1 detection and streptavidin-HRP assay (Fig. 2B, lanes 1–8) revealed that all fractions contained 56 kDa biotinylated Ets-1 protein (arrow 3, Fig. 2B). A 70-kDa protein, detected by Coomassie blue staining and indicated by arrow 4, was identified after protein N-terminal sequencing (data not shown) as DnaK protein, a bacterial analog of the human HSP-70 chaperon [30]. DnaK protein is frequently copurified with recombinant proteins in bacteria and is known to improve their solubility.

All elution fractions containing purified biotinylated Ets-1 were pooled and the yield of purification was estimated by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (Table 1). After comparison against known protein standards (bovine serum albumin), the yield of biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide expressed in induced bacteria lysate was estimated to 20 mg/l and the yield of purified biotinylated Ets-1 to 9.6 mg/l (48% recovery). Despite an excess of chitin beads, approximately 7.4 mg/l (37%) of biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide were recovered in the flow-through after passing the induced bacteria lysate on the chitin bead affinity column. Biotinylated Ets-1 fused to the intein/CBD peptide was mainly lost at this step, and only a small

fraction was trapped in bacteria or retained on the column, due to its insensitivity to intein-mediated self-cleavage.

Afterwards, the biotinylation yield of purified Ets-1 was assessed by two successive pull-down assays with streptavidin beads using pooled elution fractions containing purified biotinylated Ets-1 (Fig. 2C). Analysis of supernatants and beads by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining showed that almost all of the purified 56 kDa protein, contained in pooled elution fractions, (Fig. 2C, lane 1) was bound to the streptavidin beads (Fig. 2C, lane 4) after the first incubation. The remaining purified 56 kDa proteins in the supernatant (Fig. 2C, lane 2) were precipitated after the second incubation with streptavidin beads (Fig. 2C, lane 5), confirming their biotinylation. The final supernatant (Fig. 2C, lane 3) was completely depleted of proteins. This result clearly demonstrates that nearly 100% of the purified 56 kDa protein was biotinylated.

Biotinylated Ets-1 conserves Ets-1 DNA-binding and transactivation properties

DNA-binding and transactivation properties of biotinylated Ets-1 were assessed and compared to those of native Ets-1. For this purpose, we used the matrix metalloproteinase Stromelysin-1 promoter since it is known to be regulated by Ets-1 [31]. Our previous work showed that this promoter contains an EBS palindrome to which two molecules of autoinhibited Ets-1 cooperatively bind, forming an Ets-1-DNA-Ets-1 ternary complex, which is optimal for promoter transactivation [5]. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were thus carried out using Ets-1 or biotinylated Ets-1 proteins and 30-mer ³²P-labeled DNA probes containing wild-type or mutant EBS palindromes of the Stromelysin-1 promoter. Mutant probes were designed to harbor either one (M1, M2) or both (M1M2) EBS consensus cores that were inactivated by exchanging the 5'-GGAA-3' sequence with 5'-AAAA-3' and the 5'-TTCC-3' sequence with 5'-TTTT-3' (Fig. 3A). Results from the EMSA on native and biotinylated Ets-1 showed that both native and biotinylated Ets-1 formed a ternary complex on the wild-type EBS palindrome (Fig. 3B, lanes 2 and 6), while mutation of one (M1, M2) or both (M1M2) EBS prevented Ets-1 from forming DNA-protein complexes (Fig. 3B, lanes 3–5 and 7–9). In both cases, these complexes were predominantly disrupted by a 800× molar excess of WT non-labeled DNA probe (Fig. 3C, lanes 3 and 6) but not by a 800X molar excess of M1M2 non-labeled DNA probe (Fig. 3C, lanes 4 and 7), confirming the complexes' specificity for the EBS palindrome.

To confirm that DNA-binding properties of biotinylated Ets-1 correlate with the transcriptional control of Stromelysin-1 promoter the same way as Ets-1 does, gene reporter assays were performed using both Ets-1 and biotinylated Ets-1. To express biotinylated Ets-1 in eukaryotic cells, the following sequences were cloned into the pcDNA3 expression vector: (i) tagged Ets-1 and (ii) BirA biotin ligase. Cotransfection of both expression vectors (tagged Ets-1 and BirA biotin ligase) in human embryonic kidney (HEK) 293 cells allowed the expression of biotinylated Ets-1, as revealed by Western blot and streptavidin-HRP assays (Fig. 3D, lanes 5–8). Vectors expressing Ets-1 or biotinylated Ets-1 were used to perform transactivation assays by transient transfection experiments in HEK-293 cells in the presence of either wild-type (WT) or mutant (M1, M2, M1M2) Stromelysin-1 promoter reporter pGL3 vectors. Mutations of the EBS palindrome of the Stromelysin-1 promoter were similar to those described for EMSA assays (Fig. 3A). Normalized activities showed that biotinylated Ets-1 (Fig. 3D, lanes 5–8), as well as Ets-1 (Fig. 3D, lanes 1–4), activated the Stromelysin-1 promoter containing the wild-type EBS palindrome (Fig. 3D, lanes 1 and 5). Mutation of one (M1, M2) or both (M1M2) EBS had dramatic effects on transactivation, resulting in a 80% loss of activity in both cases (Fig. 3D, lanes 2–4 and 6–8).

Table 1
Purification yield of biotinylated recombinant Ets-1

Purification step	Yield (mg/l)	Recovery (%)
Bacteria lysate	20	100
Flow-through	7.4	37
Purified biotinylated Ets-1	9.6	48

Concentrations were determined by comparison against known protein standards (bovine serum albumin) by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

Analysis of cell lysates by Western blot for Ets-1 and Erk-2 (loading control) detection and by streptavidin–HRP assay showed that both Ets-1 and biotinylated Ets-1 were expressed at the same levels under the different experimental conditions. Thus, biotinylated Ets-1 conserves the Ets-1 DNA-binding and transactivation properties on the Stromelysin-1 promoter.

Recruitment of interaction partners by biotinylated Ets-1

Since biotinylated Ets-1 was mainly produced to study Ets-1 partners, we investigated whether biotinylation affects interaction of Ets-1 with known partners, such as c-Jun [32,33], Erk-2 [34,35] and Runx-1 [8]. To perform this study, cell lines known to express these proteins were used: (i) HIG-82 synovial fibroblastic cells for c-Jun and Erk-2 and (ii) Jurkat acute leukemia T cells for Runx-1 [8,36]. Ets-1 or biotinylated Ets-1 incubated with cell lysates were purified, using coimmunoprecipitation assays, via an anti-Ets-1 antibody on a protein A bead affinity column (Fig. 4A). Western blot analysis of the eluted material showed that biotinylated Ets-1 (Fig. 4A, lane 3) interacted with c-Jun, Erk-2 and Runx-1 the same way as Ets-1 did (Fig. 4A, lane 2).

More interestingly, biotinylated Ets-1 could be used directly for qualitative studies of Ets-1 interaction partners using pull-down assays with streptavidin beads, with cell lysates previously incubated with biotinylated Ets-1 (Fig. 4B). Western blot analysis of proteins bound to streptavidin beads showed results similar to those of the coimmunoprecipitation experiment, namely that biotinylated Ets-1, and therefore Ets-1, was copurified with c-Jun, Erk-2 and Runx-1 (Fig. 4B, lane 2). However, the biotinylation method has a major advantage over coimmunoprecipitation: the pull-down assay is a rapid and single-step experiment where a high quantity of interaction partners can be purified. Thus, biotinylated Ets-1 constitutes a relevant and useful tool for direct and qualitative study of Ets-1 interaction partners.

Biotinylated Ets-1, a reliable tool for kinetic studies of Ets-1 interaction with partners by SPR experiments

Biotinylated Ets-1 can also be used to perform kinetic studies of interactions between Ets-1 and its partners by surface plasmon resonance (SPR) experiments. We investigated the interaction of Ets-1 with Erg-1 and Fli-1 (other Ets family members) known as Ets-1 partners [37]. For this purpose, biotinylated Ets-1 was fixed on a streptavidin Sensor Chip (Fig. 5A) and subjected to a constant flux of interest proteins (Fig. 5B). SPR measurements were quantified using RU signal intensity, which is representative of mass variation at the surface of the Sensor Chip: 1,000 RU corresponds to a variation of 1 ng/mm² at the surface. In the SPR experiment, 4000 RU of biotinylated Ets-1 were fixed on the streptavidin Sensor Chip; we therefore estimated that 71.4 fmol of biotinylated Ets-1 were bound per mm² (Fig. 5A). Due to the strong interaction between biotin and streptavidin, almost no drift was detected during SPR measurements at the end of injection (indicated by the arrow in Fig. 5A), demonstrating the real advantage of biotinylated Ets-1 for flux studies using Biacore® technology.

The desired concentrations of Erg-1 and Fli-1 proteins were then injected over the Sensor Chip functionalized with biotinylated Ets-1 (Fig. 5B). The sensorgrams shown in Fig. 5B were corrected by subtracting the blank curve corresponding to the flow cell without biotinylated Ets-1. Injection of the desired concentrations of Erg-1 and Fli-1 showed that Erg-1 and Fli-1 interacted with biotinylated Ets-1 in a dose-dependent manner. Kinetic analysis (Fig. 5C) revealed that the dissociation constant at equilibrium (K_D) for Fli-1 (23.4 nM) was weaker than for Erg-1 (89.3 nM), indicating that Fli-1 had a higher affinity for Ets-1. Moreover, the association constant (k_a) was greater for Fli-1 than for Erg-1, whereas their disso-

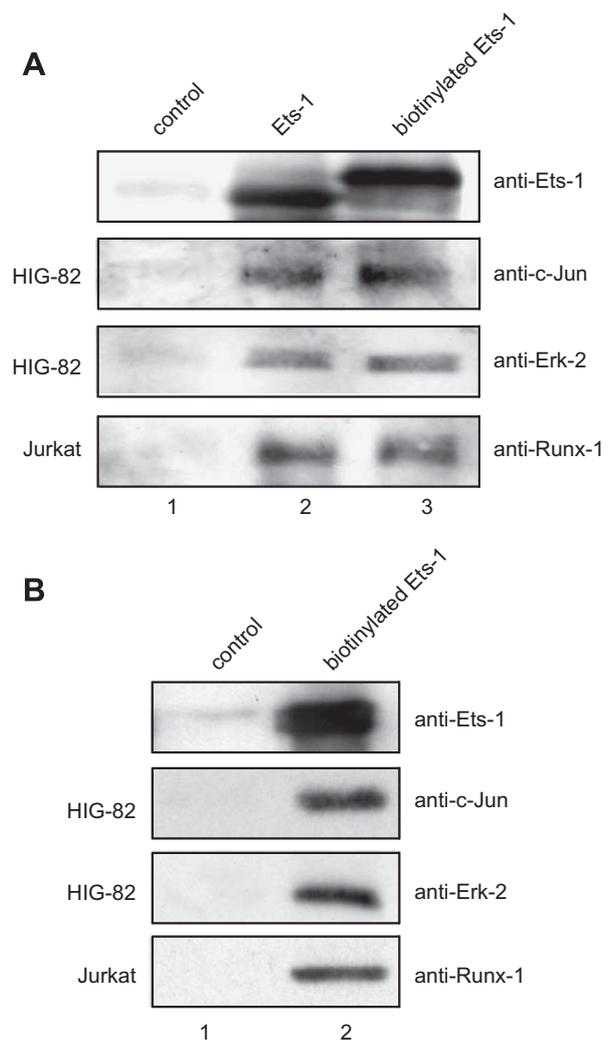


Fig. 4. Recruitment of c-Jun, Erk-2 and Runx-1 by biotinylated Ets-1. (A) Coimmunoprecipitation assay. Lysates of HIG-82 or Jurkat cells (250 µg) were incubated for 1 h at 4 °C in the absence (lane 1) or in the presence of recombinant Ets-1 (lane 2) or biotinylated Ets-1 (lane 3) (10 µg). Ets-1 and biotinylated Ets-1 associated complexes were then purified on a protein A bead (100 µl) affinity column via an anti-Ets-1 antibody (20 µg). Beads were washed 30 min later and eluted with a low pH buffer. Presence of Ets-1, c-Jun, Erk-2 and Runx-1 in elution fraction was detected by Western blot using anti-Ets-1, anti-c-Jun, anti-Erk-2 and anti-Runx-1 antibodies. (B) Pull-down assay. Lysates of HIG-82 or Jurkat cells (250 µg) were incubated for 1 h at 4 °C in the absence (lane 1) or in the presence of biotinylated Ets-1 (lane 2) (10 µg) and 20 µl of streptavidin beads were added. Beads were washed 1 h later and boiled in Laemmli buffer to detect presence of Ets-1, c-Jun, Erk-2 and Runx-1 by Western blot using anti-Ets-1, anti-c-Jun, anti-Erk-2 and anti-Runx-1 antibodies.

ciation constants (k_d) were roughly equivalent. We can conclude that the higher affinity of Fli-1 compared to Erg-1 is due to its faster association with Ets-1. Biotinylated Ets-1 has thus proved to be a useful tool for kinetic analyses of Ets-1 interaction with its partners. This kind of tool will not only allow the construction of a map of the preferential partners of Ets-1, but will also provide quantitative data on specific interactions.

Discussion

Ets-1 is autoinhibited for its DNA-binding. DNA-binding affinity is increased by counteracting autoinhibition by (i) binding to EBS in a particular palindrome organization, as in the Stromelysin-1 promoter, or (ii) interacting in combination with cofactors at adja-

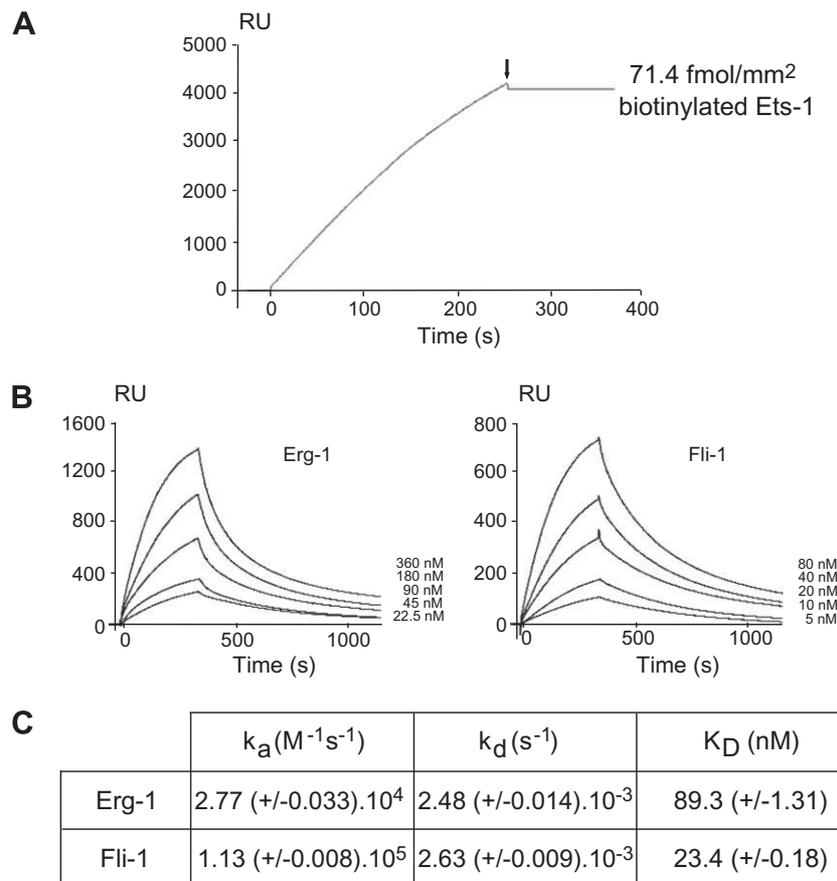


Fig. 5. Kinetic analysis of biotinylated Ets-1 interaction with Erg-1 and Fli-1 by SPR measurements. (A) Injection of biotinylated Ets-1 (85 nM) over a streptavidin Sensor Chip. The 4000 RU signal obtained corresponds to 71.4 fmol of biotinylated Ets-1 bound per surface unit (mm^2). The arrow indicates the end of injection. (B) Sensorgrams illustrating real-time binding at various concentrations of Erg-1 (22.5, 45, 90, 180 and 360 nM) or Fli-1 (5, 10, 20, 40 and 80 nM) to the Sensor Chip functionalized with 4000 RU of biotinylated Ets-1 protein. (A and B) A flow cell without biotinylated Ets-1 was used as a reference for nonspecific binding. Data are expressed as relative responses in resonance units (RU) after subtraction of the non-specific signal. (C) Parameters of biotinylated Ets-1 interaction with Erg-1 and Fli-1. Analysis was performed using BIA evaluation software 3.1 as described in Materials and methods section.

cent DNA elements, as in the Collagenase-1 promoter. Thus, the study of Ets-1 interaction partners is essential for understanding its mechanism of action. This kind of study requires the use of Ets-1 fused to a tag so that it can be copurified with its interaction partners. Due to its small size, the biotin tag should not alter Ets-1 properties. Further, because of the strong interaction between biotin and streptavidin, subsequent purifications can be assessed in various conditions. For the first time, we developed a strategy to produce a biotinylated recombinant Ets-1 protein in *E. coli*. To do so, we adapted the native recombinant T7-Impact™ protein expression system (New England Biolabs®) to induce biotinylation. The principle of this system is to express, through a pTyb2 vector, the protein of interest fused to an intein/chitin binding domain peptide in order to purify the recombinant protein on a chitin bead affinity column and elute the protein of interest by intein-mediated self-cleavage. Our adaptations to induce biotinylation included (i) cloning the sequence tag in-frame along with Ets-1 cDNA into a pTyb2 vector in order to synthesize tagged Ets-1 and (ii) coexpressing BirA biotin ligase with tagged Ets-1 in *E. coli* in order to ensure efficient biotinylation (Fig. 1). Despite the presence of endogenous biotin ligase in *E. coli*, expression of an exogenous enzyme improves biotinylation efficiency, as illustrated the 100% biotinylation yield that we obtained. This production system offered a high levels of expression of biotinylated Ets-1 fused to an intein/CBD peptide in induced bacteria lysate (20 mg from 1 l of culture) with considerable recovery (48%) of purified biotinylated Ets-1 (9.6 mg; Table 1). Only one contaminant was recovered in elution

fractions (Fig. 2), corresponding to DnaK, a bacterial analog of the human HSP-70 chaperon [30]. DnaK is often copurified with recombinant proteins expressed in *E. coli* and is known to improve their solubility [38]. Nevertheless, since DnaK is not biotinylated, it will not interfere with subsequent experiments, that involve streptavidin/biotin interaction.

This system has three major advantages: (i) it is easily applicable to various proteins and different isoforms of a given protein; (ii) the biotinylated protein, expressed in *E. coli*, is not post-translationally modified, and thereby allows the action of recombinant enzymes to control the protein state *in vitro*; and (iii) the straightforward production of biotinylated proteins can be used to rapidly screen numerous nuclear extracts or whole-cell lysates to purify interaction partners through their affinity for Ets-1. Therefore, this system is a powerful tool for a rapid analysis of the different states of both interaction partners, i.e. the protein of interest in, for example, various post-translational states, and its partner, in various culture conditions and cell types.

In the course of this study, we showed that biotinylated Ets-1 produced with this system conserves the Ets-1 DNA-binding and transactivation properties on the Stromelysin-1 promoter (Fig. 3). Biotinylated Ets-1 cooperatively bound to the EBS palindrome present in this promoter, forming a ternary complex. The formation of this ternary complex, which counteracts Ets-1 autoinhibition, proves that biotinylated Ets-1 is also autoinhibited for its DNA-binding. Conservation of the autoinhibited structure argues in favor of biotinylated Ets-1 conformational integrity. This consti-

tutes strong evidence that biotinylated Ets-1 conformation is not altered by the fusion of a biotin tag. In addition, biotinylated Ets-1 interacted with c-Jun, Erk-2 and Runx-1, which are known Ets-1 partners (Fig. 4A). Therefore, the biotinylated Ets-1, produced with this system, retained the properties of native Ets-1. Biotinylated Ets-1 thus constitutes a useful tool for experiments whose results can be directly transposable to native Ets-1.

In addition, since biotinylated Ets-1 complexed with its interaction partners is efficiently precipitated with streptavidin beads (Fig. 4B), biotinylated Ets-1 can be used to directly perform qualitative studies on Ets-1 interaction partners. Pull-down assays can be carried out to identify new interaction partners by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and mass spectrometry. Since it is tightly bound on streptavidin beads, biotinylated Ets-1 is clearly adapted for these kinds of experiments and many stringent washing conditions can be tested, decreasing the occurrence of aspecific interactions on beads and thereby improving the likelihood that coeluted molecules are genuine interaction partners. Our results also demonstrated that biotinylated Ets-1 is a useful tool, when compared to native Ets-1, for the quantitative analysis of interactions with its partners by SPR measurements (Fig. 5). Native Ets-1 can only be randomly immobilized onto the Sensor Chip by coupling lysine residues with the activated carboxyl groups of the Sensor Chip. The resulting surface is heterogeneous and, considering the inefficient linkage of Ets-1, is unfavorable for SPR experiments. Conversely, owing to the strong streptavidin/biotin interaction, biotinylated Ets-1 efficiently binds to a streptavidin Sensor Chip in a specific orientation. The resulting surface is homogenous and, consequently, optimal for SPR measurements. Furthermore, owing to the strength of the streptavidin/biotin interaction, almost no drift due to molecule dissociation from the Sensor Chip could be detected even after several injections. Retention of biotinylated Ets-1 on the Sensor Chip was extensively tested during our experiments in which we subjected the Sensor Chip to various injections of Erg-1 and Fli-1 recombinant proteins in order to test the reproducibility of our results. The high reproducibility of our results demonstrates that interactions of Ets-1 with various partners can be compared under exactly the same conditions. In conclusion, biotinylated Ets-1 proved to be a powerful tool that conserves native Ets-1 properties, providing an effective experimental system for qualitative and quantitative studies of Ets-1 interaction with partners.

Acknowledgments

We warmly thank Dr. Stephan Berger for generously providing the pCY216-BirA vector and Dr. Martine Duterque-Coquillaud for stimulating discussions. We are grateful to Isabelle Roland, Marlène Huyvaert, Emmanuelle Courtois and Marie-Véronique Joubert for technical assistance. This work was supported by the French National Center for Scientific Research (CNRS: *Centre National de la Recherche Scientifique*) and by a grant from the Pas-de-Calais Chapter of the French Cancer League (Comité du Pas-de-Calais de la Ligue contre le Cancer). The French Ministry of Research and Education provided a student fellowship to Clélia Laitem. The CNRS and the Nord-Pas-de-Calais Regional Council (Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais) provided a Ph.D. fellowship (BDI: *Bourse de Docteur-Ingénieur*) to Souhaila Choul-li.

References

- [1] B.J. Graves, J.M. Petersen, Specificity within the ets family of transcription factors, *Adv. Cancer Res.* 75 (1998) 1–55.
- [2] A.D. Sharrocks, The ETS-domain transcription factor family, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 827–837.
- [3] Dittmer J, The biology of the Ets1 proto-oncogene, *Mol. Cancer* 2 (2003) 29.
- [4] M.A. Pufall, B.J. Graves, Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18 (2002) 421–462.
- [5] D. Baillat, A. Begue, D. Stehelin, M. Aumercier, ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29386–29398.
- [6] J. Westermarck, A. Seth, V.M. Kahari, Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors, *Oncogene* 14 (1997) 2651–2660.
- [7] J.P. Basuyaux, E. Ferreira, D. Stehelin, G. Buttice, The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26188–26195.
- [8] W.Y. Kim, M. Sieweke, E. Ogawa, H.J. Wee, U. Englmeier, T. Graf, Y. Ito, Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains, *EMBO J.* 18 (1999) 1609–1620.
- [9] C. Wasyluk, A. Gutman, R. Nicholson, B. Wasyluk, The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins, *EMBO J.* 10 (1991) 1127–1134.
- [10] S.L. Hahn, B. Wasyluk, P. Ciqui-Filipe, Modulation of ETS-1 transcriptional activity by huUBC9, a ubiquitin-conjugating enzyme, *Oncogene* 15 (1997) 1489–1495.
- [11] M.H. Sieweke, H. Tekotte, U. Jarosch, T. Graf, Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells, *EMBO J.* 6 (1998) 1728–1739.
- [12] H. Pei, J.S. Yordy, Q. Leng, Q. Zhao, D.K. Watson, R. Li, EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function, *Oncogene* 22 (2003) 2699–2709.
- [13] C.M. Deane, L. Salwinski, I. Xenarios, D. Eisenberg, Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations, *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 349–356.
- [14] R.O. McCann, S.W. Craig, The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 5679–5684.
- [15] B. Lederer, P. Boger, A ligand function of glutathione S-transferase, *Z. Naturforsch. [C]* 60 (2005) 166–171.
- [16] M. Wilchek, E.A. Bayer, O. Livnah, Essentials of biorecognition: the (strept)avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction, *Immunol. Lett.* 103 (2006) 27–32.
- [17] M.G. Cull, P.J. Schatz, Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags, *Methods Enzymol.* 326 (2000) 430–440.
- [18] E. de Boer, P. Rodriguez, E. Bonte, J. Krijgsvelde, E. Katsantoni, A. Heck, F. Grosveld, J. Strouboulis, Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7480–7485.
- [19] E. Choi-Rhee, H. Schulman, J.E. Cronan, Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase, *Protein Sci.* 13 (2004) 3043–3050.
- [20] S.S. Ashraf, R.E. Benson, E.S. Payne, C.M. Halbleib, H. Gron, A novel multi-affinity tag system to produce high levels of soluble and biotinylated proteins in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 238–245.
- [21] E. de-Boer, P. Rodriguez, E. Bonte, J. Krijgsvelde, E. Katsantoni, A. Heck, F. Grosveld, J. Strouboulis, Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7480–7485.
- [22] F. Grosveld, P. Rodriguez, N. Meier, S. Krpic, F. Pourfarzad, P. Papadopoulos, K. Kolodziej, G.P. Patrinos, A. Hostert, J. Strouboulis, Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry, *Ann. NY Acad. Sci.* 1054 (2005) 55–67.
- [23] H. Ansuini, C. Cicchini, A. Nicosia, M. Tripodi, R. Cortese, A. Luzzago, Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e78.
- [24] A. Chapman-Smith, D.L. Turner, J.E. Cronan, T.W. Morris, J.C. Wallace, Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase, *Biochem. J.* 302 (1994) 881–887.
- [25] M.M. Jank, S. Bokorny, K. Rohm, S. Berger, Expression and biotinylation of a mutant of the transcarboxylase carrier protein from *Propioni shermanii*, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 123–127.
- [26] J.W. Dubendorff, F.W. Studier, Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor, *J. Mol. Biol.* 219 (1991) 45–59.
- [27] A. Khebnikov, T. Skaug, J.D. Keasling, Modulation of gene expression from the arabinose-inducible araBAD promoter, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 34–37.
- [28] F.B. Perler, E.O. Davis, G.E. Dean, F.S. Gimble, W.E. Jack, N. Neff, C.J. Noren, J. Thorner, M. Belfort, Protein splicing elements: inteins and exteins—a definition of terms and recommended nomenclature, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1125–1127.
- [29] S. Chong, F.B. Mersha, D.G. Comb, M.E. Scott, D. Landry, L.M. Vence, F.B. Perler, J. Benner, R.B. Kucera, C.A. Hirvonen, J.J. Pelletier, H. Paulus, M.Q. Xu, Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element, *Gene* 192 (1997) 271–281.
- [30] P. Genevaux, C. Georgopoulos, W.L. Kelley, The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions, *Mol. Microbiol.* 66 (2007) 840–857.

- [31] D. Baillat, G. Leprivier, D. Regnier, N. Vintonenko, A. Begue, D. Stehelin, M. Aumercier, Stromelysin-1 expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter, *Oncogene* 25 (2006) 5764–5776.
- [32] A.G. Bassuk, J.M. Leiden, A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells, *Immunity* 3 (1995) 223–237.
- [33] B. Wasylyk, C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, D. Stehelin, The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation, *Nature* 346 (1990) 191–193.
- [34] J.J. Seidel, B.J. Graves, An ERK2 docking site in the pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors, *Genes Dev.* 16 (2002) 127–137.
- [35] C.E. Foulds, M.L. Nelson, A.G. Blaszcak, B.J. Graves, Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 10954–10964.
- [36] C.W. Lin, P.D. Robbins, H.I. Georgescu, C.H. Evans, Effects of immortalization upon the induction of matrix metalloproteinases in rabbit synovial fibroblasts, *Exp. Cell. Res.* 223 (1996) 117–126.
- [37] S. Carrere, A. Verger, A. Flourens, D. Stehelin, M. Duterque-Coquillaud, Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains, *Oncogene* 16 (1998) 3261–3268.
- [38] A. Mogk, E. Deuerling, S. Vorderwulbecke, E. Vierling, B. Bukau, Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation, *Mol. Microbiol.* 50 (2003) 585–595.

III/ Discussion et conclusion

La technique de production de la protéine Ets-1 biotinylée, décrite dans cet article, est particulièrement intéressante dans le sens où la fusion de l'étiquette biotine et les conditions de production et de purification n'altèrent pas les propriétés fonctionnelles d'Ets-1. En effet, le maintien de cette structure est essentiel pour l'activité de cette protéine, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, puisqu'elle participe à la spécificité d'action d'Ets-1.

La protéine Ets-1 biotinylée produite par notre technique conserve les propriétés de fixation à l'ADN, de transactivation et d'interaction avec les partenaires protéiques connus de la protéine Ets-1 native. Les partenaires d'interaction que nous avons étudiés sont:

(1) c-Jun qui permet le recrutement d'Ets-1 au niveau des promoteurs de la collagénase-1, de la stromélysine-1, de la TIMP-1, du GM-CSF et de l'« enhancer » de polyome (voir Partie 1, Chapitre IV §II-3-1-d),

(2) Erk-2 qui permet la phosphorylation activatrice d'Ets-1 au niveau de la thréonine 38 (voir Partie 1, Chapitre IV §II-3-3-a),

(3) Runx-1 (ou AML-1) nécessaire à la fixation d'Ets-1 au niveau des promoteurs des chaînes α et β du TCR, du GM-CSF et de l'« enhancer » du Mo-MLV (voir Partie 1, Chapitre IV §II-3-1-a, §II-2-2-a et Chapitre III §III-2-1-b).

Cette protéine constitue également un outil efficace pour la réalisation d'études quantitatives puisqu'elle nous a permis de déterminer et de comparer, en utilisant la technologie Biacore®, les constantes d'affinité de l'interaction d'Ets-1 avec d'autres protéines de la famille Ets, Fli-1 et Erg-1.

Un tel outil semble très intéressant pour identifier les partenaires protéiques des différentes isoformes d'Ets-1, ce qui devrait fournir de nouveaux indices pour comprendre leurs diverses fonctions.

PUBLICATION N°2

La protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) est un nouveau partenaire d'interaction des isoformes d'Ets-1

I/ Préambule

Les résultats sont présentés sous forme d'une publication rédigée en anglais qui est sous-pressé dans le journal « Biochemical and Biophysical Research Communications ». Des résultats supplémentaires seront ensuite exposés.

II/ Résumé

Dans cette étude, nous avons utilisé les isoformes d'Ets-1 biotinylées pour isoler par affinité *in vitro* leurs nouveaux partenaires protéiques, présents dans les extraits de deux lignées cellulaires cancéreuses, grâce à la réaction streptavidine-biotine.

Cette approche a permis d'isoler les isoformes d'Ets-1 associées à leurs partenaires d'interaction. Les protéines d'interaction majeures sont ensuite analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (« matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight ») et identifiées par soumission des séquences à des bases de données. Parmi ces protéines, trois font parties du même complexe, le complexe DNA-PK (« DNA deependant-protein kinase ») constitué d'une sous-unité catalytique DNA-PKcs (« DNA-PK catalytic subunit ») et des deux protéines Ku70 et Ku86, formant la sous-unité régulatrice hétérodimérique Ku. Nous avons ensuite montré que :

- les interactions entre Ets-1 et les partenaires identifiés ne sont pas cellule-dépendantes,
- les isoformes d'Ets-1 interagissent avec les protéines du complexe DNA-PK dans la cellule et d'une façon indépendante de l'ADN,
- la DNA-PK phosphoryle les isoformes d'Ets-1 *in vitro*,
- la transactivation du gène de la stromélysine-1 induite par Ets-1 est réprimée par la protéine Ku86.

L'ensemble de ces données confirme l'importance des interactions protéine-protéine dans la modulation de l'activité d'Ets-1 et ajoute la DNA-PK comme une nouvelle kinase de phosphorylation d'Ets-1.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

DNA-dependent protein kinase is a novel interaction partner for Ets-1 isoforms

Souhaila Choul-li, Hervé Drobecq, Marc Aumercier*

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Univ Lille Nord de France, IFR 142; B.P. 447, 1 rue du Pr. Calmette, 59021 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2009

Available online 21 October 2009

Keywords:

Ets-1
Protein–protein interaction
Streptavidin pull-down
DNA-PK
Phosphorylation
Transcriptional regulation

ABSTRACT

The Ets-1 transcription factor plays an important role in various physiological and pathological processes. These diverse roles of Ets-1 are likely to depend on its interaction partner proteins. We used our previously developed, recombinant biotinylated Ets-1 that conserves native Ets-1 properties to identify new interaction partners. Here, based on results from streptavidin pull-down assays, mass spectrometry and co-immunoprecipitation, we report a novel interaction partner for Ets-1 isoforms: a heterotrimeric complex of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), made up of Ku70, Ku86, and DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKcs). Kinase assays performed *in vitro* showed that DNA-PK phosphorylates the Ets-1 protein. Furthermore, we demonstrated that Ku86, but not Ku70 or DNA-PKcs, down-regulated the transcriptional activity of Ets-1 when analysed using a reporter gene assay. These results illustrate how detecting novel molecular interactions may provide new clues for understanding the diverse functions of Ets-1.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Ets-1 is the founding member of the Ets family characterized by a well-conserved DNA binding domain (DBD). It regulates gene expression by binding to specific DNA elements, called ETS-binding sites (EBS), found in the promoters of its target genes [1]. By binding to these elements, Ets-1 activates the transcription of various genes involved in numerous cellular mechanisms, including angiogenesis, apoptosis, and tumour invasion [2]. Human Ets-1 has three isoforms: p51, the predominant full-length isoform, p42 and p27, shorter alternatively spliced isoforms lacking the region encoded by exon VII and exon III–VI, respectively [3,4]. Protein–protein interactions appear to regulate multiple Ets-1 functions, including reception of cellular signals, selection of target genes, modulation of its ability to bind DNA and regulation of transcriptional activity [5]. To date, several interaction partners have been reported for Ets-1 p51 such as AP-1, Sp1, Erk1/2, and ATF-2; two for Ets-1 p42: EAPI and EAPII proteins [2,5]; and none for Ets-1 p27 that has only recently been characterized [4]. Identifying novel proteins that interact with Ets-1 isoforms is an important step toward a better understanding of the intrinsic functions of the Ets-1 isoforms.

DNA-PK is a nuclear serine/threonine protein kinase composed of a catalytic subunit, DNA-PKcs, and two regulatory subunits, Ku86 and Ku70 [6]. DNA-PK is implicated in a variety of cellular processes, including the repair of double-stranded DNA breaks, V(D)J recombination, telomere maintenance and transcriptional regulation [6,7]. Furthermore, DNA-PK has been shown to phos-

phorylate many proteins involved in transcriptional regulation, such as c-Myc, Sp1, Oct-1, and RNA polymerase II [6].

In this study, we identified DNA-PK subunits as novel interaction partners of Ets-1 isoforms. Furthermore, we characterised the functional consequences of the interaction between Ets-1 and DNA-PK.

Materials and methods

Vector construction. The construction of pTyb2 vector expressing human Ets-1 p51 fused to a biotin tag (biot), a pcDNA3 vector expressing human Ets-1 p51 and *stromelysin-1* promoter reporter vector have been previously described [8,9]. To construct pTyb2-biot-Ets-1 p42 and pTyb2-biot-Ets-1 p27, human Ets-1 p42 and Ets-1 p27 cDNAs were cloned into a pTyb2-biot vector using the same primers and restriction sites used to construct pTyb2-biot-Ets-1 p51.

Expression and purification of biotinylated recombinant Ets-1 protein. Biotinylated Ets-1 protein was produced and purified as described previously [8], using the principle of the T7-Impact™ System (New England Biolabs®) adapted to induce biotinylation.

Cell culture. Three human cell lines, MDA-MB-231, MG-63, and HEK-293 cells, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen™) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin.

Nuclear extract preparation. Cells were harvested and pellets were washed with cold PBS solution and then suspended in buffer-A (10 mM Hepes pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.5 mM dithiothreitol (DTT); protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH)). The cell suspension was kept on ice for 10 min and vortexed to obtain cell nuclei. After centrifugation, the nuclear pellets

* Corresponding author. Fax: +33 320 871 111.

E-mail address: marc.aumercier@ibl.fr (M. Aumercier).

were resuspended in buffer-B (20 mM Hepes pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 25% glycerol; 0.2 mM EDTA; 420 mM NaCl; 0.5 mM DTT; protease inhibitor cocktail) for 20 min at 4 °C. The homogenates were centrifuged at 20,000g for 5 min and supernatants were stored at –80 °C.

Streptavidin pull-down assay. Streptavidin sepharose™ beads (Amersham Biosciences) (30 µl) were washed with PBS and blocked by incubating for 1 h at 4 °C in PBS with 1 mg/ml bovine serum albumin (Sigma–Aldrich®). Biotinylated Ets-1 proteins (50 µg) were incubated with the prepared streptavidin sepharose™ beads for 30 min at 4 °C under constant rotation. Beads were then washed with buffer containing 20 mM Hepes pH 7.9; 200 mM NaCl; 20% glycerol; 0.25 mM EDTA; 0.2% Igepal and 0.2 mM PMSF. The Ets-1 loaded beads were then incubated for 1 h at 4 °C with 1.5 mg of pre-cleared nuclear extracts from MDA-MB-231 or MG-63 cells, adjusting to 150 mM NaCl in buffer-B without NaCl. After extensive washing, bound proteins were eluted by boiling for 5 min in Laemmli buffer (50 mM Tris pH 6.8; 2% SDS; 5% β-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.1% bromophenol blue) and resolved on 10% SDS–PAGE followed by colloidal blue staining (Invitrogen™).

For DNase I treatment, MDA-MB-231 nuclear extracts were adjusted to 150 mM NaCl in buffer-B without NaCl or EDTA and supplemented with 7 mM MgCl₂. DNase I was added to a final concentration of 50 µg/ml and samples were incubated at 4 °C for 40 min. Samples were then incubated with biotinylated Ets-1 bound to streptavidin beads, as described above.

Mass spectrometry analysis. Protein bands of interest were excised from the gel and subjected to trypsin digestion. The trypsin digests were then analysed by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry on a Voyager-DE STR (Applied Biosystems). The data were analysed by the ProFound search programme.

Western blot analysis and streptavidin-HRP assay. Western blot analysis and streptavidin-HRP assay were performed as previously described [8,10]. Primary antibodies used were C-20 anti-Ets-1 (Santa Cruz), Ab-2 anti-DNA-PKcs, Ab-7 anti-Ku86, and Ab-4 anti-Ku70 (NeoMarkers).

Co-immunoprecipitation assay. Nuclear extracts from MDA-MB-231 or MG-63 cells (1 mg of proteins), diluted to a final concentration of 150 mM NaCl in buffer-B without NaCl, were pre-cleared with 4 µg of normal rabbit IgG-agarose conjugate (Santa Cruz) for 1 h at 4 °C with rotation. The supernatant was then incubated with 10 µg of C-20 anti-Ets-1-agarose conjugate (Santa Cruz) overnight at 4 °C with rotation. After centrifugation, agarose beads were washed four times with 150 mM NaCl buffer-B, resuspended in 20 µl of Laemmli buffer and heated at 95 °C for 5 min. The supernatant was analysed by Western blot using the various antibodies.

In vitro kinase assay. Phosphorylation of Ets-1 protein *in vitro* by DNA-PK was assayed using the SignaTECT DNA-PK Kinase Assay kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DNA-PK enzyme purified from HeLa nuclear extracts (20 U; Promega) was incubated with 4 µg of biotinylated Ets-1 bound to 10 µl of streptavidin beads and [γ -³²P]ATP (5 µCi), in the presence or absence of linear double-stranded DNA as an activator. Mixtures were incubated at 30 °C for 20 min, and the reactions were stopped by the addition of a termination buffer. Beads were then washed and biotinylated proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer. ³²P incorporation was determined by autoradiography of dried 12% SDS–PAGE gel.

Transfection and reporter gene assay. Transfection and reporter gene assay was performed as described previously [11]. Transfections were performed with the human *stromelysin-1* promoter pGL3 reporter vector and increasing amounts of the pcDNA3-Ku86, pcDNA3-Ku70 or pCMV6-DNA-PKcs expression vector in the presence or absence of the pcDNA3-Ets-1 p51 expression vector.

Results

Ets-1 isoforms interact with DNA-PK in vitro

To identify novel interaction partners of Ets-1 isoforms, we carried out an *in vitro* affinity purification strategy using a streptavidin pull-down assay. This approach required recombinant biotinylated Ets-1, developed using the T7-Impact™ protein production system that we adapted to induce biotinylation [8]. This biotinylation does not affect the functional properties of the Ets-1 p51 protein [8]. We applied the T7-Impact™ system to also produce biotinylated Ets-1 p42 and p27 isoforms. Western blot analysis to detect the purified Ets-1 isoforms and a streptavidin-HRP assay to detect biotinylated proteins (Fig. 1A) revealed that p42 and p27 isoforms were as efficiently biotinylated as Ets-1 p51.

The biotinylated Ets-1 isoforms were immobilized on streptavidin beads that were subsequently incubated with nuclear extracts prepared from MDA-MB-231 mammary adenocarcinoma cells or MG-63 osteosarcoma cells. Ets-1 recruited protein interaction partners that were then eluted and separated on SDS–PAGE and stained with colloidal blue (Fig. 1B). To confirm the specificity of the biotinylated Ets-1-bound proteins, we included two controls: (i) the biotinylated Ets-1 protein loaded on streptavidin beads as a control to identify any potential Ets-1 sub-fragments (i.e. breakdown products) (Fig. 1B; lanes 1, 4, and 7) and (ii) the nuclear extract incubated with unloaded beads as a non-specific control (Fig. 1B; lanes 2, 5, and 8). Three major proteins with molecular weight of over 400 kDa (Fig. 1B; arrow 1) and about 80 and 70 kDa (Fig. 1B; arrows 2 and 3, respectively) were pulled-down from MDA-MB-231 nuclear extracts with Ets-1 p51, p42, and p27 (Fig. 1B; upper panel; lanes 3, 6, and 9, respectively). No proteins were recovered with control beads indicating that proteins bound to loaded beads effectively interacted with Ets-1 isoforms. Interestingly, the band pattern observed from MDA-MB-231 cells appeared to be similar for MG-63 cells (Fig. 1B; lower panel; arrows 1', 2', and 3'). Thus, the Ets-1 interaction partners isolated with the streptavidin pull-down assay was independent of cell type.

The protein bands were excised from the gel and analysed by MALDI-TOF mass spectrometry. The mass map analysis (Table 1) demonstrated that the three analysed proteins, from each Ets-1 isoform and each cell line, belonged to the DNA-PK complex, including DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. Thus, these results identified a DNA-PK trimeric complex as a candidate Ets-1 interaction partner.

Since Ets-1 and DNA-PK proteins bind DNA, we tested whether their interaction was due to indirect co-pull-down by virtue of their association with DNA. To do so, we treated MDA-MB-231 nuclear extracts with DNase I before the streptavidin pull-down assay. Biotinylated Ets-1 p51 was able to associate with DNA-PK components with equal efficiency in extracts that were treated with DNase I (Fig. 1C; lanes 1 and 2) or not (Fig. 1C; lanes 3 and 4). Thus, DNase I treatment did not affect the interaction between Ets-1 and DNA-PK.

Ets-1 interacts with DNA-PK in the cell

To validate mass spectrometry results, proteins pulled-down from MDA-MB-231 nuclear extracts were analysed by colloidal-stained gel (Fig. 2A; left panel), then by Western blot using antibodies directed against Ku70/Ku86 or DNA-PKcs (Fig. 2A; right panel). The results show that these antibodies recognised their target proteins (Fig. 2A; lanes 3, 6, and 9) and we validated their absence in the controls (Fig. 2A; lanes 1–2, 4–5, and 7–8).

To further confirm the interaction of endogenous Ets-1 with the identified proteins in the cell, we carried out a co-immunoprecipitation assay in MDA-MB-231 or MG-63 nuclear extracts, using an

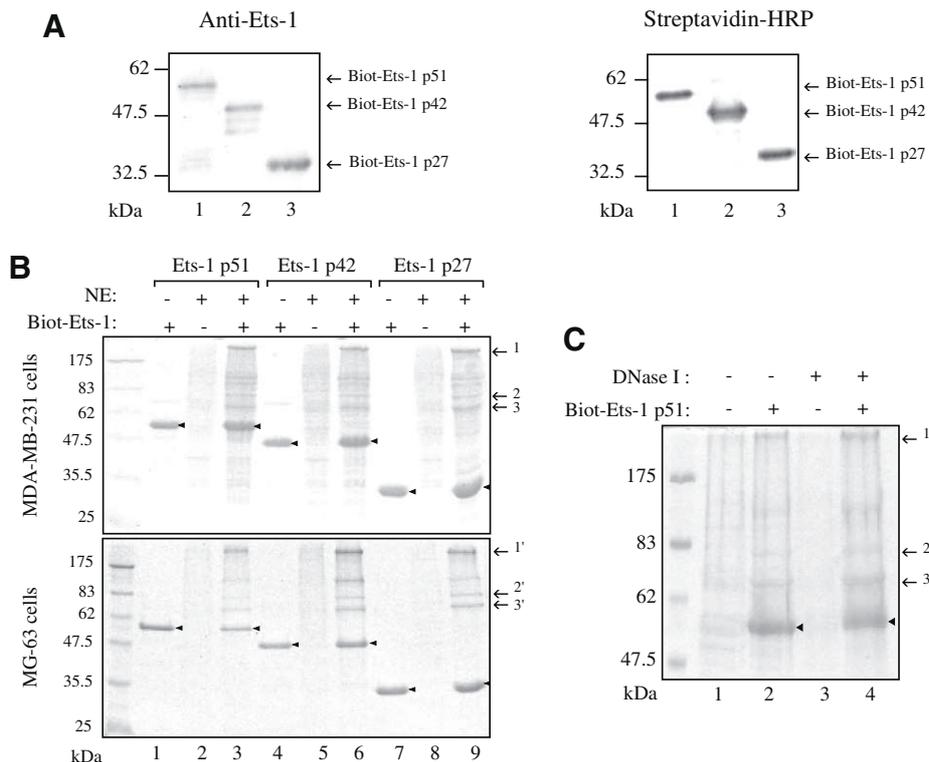


Fig. 1. Isolation of Ets-1 interaction partners. (A) Production of biotinylated Ets-1 isoforms. Biotinylated Ets-1 proteins were produced using the T7-IMPACT™ System. Purified proteins were analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) antibody to detect Ets-1 isoform proteins (Biot-Ets-1), and then with a streptavidin-HRP assay to detect biotinylated proteins. (B) Colloidal blue-stained gel for Ets-1-associated proteins from MDA-MB-231 (upper panel) or MG-63 (lower panel) nuclear extracts. Biotinylated Ets-1 isoforms used for the pull-down assay were loaded alone as a control to designate the biotinylated proteins (arrowheads) and their potential breakdown products (lanes 1, 4, and 7). Pull-down proteins detected from nuclear extracts (NE) incubated with unloaded beads were considered to be non-specific products (lanes 2, 5, and 8). The colloidal blue-stained specific proteins pulled-down by biotinylated Ets-1 are denoted by arrows 1–3 and 1'–3' (lanes 3, 6, and 9) for MDA-MB-231 and MG-63 cells, respectively. (C) Ets-1 interacts with the DNA-PK complex independently of DNA. MDA-MB-231 nuclear extracts were either untreated (lanes 1 and 2) or treated with DNase I for 40 min (lanes 3 and 4) prior to incubation with streptavidin beads loaded with biotinylated Ets-1 p51 (lanes 2 and 4) or with unloaded beads (lanes 1 and 3). Ets-1-p51-associated proteins were analysed by SDS-PAGE followed by colloidal blue staining. Arrows 1–3 indicate the three major proteins detected in (B).

Table 1
Ets-1 interaction partners identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

Band	Identified protein	Molecular mass (kDa)	Accession No. ^a	Score ^b	Sequence coverage ^c (%)
1, 1'	DNA-PKcs	465	P78527	285	12
2, 2'	Ku86	86	P13010	144	15
3, 3'	Ku70	69.7	P12956	91	16

Bands 1, 2, and 3: proteins isolated from MDA-MB-231 nuclear extracts.

Bands 1', 2', and 3': proteins isolated from MG-63 nuclear extracts.

^a NCBI accession number.

^b ProFound protein score.

^c Fraction of full-length protein recovered in peptide.

anti-Ets-1 antibody-agarose conjugate. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and subjected to an immunoblot with anti-DNA-PKcs, anti-Ku86 or anti-Ku70 antibodies. The result demonstrates that DNA-PKcs, Ku86 and Ku70 co-precipitated with Ets-1 from both MDA-MB-231 (Fig. 2B; lane 2) and MG-63 cells (Fig. 2C; lane 2). Control experiments performed using IgG from normal rabbit serum failed to recruit any of these proteins (Fig. 2B and C; lane 1). Thus, we suggest that Ets-1 interacts with the identified DNA-PK proteins in the cell.

Ets-1 isoforms are phosphorylated by DNA-PK *in vitro*

DNA-PK is a serine/threonine protein kinase that has been reported to phosphorylate many proteins *in vitro*, including transcription factors [6]. To study whether Ets-1 is one of the targets

of DNA-PK, we performed *in vitro* kinase assays using biotinylated Ets-1 p51, p42, or p27 as substrates. Proteins immobilized on streptavidin beads were incubated with purified HeLa DNA-PK complex together with [γ -³²P]ATP and in the presence or absence of supercoiled plasmid DNA. The proteins were separated on SDS-PAGE and labelled proteins were autoradiographed (Fig. 3). The three Ets-1 isoforms were phosphorylated by DNA-PK both in the presence and absence of DNA (Fig. 3; lanes 2–7). Furthermore, Ets-1 p51 was highly phosphorylated (Fig. 3; lanes 2 and 3) compared to Ets-1 p42 and p27. Thus, these results suggest that Ets-1 isoforms are novel DNA-PK substrates.

Ku86 down-regulates the Ets-1 p51 transcriptional activity

To determine whether the interaction with DNA-PK can modulate the transcriptional activity of Ets-1, luciferase transactivation assays were performed with the *stromelysin-1* matrix metalloproteinase promoter that is activated by Ets-1 p51 [9]. To do so, we used increasing concentrations of Ku86, Ku70, or DNA-PKcs, with or without Ets-1 p51. Ku86 had no effect on basal *stromelysin-1* promoter activity (Fig. 4A; lanes 1–4). Nevertheless, it down-regulated the transcriptional activity of Ets-1 p51 in a dose-dependent manner (Fig. 4A; lanes 5–8), with more than 40% down-regulation when present at a ratio of 1:1 with Ets-1 p51 (Fig. 4A; lane 7). However, Ku70 and DNA-PKcs had no effect on Ets-1 p51 transactivation (Fig. 4B and C; lanes 5–8). In addition, the over-expression of Ku70 and DNA-PKcs together with Ku86 did not affect its ability to down-regulate the transcriptional activity of Ets-1 p51 (data not

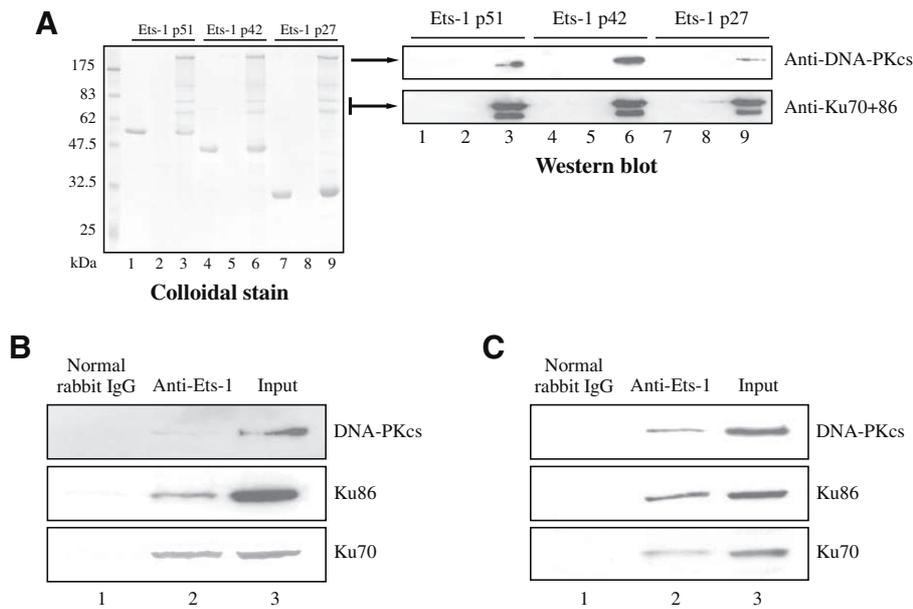


Fig. 2. Validation of Ets-1 interaction with DNA-PK. (A) Western blot analysis confirming the Ets-1-associated proteins as the trimeric DNA-PK complex. Proteins pulled-down from MDA-MB-231 nuclear extracts, as previously described in Fig. 1B, were analysed by colloidal blue-stained gel (left panel), then by Western blot analysis (right panel) using antibodies directed against DNA-PKcs and Ku70/Ku86. (B, C) DNA-PK interacts with Ets-1 in the cell. Co-immunoprecipitation was performed using an anti-Ets-1 (C-20) antibody-agarose conjugate (lane 2) or normal rabbit IgG as a control (4 μ g) and nuclear extracts from MDA-MB-231 cells (B) or MG-63 cells (C). Input (lane 3) contains 3% of nuclear extracts subjected to co-immunoprecipitation. DNA-PKcs, Ku70 and Ku86 were analysed by Western blot.

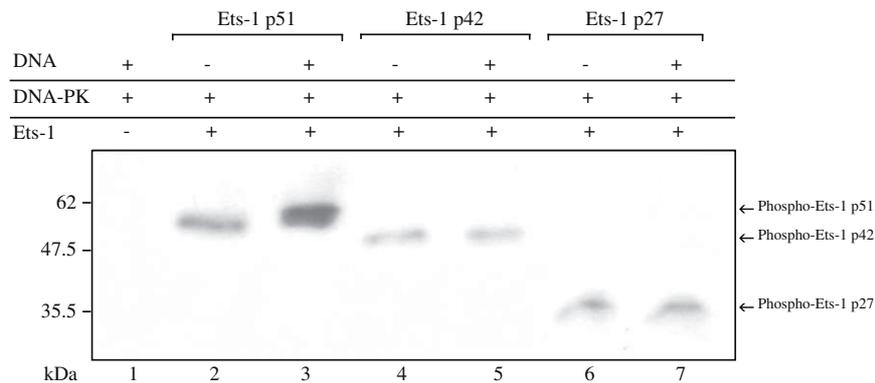


Fig. 3. DNA-independent phosphorylation of Ets-1 isoforms by DNA-PK. Biotinylated Ets-1 p51 (lanes 2 and 3), p42 (lanes 4 and 5) or p27 (lanes 6 and 7) of linear double-strand DNA as activator. After washing, [32 P] labelled proteins were eluted from the matrix, resolved on a 12% SDS-PAGE gel and visualized by autoradiography of the dried gel. DNA-PK alone was used as a negative control (lane 1).

shown). Thus, Ku86 interacted with Ets-1 p51 and led to the decrease of Ets-1 p51 transcriptional activity.

Discussion

Protein–protein interactions are one of the principal mechanisms by which the activity of transcription factors can be modulated. In this study, we identified DNA-PK subunits as novel proteins that associate in a complex with Ets-1 isoforms in MDA-MB-231 and MG-63 cells. These proteins were isolated *in vitro* using streptavidin pull-down assay, which had never been used to isolate Ets-1 interaction partners before. The interactions of DNA-PK with Ets-1 isoforms were confirmed by (i) DNase I treatment of nuclear extracts to exclude the possibility that the interaction was mediated by DNA; (ii) Western blot analysis to validate the mass spectrometry results; and (iii) by co-immunoprecipitation of the endogenous proteins to prove the existence of the interactions in the cell.

Previous reports have revealed that DNA-PK phosphorylates a number of transcription factors *in vitro* [6]. We demonstrated here that the isoforms of Ets-1 were phosphorylated *in vitro* by DNA-PK, even in the absence of DNA. Although DNA was originally shown to be a potent activator of DNA-PK [12], recent studies indicate that protein interactions may be another, more important mechanism for the activation of DNA-PK [13,14]. Thus, Ets-1 may stimulate DNA-PK kinase activity in the absence of DNA, and in turn, DNA-PK may phosphorylate Ets-1. This result confirms once more that DNA-PK kinase activity can be stimulated by interaction with proteins. Furthermore, it constitutes a novel kinase for Ets-1 phosphorylation in addition to CaMKII and Erk2, which are known to phosphorylate Ets-1 in response to calcium signalling and in the Ras-MAPK pathway, respectively [15,16].

The results from the DNA-PK assay showed that Ets-1 p51 was highly phosphorylated by DNA-PK compared to the p42 and p27 isoforms (Fig. 3). This can be explained by the fact that full-length Ets-1 p51 is phosphorylated at more than one amino-acid residue,

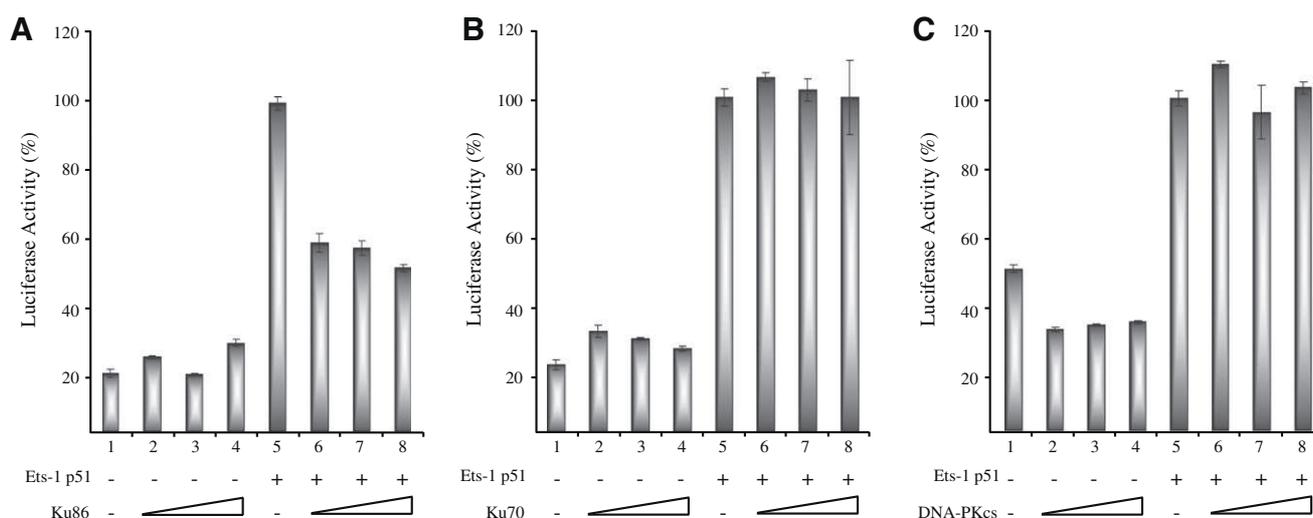


Fig. 4. Ku86, but not Ku70 or DNA-PKcs, down-regulates Ets-1 p51 transcriptional activity. (A, B and C) pGL3 luciferase reporter construct driven by the *stromelysin-1* promoter (200 ng) was transfected into HEK-293 cells in the absence or in the presence of Ets-1 p51 expression vector (100 ng; lanes 5–8) and with increasing amounts of the Ku86 (A; 0–200 ng; lanes 2–4 and 6–8), Ku70 (B; 0–200 ng; lanes 2–4 and 6–8) or DNA-PKcs expression vector (C; 0–200 ng; lanes 2–4 and 6–8). Luciferase activity, measured 48 h after transfection, was normalized to *renilla* activity using a pRLnull vector (1.25 ng) and is expressed as the percentage of *stromelysin-1* promoter activity induced by Ets-1 p51. Results are the average of two experiments performed in triplicate.

some of which are absent in the Ets-1 splice variants. Indeed, after screening of Ets-1 p51, p42, and p27 amino-acid sequences for putative DNA-PK phosphorylation sites, consisting of serines or threonines followed by glutamines (SQ or TQ) [17], we identified three, one and two sites, respectively. This observation requires further evaluation, especially since phosphorylation is one of the main mechanisms for modulating the activity of Ets-1 proteins [15,16].

Interaction with partners is crucial for regulating the transcriptional activity of Ets-1 p51. Moreover, several reports have implicated DNA-PK proteins, especially Ku dimer, in the regulation of gene transcription [6,7]. The effect of DNA-PK on the transcriptional activity of Ets-1 p51 was assessed on the *stromelysin-1* promoter, the regulation of which is well documented. This promoter is transactivated by Ets-1 p51, which is autoinhibited for its DNA binding [18]. This autoinhibition is counteracted by cooperative binding to a palindrome of two EBS, as found in the *stromelysin-1* and the p53 promoters [9,10,18,19]. Our results demonstrated that the over-expression of Ku86 decreased the transcriptional activity of Ets-1 p51 on the *stromelysin-1* promoter, while Ku70 and DNA-PKcs had no effect on Ets-1 p51 transactivation. The mechanism by which Ku86 down-regulates Ets-1 p51 activity may involve the inhibition of the ability of Ets-1 p51 to bind DNA. This mechanism has previously been reported for the ESE-1 protein whose activity is down-regulated by physical interaction with the Ku dimer [20]. Ku86 may also alter Ets-1 p51 activation of the *stromelysin-1* promoter through a simple protein–protein interaction. This possibility has been reported for several transcription factors, such as HoxC4 and Oct-1 [21], that interact with Ku dimer.

Taken together, our results confirm the importance of protein–protein interactions in modulating Ets-1 function and raise a number of interesting questions on the physiological importance of the interaction of Ets-1 isoforms with DNA-PK. Addressing these questions will add new insight into the understanding of the biology of Ets-1.

Acknowledgments

We thank Dr. J.-P. Cartron for generously providing pcDNA3-Ku70 and pcDNA3-Ku86 and Dr. K. Meek for generously providing pCMV6-DNA-PKcs. We are grateful to Marie-Véronique Joubert

and Isabelle Roland for technical assistance. This work was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)* and by grants from the *Ligue contre le Cancer-Comité du Nord* and from the *Fondation pour la Recherche Médicale-Comité Nord-Pas-de-Calais*. The CNRS and the *Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais* provided a Ph.D. fellowship (BDI: *Bourse de Docteur-Ingénieur*) to Souhaila Choul-li.

References

- [1] A.D. Sharrocks, The ETS-domain transcription factor family, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 827–837.
- [2] J. Dittmer, The biology of the Ets1 proto-oncogene, *Mol. Cancer* 2 (2003) 29.
- [3] S. Koizumi, R.J. Fisher, S. Fujiwara, C. Jorczyk, N.K. Bhat, A. Seth, T.S. Papas, Isoforms of the human Ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation, *Oncogene* 5 (1990) 675–681.
- [4] C. Laitem, G. Leprévier, S. Choul-Li, A. Begue, D. Monte, D. Larsimont, P. Dumont, M. Duterque-Coquillaud, M. Aumercier, Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51, *Oncogene* 28 (2009) 2087–2099.
- [5] R. Li, H. Pei, D.K. Watson, Regulation of Ets function by protein–protein interactions, *Oncogene* 19 (2000) 6514–6523.
- [6] G.C. Smith, S.P. Jackson, The DNA-dependent protein kinase, *Genes Dev.* 13 (1999) 916–934.
- [7] W. Giffin, H. Torrance, D.J. Rodda, G.G. Prefontaine, L. Pope, R.J. Hache, Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription, *Nature* 380 (1996) 265–268.
- [8] C. Laitem, S. Choul-Li, D. Baillat, A. Begue, M. Aumercier, Efficient system for biotinylated recombinant Ets-1 production in *Escherichia coli*: a useful tool for studying interactions between Ets-1 and its partners, *Protein Expr. Purif.* 62 (2008) 53–63.
- [9] D. Baillat, A. Begue, D. Stehelin, M. Aumercier, ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the *stromelysin-1* promoter by counteracting autoinhibition, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29386–29398.
- [10] D. Baillat, G. Leprévier, D. Regnier, N. Vintonenko, A. Begue, D. Stehelin, M. Aumercier, *Stromelysin-1* expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter, *Oncogene* 25 (2006) 5764–5776.
- [11] G. Leprévier, D. Baillat, A. Begue, B. Hartmann, M. Aumercier, Ets-1 p51 and p42 isoforms differentially modulate *Stromelysin-1* promoter according to induced DNA bend orientation, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 4341–4352.
- [12] K.K. Leuther, O. Hammarsten, R.D. Kornberg, G. Chu, Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA, *EMBO J.* 18 (1999) 1114–1123.
- [13] L. Ko, W.W. Chin, Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11471–11479.

- [14] C. Schild-Poulter, L. Pope, W. Giffin, J.C. Kochan, J.K. Ngsee, M. Traykova-Andonova, R.J. Hache, The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16848–16856.
- [15] B.S. Yang, C.A. Hauser, G. Henkel, M.S. Colman, C. Van Beveren, K.J. Stacey, D.A. Hume, R.A. Maki, M.C. Ostrowski, Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 538–547.
- [16] B. Rabault, J. Ghysdael, Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28143–28151.
- [17] S.T. Kim, D.S. Lim, C.E. Canman, M.B. Kastan, Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37538–37543.
- [18] C. Wasylyk, A. Gutman, R. Nicholson, B. Wasylyk, The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins, *EMBO J.* 10 (1991) 1127–1134.
- [19] D. Baillat, C. Laitem, G. Leprivier, C. Margerin, M. Aumercier, Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 213–217.
- [20] H. Wang, R. Fang, J.Y. Cho, T.A. Libermann, P. Oettgen, Positive and negative modulation of the transcriptional activity of the ETS factor ESE-1 through interaction with p300, CREB-binding protein, and Ku 70/86, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25241–25250.
- [21] A. Schaffer, E.C. Kim, X. Wu, H. Zan, L. Testoni, S. Salamon, A. Cerutti, P. Casali, Selective inhibition of class switching to IgG and IgE by recruitment of the HoxC4 and Oct-1 homeodomain proteins and Ku70/Ku86 to newly identified ATTT cis-elements, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23141–23150.

III/ Résultats supplémentaires

L'étude présentée dans l'article N°2 illustre l'interaction physique et fonctionnelle entre les isoformes d'Ets-1 et la DNA-PK. Néanmoins, d'autres partenaires protéiques isolés avec les isoformes d'Ets-1 ont été également identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces protéines, présentées dans le tableau 8, correspondent à :

- **PARP-1**, enzyme impliquée dans divers processus, notamment la réparation des cassures d'ADN. La PARP-1 exerce également une autre fonction, qui consiste à contrôler l'activité de certains gènes. Elle le fait, non seulement parce qu'elle peut modifier les histones de la chromatine, mais aussi parce qu'elle se lie à certains facteurs de transcription. Cette fonction ne fait pas nécessairement intervenir les propriétés catalytiques de la protéine,

- **SMARCA5** (« SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 »), appelée aussi ISWI ou SNF2H), un membre de la famille SWI/SNF du remodelage de la chromatine. Cette protéine a une activité hélicase et ATPase et régule la transcription de certains gènes en modifiant la structure de la chromatine autour de ces gènes,

- **ADN topoisomérase I**, une enzyme nucléaire jouant un rôle catalytique et structural dans l'organisation chromatinienne.

Protéine identifiée	Masse moléculaire (kDa)	Numéro d'accèsion ^a	Score ^b	Pourcentage de recouvrement ^c
PARP-1	112,9	P09874	65	13
SMARCA5	122	O60264	55	13
ADN topoisomérase I	90,7	P11387	64	16

Tableau 9 : Partenaires d'interaction des isoformes d'Ets-1 identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

^a : numéro d'accèsion NCBI, ^b : score obtenu par le moteur de recherche ProFound, ^c : le pourcentage de recouvrement correspond au nombre de peptides de la protéine analysée recouvrant la séquence de la protéine identifiée par la banque.

Parmi ces protéines identifiées, nous avons pu confirmer l'interaction entre Ets-1 et la PARP-1 dans un contexte cellulaire. Ceci est apporté par co-immunoprécipitation réalisée avec les protéines nucléaires de cellules MDA-MB-231 et MG-63, en utilisant un anticorps anti-Ets-1 (C-20) conjugué à des billes d'agarose. Les protéines fixées à Ets-1 endogène sont ensuite éluées puis séparées par SDS-PAGE suivie d'un Western-blot avec un anticorps anti-PARP-1 (H-250, Santa Cruz Biotechnology). Le résultat montre que la protéine PARP-1 est co-immunoprécipitée avec Ets-1 dans les cellules MDA-MB-231 et MG-63 (Figure 39). Ainsi, Ets-1 interagit avec la PARP-1 dans un contexte cellulaire.

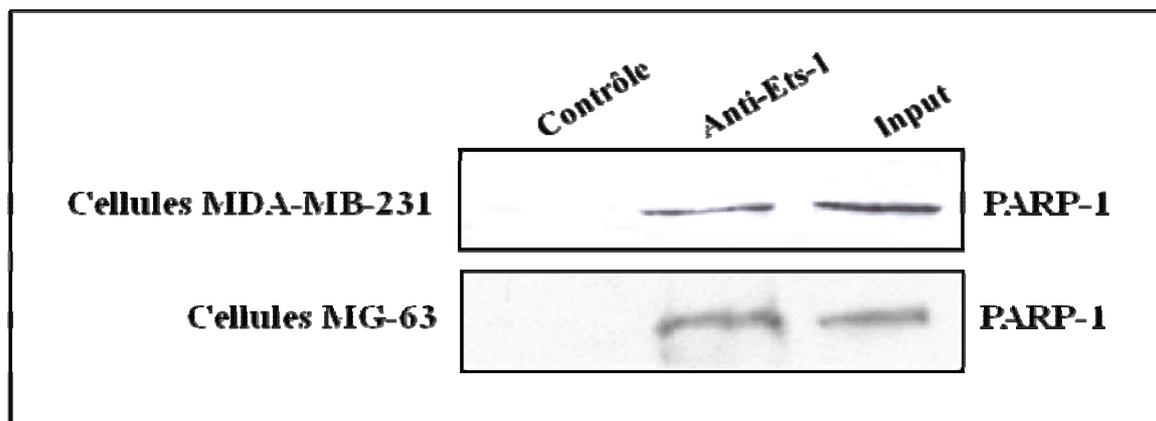


Figure 37 : La PARP-1 interagit avec Ets-1 dans la cellule.

La protéine Ets-1 associée à ses partenaires protéiques est co-immunoprécipitée à partir des extraits des cellules MDA-MB-231 et des cellules MG-63, en utilisant l'anticorps anti-Ets-1 (C-20) conjugué à des billes d'agarose. Le contrôle correspond à une co-immunoprécipitation réalisée avec des IgG de lapin couplées à des billes d'agarose. L'input contient 3% des protéines nucléaires utilisées en co-immunoprécipitation. L'éluat a été analysé par Western-blot avec un anticorps anti-PARP-1.

IV/ Discussion et conclusion

Les résultats présentés dans cet article ont permis de mettre en évidence de nouveaux partenaires d'interaction communs aux isoformes d'Ets-1. Jusqu'à présent, les protéines partenaires d'Ets-1 ont été mises en évidence par GST pull-down ou par criblage en double hybride chez la levure. La technique de purification de partenaires par streptavidin pull-down que nous avons mis en œuvre est utilisée pour la première fois pour Ets-1. Cette stratégie représente un outil performant et idéal, de par sa facilité d'adaptation et sa rapidité, pour la mise en évidence de nouveaux partenaires protéiques d'Ets-1.

Plusieurs protéines ont été isolées par cette technique et identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Parmi celles-ci, nous avons pu confirmer l'interaction entre Ets-1 et la DNA-PK dans un contexte cellulaire. DNA-PK est un complexe clé intervenant principalement dans la réparation des cassures de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues [383, 384]. Ce complexe représente également une cible d'un grand intérêt dans le traitement du cancer. En effet, l'inhibition de son activité potentialise la sensibilité des cellules cancéreuses aux radiations ionisantes ainsi qu'aux agents chimio-toxiques [385, 386]. Le système de réparation étant déficient, les dommages subis par l'ADN conduisent à la mort de la cellule. De plus, il semblerait que la DNA-PK soit également impliquée dans d'autres processus cellulaires tels que le maintien de l'intégrité des télomères, le système de recombinaison V(D)J (nécessaire au remaniement des gènes codant les immunoglobulines et le récepteur des cellules T) et l'apoptose [387]. Au cours ces dernières années, un nouveau rôle a été attribué à la DNA-PK, et notamment à la sous-unité régulatrice Ku, qui consiste à réguler la transcription [387, 388].

L'identification de la DNA-PK comme partenaire d'interaction d'Ets-1 suggère une nouvelle régulation de l'activité d'Ets-1. Cette régulation réside, d'une part, dans la modification post-traductionnelle d'Ets-1. En effet, la DNA-PK qui possède une activité sérine/thréonine kinase, phosphoryle Ets-1 *in vitro*. L'activité kinase de la DNA-PK est activée soit par l'ADN, soit par des interactions protéine-protéine. Etant donné que la DNA-PK phosphoryle Ets-1 indépendamment de l'ADN, nous suggérons que c'est son interaction avec Ets-1 qui active son activité kinase, comme décrit pour certains facteurs de transcription [389, 390].

D'autre part, le deuxième niveau de régulation d'Ets-1 *via* son interaction avec la DNA-PK consiste à moduler la transcription des gènes cibles d'Ets-1. En effet, la

surexpression de Ku86, mais pas de Ku70 ni de la DNA-PKcs, diminue la transactivation du gène de la stromélysine-1 induite par Ets-1. Cet effet peut être expliqué soit par une inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1, soit par une co-répression transcriptionnelle due à la simple interaction protéine-protéine.

Etant donné l'importance des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation (voir Partie 1, Chapitre IV §II-2) et l'interaction avec des partenaires protéique (voir Partie 1, Chapitre IV §II-3) dans la régulation de l'activité d'Ets-1, l'étude de l'interaction entre Ets-1 et la DNA-PK devrait participer à une meilleure compréhension des diverses fonctions d'Ets-1 (voir Partie 1, Chapitre V).

PUBLICATION N°3

Le clivage d'Ets-1 p51 par les caspases génère un fragment à effet dominant négatif transcriptionnel

I/ Préambule

Les résultats sont présentés sous forme d'un article rédigé en anglais qui est actuellement en révision pour publication dans « Biochemical Journal ». Des résultats complémentaires seront ensuite exposés et analysés.

II/ Résumé

Dans cette publication, nous avons mis en évidence le mécanisme à la base de la diminution de la quantité de la protéine Ets-1 pendant le processus apoptotique. Nous avons montré que :

- dans des cellules apoptotiques, la diminution du taux d'Ets-1 endogène est accompagnée par la génération de trois fragments C-terminaux Cp20, Cp17, Cp14 et un fragment N-terminal Np36. Ces fragments sont issus du clivage de la protéine Ets-1 par les caspases, principaux acteurs de la machinerie apoptotique,
- la caspase responsable de la production des fragments de clivage d'Ets-1 est la caspase-3,
- la protéine Ets-1 de pleine longueur, mais pas le variant d'épissage Ets-1 p42, est clivée par la caspase-3 *in vitro* et dans des cellules apoptotiques,
- les fragments d'Ets-1 sont issus des clivages au niveau de trois sites de coupure par les caspases de séquence DXXD, présents dans la région codée par l'exon VII,
- le principal produit de clivage, Cp17 agit comme un dominant négatif transcriptionnel d'Ets-1.

Des résultats supplémentaires nous ont également permis de mettre en évidence que :

- le fragment Cp17 a un effet négatif sur la survie des cellules, et ce en induisant la mort cellulaire,

- l'isoforme Ets-1 p27 représente également un substrat de la caspase-3. En effet, Ets-1 p27 est clivée au niveau des trois sites de clivage présents dans la région codée par l'exon VII, générant ainsi les mêmes fragments C-terminaux qu'Ets-1 p51.

L'ensemble de ces données montre que la diminution de la quantité de la protéine Ets-1 pendant l'apoptose est la conséquence de son clivage par la caspase-3. Ce clivage génère un fragment majoritaire, Cp17, à fonction de dominant négatif naturel d'Ets-1 de pleine longueur. L'expression de ce fragment dans les cellules induit leur mort cellulaire.

Title:**Caspase cleavage of Ets-1 p51 generate fragments with transcriptional dominant-negative function**

Souhaila Choul-li, Catherine Leroy, Gabriel Leprivier, Clélia Laitem,
David Tulasne* and Marc Aumercier*

* These authors conducted equally this work.

SYNOPSIS

Ets-1 is a transcription factor that plays an important role in various physiological and pathological processes, such as development, angiogenesis, apoptosis and tumour invasion. Here we demonstrate that Ets-1 p51, but not the spliced variant Ets-1 p42, is processed in a caspase-dependent manner in Jurkat T-leukaemia cells undergoing apoptosis, resulting in three C-terminal fragments Cp20, Cp17 and Cp14 and a N-terminal fragment, Np36. *In vitro* cleavage of Ets-1 p51 by caspase-3 produces fragments consistent with those observed in cells undergoing apoptosis. These fragments are generated by cleavage at three sites located in the exon VII-encoded region of Ets-1 p51. This region is absent in the Ets-1 p42 isoform, which therefore cannot be cleaved by caspases. In Ets-1 p51, cleavage generates C-terminal fragments containing the DNA binding domain but lacking the transactivation domain. The Cp17 fragment, the major cleavage product generated during apoptosis, is devoid of transcriptional activity and inhibits Ets-1 p51-mediated transactivation of target genes by competing with Ets-1 p51 for binding to Ets-binding sites present in the target promoters. In this study, we demonstrate that caspase cleavage of Ets-1 within the exon VII-encoded region leads to specific down-regulation of the Ets-1 p51 isoform during apoptosis. Further, our results establish that caspase cleavage generates a stable C-terminal fragment that acts as a natural dominant-negative of the full-length Ets-1 p51 protein.

INTRODUCTION

Apoptosis is a genetically controlled form of cell death that plays a critical role during development and tissue homeostasis by ensuring the removal of damaged or unnecessary cells [1]. Apoptotic stimulation leads to the cascade activation of cysteine proteases called caspases, which carry out the apoptotic program by cleaving numerous substrates [2]. Disruption in the regulation of apoptosis underlies the pathogenesis of many human diseases, including autoimmune diseases, neurodegenerative disorders and cancers [3].

Since caspase-mediated proteolysis is crucial for the apoptotic process [4], identification of the molecular targets of caspases is necessary to better understand apoptotic signal transduction. Indeed, several classes of cellular proteins have been shown to be cleaved by caspases during apoptotic cell death [5]. This usually results in either inactivation or activation of proteins that protect living cells or promote cell death. Among those substrates, several transcription factors are inactivated during apoptosis by caspase-3 including SRF [6], Retinoid Acid Receptor- α (RAR- α) [7] and NF-kappa B p65/RelA subunit [8]. Likewise, in the Ets transcription factor family, Fli-1 has been shown to be cleaved in murine preB leukemic cells undergoing programmed cell death by a caspase-like activity and *in vitro* by caspase-3 [9].

Ets-1 is the founding member of the Ets family characterised by a well-conserved DNA-binding domain (DBD), called the ETS domain. It regulates gene expression by binding to specific DNA elements, called Ets-binding sites (EBS), found in the promoters of its target genes [10, 11]. By binding to these elements, Ets-1 activates the transcription of various genes involved in numerous cellular mechanisms such as development, angiogenesis, proliferation and apoptosis [12]. However, when overexpressed, Ets-1 is involved in the development of invasive pathologies such as rheumatoid arthritis [13], glomerulonephritis [14] and cancers [12].

In humans, two isoforms of Ets-1 have been described: p51, the predominant, full-length isoform, and p42, a shorter, alternatively spliced isoform that lacks the exon VII-encoded region [15]. As a result of their respective structures, Ets-1 p51 and Ets-1 p42 isoforms have different DNA binding and transcriptional properties [16-18]. Ets-1 p51 is autoinhibited for DNA binding due to the presence of two inhibitory domains that flank and interact with its DBD [19]. To counteract autoinhibition and improve DNA binding, Ets-1 p51 interacts with partners, enabling them to cooperatively bind to adjacent DNA elements [20]. Ets-1 p51 can also counteract its autoinhibition without any interaction partners by binding to

a particular palindromic arrangement of two EBS separated by 4 bp, as in the *stromelysin-1* matrix metalloproteinase and the *p53* oncosuppressor promoters [17, 21, 22]. Two molecules of Ets-1 p51 cooperatively bind to the EBS palindrome, thereby forming an Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p51 ternary complex that is critical for full transactivation [17]. In contrast, Ets-1 p42 only forms a binary Ets-1 p42/DNA complex, which is much less efficient in promoting transactivation [17, 18]. These differences contribute to the Ets-1 isoform-specific modulation of particular target genes, illustrating that Ets-1 function can be regulated through the exon VII-encoded region [23, 24].

Ets-1 p51 displays pro- and anti-apoptotic functions according to the biological context. Ets-1 p51 is required for the formation of a stable DNA-p53-CBP complex to induce pro-apoptotic genes in the process of UV-induced apoptosis in embryonic stem cells [25]. Furthermore, overexpression of Ets-1 p51 in human umbilical vein endothelial cells induces apoptosis under serum-deprived conditions by up-regulating pro-apoptotic genes [26]. Anti-apoptotic functions have been ascribed to Ets-1 p51 in vascular smooth muscle cells protecting them from undergoing apoptosis by activating the transcription of $p21^{\text{waf1/cip1}}$ [27]. Moreover, Ets-1 p51 inhibits the expression of the pro-apoptotic gene *bax* by interacting with the transcription factor Growth Factor Independent-1 (GFI-1) in the composite site present in the *bax* promoter [28]. In contrast, Ets-1 p42 isoform expression seems to be essentially associated with apoptosis. The expression of Ets-1 p42, unlike that of Ets-1 p51, promotes Fas-mediated apoptosis by directly up-regulating ICE/caspase-1 gene expression in human colon cancer DLD-1 cells [24, 29]. Ets-1 p42 expression can also induce apoptosis of these cells in low-serum conditions [30]. Furthermore, Ets-1 p42-expressing DLD-1 cell xenografts in nude mice inhibit the tumorigenicity of the DLD-1 cancer cells by inducing apoptosis [29].

Previous studies have shown that the basal level of Ets-1 p51 decreases in cells undergoing apoptosis. For example, an apoptotic inducer, curcumin, decreases the amount of Ets-1 p51 protein in human endometrial carcinoma HEC-1-A cells in a time- and dose-dependent manner [31]. Likewise, flow cytometry and confocal microscopy analysis have shown that Ets-1 expression is down-regulated in peripheral blood mononuclear (PBMC) and bursal cells induced to apoptosis [32].

In this study, we demonstrate that the induction of apoptosis in human acute T-cell leukaemia (Jurkat) cells causes a decrease in Ets-1 p51 levels that is associated with the generation of caspase-dependent fragments. Furthermore, we characterise the mechanisms and the functional consequences of Ets-1 p51 cleavage on the transcriptional modulation of Ets-1 target genes.

EXPERIMENTAL

Cell culture and induction of apoptosis

Human Embryonic Kidney (HEK-293) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 µg/ml gentamycin. To induce apoptosis, HEK-293 cells were incubated 24 h after transfection in medium supplemented with 1 µM staurosporin (Calbiochem®, San Diego, CA, USA) for 8 h. Jurkat human T-leukaemia cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen™) supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamycin. To induce apoptosis, Jurkat cells (3×10^6) were incubated in medium supplemented with 1 µM staurosporin for 4 h. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 50 µg/ml gentamycin and 100 µg/ml penicillin-streptomycin. To induce apoptosis, MDCK cells were incubated 24 h after transfection in medium supplemented with 10 µM anisomycin (Calbiochem) for 8 h. To inhibit caspase activity, cells were preincubated for 30 min with 20 µM benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (zVAD-FMK; Calbiochem) prior to treatment with staurosporin. Rabbit synovial fibroblasts (HIG-82) cells (ATCC, Manassa, VA, CRL-1832) were cultured in F-12 medium (Invitrogen™), supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamycin, between passage 7 and 14.

Cell lysates

Jurkat and HEK-293 cells were lysed by sonication (10 s, 16 µm amplitude) in 100 µl of buffer (50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)). MDCK cells were suspended in 200 µl of lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.5; 100 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.5 mM EGTA; 0.25 mM EDTA; 0.1% Nonidet P-40; 10 mM NaF; 20 mM β-glycerophosphate; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM PMSF; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml aprotinin). Total protein concentration was measured by colorimetry (Bio-Rad assay) before Western blot analysis.

Expression vector construction

The construction of a pcDNA3 vector expressing human Ets-1 p51 fused to a Flag tag is described in ref. [33]. The pcDNA3 vector expressing human Ets-1 p42 fused to a Flag tag was obtained by the same strategy as the Flag-Ets-1 p51 pcDNA3 expression vector, using the human Ets-1 p42 pSG5 expression vector [17] as a template. To produce Ets-1 p51 mutants,

Asp (D) residues were replaced by Asn (N) residues in position 262 for D1N, 262/287/290 for D3N and 262/287/290/313 for D4N using the QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene[®], La Jolla, CA, USA). Briefly, the pcDNA3 vector expressing human Ets-1 p51 fused to a Flag tag was used as a template for PCR amplification, using the following primers in which mutated codons are underlined: 5'-TACGATAGTTGTAATCGCCTCACCCAG-3' and 5'-CTGGGTGAGGCGATTACA ACTATCGTA-3' for the D262N mutation; 5'-GACAGCTTCAAACTCAGAGAAACTATCCGGCTGCC-3' and 5'-GGCAGCCGGATAGTTCTCTGAGTTGAAGCTGTC-3' for the D287/290N mutations and 5'-CGGGACCGTGCTAACCTCAATAAGGACAAG-3' and 5'-CTTGTCCTTATTGAGGTTAGCACGGTCCCG-3' for the D313N mutation.

To produce the Cp17 fragment, the sequence coding amino acids 291-441 of Ets-1 p51 was obtained by PCR amplification, using the following primers: 5'-AATCACTAAGATCTTATCCGGCTGCCCTGCCCAACC-3' and 5'-TATGCGGCCGCTCACTCGTCGGCATCTGGCTTGAC-3'. The PCR product was then cloned between the *Bam*HI and *Not*I restriction sites in a modified pcDNA3 expression vector (kindly provided by Dr D. Monté). This vector contained the coding sequence for a Flag epitope followed by a *Bam*HI site. To produce the Np36 fragment, the sequence coding amino acid 1-262 of Ets-1 p51 was obtained by PCR amplification, using the following primers: 5'-ATTTAAAGATCTAAGGCGGCCGTCGATCTC-3' and 5'-AATCACTAAGATCTATCACA ACTATCGTAGCTCTC-3'. The PCR product was then cloned in the *Bam*HI site of the modified pcDNA3 expression vector. For all vectors, correct insertion was checked by sequencing. The construction of the -478/+4 wild-type and EBS mutant human *stromelysin-1* promoter pGL3 reporter vector (Promega, Madison, WI, USA) and the construction of the -607/+51 TORU mutant human *collagenase-1* promoter pGL2 reporter vector are described in refs. [17, 33]. The -607/+51 wild-type human *collagenase-1* promoter pGL2 reporter vector as well as the c-Jun and the c-Fos encoding pSG5 vectors were kindly provided by Dr M. Duterque-Coquillaud.

The construction of the bacterial expression vector containing the cDNA sequence of human Ets-1 p51 is described in ref. [17].

Transient transfection

HEK-293, HIG-82 or MDCK cells were grown in six-well plates to reach 40-60% confluence at the time of transfection. Transfection of HEK-293 and HIG-82 cells was performed by incubating the ExGen 500 transfection reagent, according to the manufacturer's instructions

(Euromedex, Souffelweyersheim, France), with 1 µg of expression vectors. Transfection of MDCK cells was performed using the lipofection method [34].

***In vitro* caspase cleavage reactions**

After 48 h of transfection, HEK-293 cells and Jurkat cells were lysed in 80 µl of caspase buffer (20 mM PIPES pH 7.2; 100 mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5 mM dithiothreitol (DTT); 0.05 mM EDTA). Cell lysates were incubated 4 h at 37°C with 1 µl of purified caspase. Reactions were stopped by incubation at 70 °C for 1 min in denaturing buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8; 4% SDS; 20% Glycerol; 100 mM DTT). Total cell lysate proteins were then analysed by Western blot. Purified active caspases were generously provided by Dr G.S. Salvesen. Titration of the active recombinant caspases were obtained using *in vitro* cleavage against synthetic substrates as previously described (caspase-3, 13.9 µM; caspase-6, 7.5 µM; caspase-7, 19.7 µM; caspase-8, 15 µM; caspase-9, 41.5 µM) [35].

Transfection and luciferase reporter gene assay

HEK-293 cells were grown in 12-well plates to reach 40-60% confluence at the time of transfection. Transfections were then performed by incubating the ExGen 500 transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Euromedex), with 500 ng of vectors. Transfections were carried out with increasing amounts of the Cp17 or the Np36 expression vector and human *stromelysin-1* or *collagenase-1* promoter reporter vector in the presence or absence of the Ets-1 p51 expression vector. Cells were harvested 48 h after transfection with 200 µl of passive lysis buffer (Promega) and each supernatant was sequentially tested for firefly and *renilla* luciferase activity (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega) using a Centro LB 960 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) luminometer. For each expression vector combination and concentration, firefly luciferase activity (pGL-2/3 constructs) was normalised to the *renilla* activity (pRL-null normalisation vector (Promega)) to correct for variation in the number of transfected cells. Expression of proteins of interest was tested by Western blot analysis.

Western blot analysis

Total cell lysate proteins were boiled in Laemmli buffer (50 mM Tris pH 6.8; 2% SDS; 5% β-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.1% bromophenol blue) and resolved by SDS/PAGE. Proteins in gels were transferred to a HybondTM-C Extra membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and blocked for 1 h at room temperature in 5% non-fat milk in PBS

solution. The membrane was then incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature in blocking buffer. Ets-1 was detected with the C-20 polyclonal antibody directed against the C-terminal region or the N-276 polyclonal antibody directed against the N-terminal region (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, CA, USA), Erk-2 with the C-14 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology[®]), cleaved caspase-3 with the 5A1 polyclonal antibody (Cell Signaling Technology[®], Beverly, MA), c-Jun with the H-79 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology[®]) and c-Fos with the H-125 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology[®]). The washed membrane was then incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology[®]) in blocking buffer. Bound antibodies were visualized using Western Lightning[™] chemiluminescence detection system (Perkin Elmer Life Sciences Biotechnology[®]). For quantification of Western blot protein expression, luminescence was recorded using a digital camera with a cooled charge-coupled device (LAS 3000; Fuji) and quantified using the Multi Gauge V3.0 image analysis software (Fuji Film). Reprobing was performed using the Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping solution according to the manufacturer's instructions (Millipore, Temecula, CA).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Double-stranded synthetic oligonucleotides corresponding to the WT and EBS mutant of the human *stromelysin-1* (-223/-193) promoter region were end-labelled using T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP, and were subsequently purified by electrophoresis on a 20% polyacrylamide non-denaturing gel in TBE buffer (90 mM Tris-Borate; 1 mM EDTA). Cell lysates prepared (30 μ g) from HEK-293 cells transfected with the expression vector, empty or encoding Cp17 fragment, or with recombinant Ets-1 p51 protein (1 μ g) were incubated with 0.5 ng of labelled probe in 40 μ l binding reaction buffer (20 mM Tris pH 7.9; 80 mM NaCl, 1 mM EDTA; 2 mM DTT, 40 μ g/ml poly[dI-dC]poly[dI-dC] (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA); 10% glycerol) for 30 min on ice. Complexes formed were resolved on a 5% polyacrylamide (29:1 acrylamide:bisacrylamide; Euromedex) non-denaturing gel in 0.25X TBE buffer at room temperature. Gels were dried and autoradiographed at -80 °C. For probe competition, 400 ng of non-labelled probe (800X) were added to the reaction mixture. For protein competition, cell lysates (30 μ g) prepared from HEK-293 cells transfected with increasing amounts of the Cp17 expression vector was incubated with recombinant Ets-1 p51 protein (0.5 μ g) with 0.5 ng of WT-labelled probe in the same conditions.

Expression and purification of Ets-1 p51 protein

Ets-1 p51 was expressed and purified using the T7-ImpactTM System (new England Biolabs[®]) as previously described [17].

RNA extraction and RT-PCR assays

RNA was extracted from HIG-82 cells using TRIzol[®], according to the manufacturer's instructions (InvitrogenTM). Reverse-transcription was performed with random hexameric oligonucleotides with 1 µg of cDNA using the RevertAidTM First Strand cDNA kit (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). PCR reactions were performed with the High Fidelity PCR Master mixture (Roche, Meylan, France) with 500 ng of reverse-transcribed RNAs and with 125 ng of forward and reverse primers for each of four genes: human *ets-1*, 5'-ATGAAGGCGGCCGTCGATCTC-3' and 5'-TTGGTCCACTGCCTGTGTAG-3'; *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3' and 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'; *gelatinase-B*, 5'-CTGGGCAAGGGCGTCGTGGTC-3' and 5'-CGTGGTGCAGGCGGTGTAGGAG-3'; and *uPA*, 5'-CCATCCCGGTCCATACAGACT-3' and 5'-TCACAGCTTGTGCCAAAATTG-3'. PCRs were run for 35 cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s hybridization at 55°C and 30 s elongation at 72°C. Amplified products were analysed on 2% agarose gels run in 0.5X TBE buffer and stained with ethidium bromide.

RESULTS

Ets-1 is a substrate for caspases

To investigate Ets-1 fate during programmed cell death, Jurkat T-leukaemia cells, which endogenously express Ets-1 p51 and Ets-1 p42 isoforms, were treated with the apoptotic inducer staurosporin (Figure 1A). This stress stimulus was found to activate caspase-3 with detection in Western blot of the specific p19 and p17 caspase-3 fragments (Figure 1A, lane 2). This effect was associated with a decrease in Ets-1 levels and generation of three new Ets-1 fragments of about 14, 17 and 20 kDa in apparent molecular mass, designated as Cp14, Cp17 and Cp20, with Cp17 being the predominant fragment. These fragments were detected using an anti-Ets-1 antibody directed against its DBD located in the C-terminal region. Using an anti-Ets-1 antibody directed against its Pointed domain located in the N-terminal region, the same blot revealed a new Ets-1 fragment of about 36 kDa in apparent molecular mass,

designated as Np36 (Figure 1A, lane 2). This suggests that Ets-1 factor was cleaved, leading to generation of three C-terminal and one N-terminal fragments. Furthermore, Ets-1 processing was abrogated by the addition of the potent general caspase inhibitor zVAD-FMK to Jurkat cells medium prior to staurosporin treatment (Figure 1A, lanes 3 and 4), demonstrating that caspases are involved in Ets-1 cleavage.

To confirm that caspases are able to process the Ets-1 transcription factor, Jurkat cell extracts were exposed to recombinant active caspase-3 and analysed by Western blot using the same antibodies as in the previous experiment (Figure 1B). Results showed that recombinant active caspase-3 reduced endogenous Ets-1 levels (Figure 1B, lanes 1 and 2) and produced the same fragments as those generated after staurosporin treatment (compared Figure 1A, lane 2 and Figure 1B, lane 2), i.e. the Cp14, Cp17 and Cp20 C-terminal and the Np36 N-terminal fragments. These results unequivocally demonstrate that the Ets-1 protein is processed by caspases during apoptosis.

Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is cleaved *in vitro* by recombinant active caspase-3

To determine if one or both Ets-1 isoforms constitute caspase-3 substrates, Ets-1 p51 or Ets-1 p42 were exogenously expressed in HEK-293 cells, which do not encode Ets-1. Cell lysates were then exposed to recombinant active caspase-3 (Figure 2A). Western blot analysis revealed that exogenous Ets-1 p51 levels were drastically reduced after incubation with recombinant active caspase-3 (Figure 2A, lanes 3 and 4), whereas exogenous Ets-1 p42 levels were not affected (Figure 2A, lanes 5 and 6). Furthermore, the decrease in Ets-1 p51 intensities was associated with the production of the Cp14, Cp17, Cp20 and Np36 fragments (Figure 2A, lane 4). Thus, Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is a substrate of recombinant active caspase-3 *in vitro*.

The same experiment was performed using other recombinant active caspases, in particular caspase-3, -6, -7, -8 and -9 (Figure 2B). Results showed that among the tested proteases, the caspase-3 was the only one that cleaved exogenous Ets-1 p51 (Figure 2B, lanes 2-7), while Ets-1 p42 was not cleaved by caspase-3 or any other caspase (Figure 2B, lanes 8-13).

Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is cleaved in cells undergoing apoptosis

We then checked the consequences of apoptotic signals on the cleavage of Ets-1 p51 and Ets-1 p42 by caspases. Ets-1 p51 and Ets-1 p42 were expressed in HEK-293 cells, in the presence or absence of the apoptotic inducer staurosporin (Figure 3A). Western blot analysis of cell

lysates showed that the three C-terminal cleavage fragments were generated in cells expressing Ets-1 p51 (Figure 3A, lanes 5 and 6). Furthermore, the incubation of cells with zVAD-FMK abrogated the production of the cleavage fragments (Figure 3A, lanes 7 and 8). In contrast, the exogenous expression of Ets-1 p42 in HEK-293 cells did not generate any proteolytic fragments (Figure 3A, lanes 9-12). Taken together, these results show that exogenous Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is cleaved by caspases in apoptotic HEK-293 cells.

To determine whether the differential caspase cleavage of the two Ets-1 isoforms could occur in endogenous conditions, apoptosis of Jurkat cells was induced by staurosporin treatment and cell lysates were analysed by Western blot at several time intervals (Figure 3B). Upon induction of apoptosis, the three C-terminal fragments were generated as expected. The level of the Cp20 fragment, detected after 2 h, declined over the 8 h time course, suggesting that it may be degraded. In contrast, the Cp17 and Cp14 fragments were stable over time. Along with the generation of fragments, Ets-1 p51 levels simultaneously greatly decreased in a time-dependent manner, while Ets-1 p42 levels declined only weakly over the same period. The quantification of Ets-1 isoform levels in three independent experiments (Figure 3C) confirmed that the amount of Ets-1 p51 decreased about 60% during the 8 h time course experiment, while Ets-1 p42 level remained unchanged. Furthermore, the quantification of Cp17, the main fragment, showed that it was stable over time and that, 8 h after induction of apoptosis, the remaining full-length Ets-1 p51 decreased to a level similar to that of Cp17 (Figure 3C). Incubating cells with zVAD-FMK prior to staurosporin treatment abrogated the reduction of Ets-1 p51 levels (Figure 3B, lane 5 and Figure 3C) as well as the formation of cleavage fragments (Figure 3B, lane 5). Our results demonstrate that in Jurkat cells undergoing apoptosis, Ets-1 p51, unlike Ets-1 p42, is down-regulated. Taken together, this suggests that caspase cleavage of Ets-1 p51 during apoptosis contributes to the efficient degradation of Ets-1 and generates fragments of Ets-1.

Identification of caspase cleavage sites in Ets-1 p51

The cleavage motif for caspases is a sequence of four amino acids, numbered P4-P1, which is processed after the invariant P1 aspartic acid residue. The Asp-X-X-Asp is a cleavage motif present in many caspase-3 substrates [36, 37]. The amino-acid sequence of human Ets-1 p51 has three putative cleavage sites for caspases in the exon VII-encoded region, DSCD²⁶², a double site DSFD²⁸⁷SED²⁹⁰, and DRAD³¹³ (Figure 4Aa). The position of these sites is consistent with the generation of three C-terminal fragments of 20, 17 and 14 kDa (Figure

4Ab). In addition, the location of these sites in the exon VII-encoded region is consistent with the resistance of Ets-1 p42 to caspase cleavage.

To determine whether Ets-1 p51 is cleaved by caspases at these sites, site-directed mutagenesis was performed: (i) on the first putative caspase site in which Asp²⁶² was substituted by Asn (D1N); (ii) on the two first putative caspase sites in which Asp²⁶² and a double sites Asp²⁸⁷/Asp²⁹⁰ were mutated to Asn (D3N) and (iii) on all the caspase sites of the exon VII-encoded region (D4N) (Figure 4Ac).

After the exogenous expression of WT or mutant (D1N, D3N, D4N) Ets-1 p51 in HEK-293 cells, lysates were exposed to recombinant, active caspase-3 and analysed by Western blot (Figure 4B). In contrast to WT Ets-1 p51 (Figure 4B, lane 2), all three mutants were resistant to caspase-3 cleavage (Figure 4B, lanes 4, 6 and 8). Thus, DSCD²⁶² was an essential site for *in vitro* caspase-3 cleavage because its mutation abrogates the processing at the other sites.

Second, we assessed the role of these sites for Ets-1 p51 processing in MDCK cells undergoing apoptosis. MDCK cells exogenously expressing WT or mutant Ets-1 p51 were incubated with or without anisomycin and cell lysates were analysed by Western blot (Figure 4C). As expected, WT Ets-1 p51 generated the C-terminal fragments with Cp17 predominating (Figure 4C, lane 2). It is noteworthy that Ets-1 fragments occurred in the absence of any apoptotic inducer; this may be due to stress caused by transfection conditions (Figure 4C, lane 3), as previously reported for MDCK cells [38, 39]. The D1N mutant abrogated Cp20 generation, while Cp17 and Cp14 were still detectable (Figure 4C, lane 4), demonstrating that Cp20 was generated through cleavage on Asp²⁶² amino acid. The D3N mutant abrogated generation of all the fragments (Figure 4C, lane 6), demonstrating that cleavage on DSFD²⁸⁷SED²⁹⁰ is necessary for generation of the main Cp17 fragment and the secondary Cp14 fragment. Taken together, these results demonstrate that Ets-1 p51 was cleaved at caspase sites with aspartic acid located at positions 262, 290 and 313, allowing generation of the three C-terminal fragments Cp20, Cp17 and Cp14, respectively. In addition, DSCD²⁶² and DSFDSED²⁹⁰ sites are critical for cleavage *in vitro* and during apoptosis, respectively.

Cp17 binds to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter and competes with Ets-1 p51 for binding

Caspase cleavage during apoptosis generated Cp17, the major C-terminal fragment that conserves the DNA-binding domain surrounded by the two inhibitory domains (Figure 5A).

This suggests that Cp17 would be able to bind DNA as Ets-1 p51 does. To test this hypothesis, the nucleotide sequence of Cp17, which codes for amino acids 291-441 of Ets-1 p51 (Figure 5A), was cloned into a eukaryotic expression vector and used in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Assays were carried out using: (i) lysates from HEK-293 cells transfected with empty vector, (ii) lysates from HEK-293 cells transfected with Cp17 expression vector or (iii) Ets-1 p51 recombinant protein. Proteins were incubated with 30-mer ³²P-labeled DNA probes containing WT or mutant EBS palindromes of the *stromelysin-1* promoter (Figure 5B). Results showed that Ets-1 p51 formed a complex with the WT promoter (arrow 3; Figure 5B, lanes 5). This may correspond to a ternary complex with two protein molecules bound to the WT EBS palindrome, as previously reported [17]. Two complexes were detected with lysates from cells transfected with Cp17. The slower migrating band was probably a ternary complex (arrow 3'; Figure 5B, lane 9) because we detected a smaller binding species, which may correspond to a binary complex formed by one protein molecule bound to the *stromelysin-1* promoter (arrow 2; Figure 5B, lane 9). Mutation of the EBS palindrome prevented both Ets-1 p51 and Cp17 forming DNA/protein complexes (Figure 5B, lanes 6 and 10). These complexes were disrupted by an excess of non-labelled WT DNA probe (Figure 5B, lanes 7 and 11), but not by an excess of non-labelled double-mutant DNA probe (Figure 5B, lanes 8 and 12), confirming that these complexes were specific to the EBS palindrome.

Next, we assessed the ability of Cp17 to compete with Ets-1 p51 for DNA binding. EMSA experiments were carried out using a 30-mer ³²P-labelled WT DNA probe and increasing concentrations of Cp17 exogenously expressed in HEK-293 cells, with or without recombinant Ets-1 p51 (Figure 5C). Results showed that the Ets-1 p51/ DNA/Ets-1 p51 ternary complex (Figure 5C, arrow 3, lane 6) was disrupted in the presence of Cp17 (Figure 5C, lanes 7-9). This disruption was accompanied by the formation of intermediate complexes (indicated by arrow i) with lower molecular masses, which may be composed of both Ets-1 p51 and Cp17. Thus, the Cp17 cleavage fragment competes with Ets-1 p51 for binding to the EBS palindrome in the *stromelysin-1* promoter.

Cp17 cleavage fragment is a dominant negative for Ets-1 p51 transactivation

The caspase cleavage within the exon VII-encoded region separates the N-terminal transactivation domain from the C-terminal DNA binding domain. This suggests that Cp17 would be a dominant negative for Ets-1 p51-mediated transcription. To test this hypothesis, luciferase transactivation assays were performed with the WT or EBS mutant *stromelysin-1*

promoter using increasing concentrations of Cp17 with or without Ets-1 p51 (Figure 6A). Cp17 was unable to substantially activate the *stromelysin-1* promoter on its own (Figure 6A, upper part, lanes 1-4). Nevertheless, it repressed in a dose-dependent manner the Ets-1 p51-induced activation of the WT promoter (Figure 6A, upper part, lanes 5-8), with more than 60% suppression when present at a 1:1 ratio with Ets-1 p51 (Figure 6A, lane 7). This was mediated through the EBS palindrome because mutation of both EBS abrogated any Cp17 effects (Figure 6A, middle part). Protein expression was confirmed by Western blot for Ets-1 p51, Cp17, and Erk-2 as a loading control (Figure 6A, lower part). Thus, Cp17 acts as a dominant negative for Ets-1 p51 transactivation of the *stromelysin-1* promoter mediated through the EBS palindrome.

Second, we examined the effect of Cp17 on the *collagenase-1* matrix metalloproteinase promoter, another Ets-1 target gene, which is synergistically activated by Ets-1 p51 and c-Jun/c-Fos (AP-1) complex, through the TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) Oncogene Response Unit (TORU), composed of an EBS adjacent to an AP-1 site [40]. Luciferase transactivation assays were performed with *collagenase-1* promoter (WT or EBS/AP-1 mutant) using increasing concentrations of Cp17 with or without Ets-1 p51 and the c-Jun/c-Fos complex (Figure 6B). Cp17 repressed, in a dose-dependent manner, the synergistic activation of the *collagenase-1* promoter induced by Ets-1 p51 and the c-Jun/c-Fos complex (Figure 6B, upper part). This was mediated through the TORU, since its mutation abrogated any Cp17 effects (Figure 6B, middle part). Thus, Cp17 acts also as a dominant negative for Ets-1 p51 transactivation of the *collagenase-1* promoter mediated through the TORU.

We then checked the transcriptional response of the N-terminal Np36 fragment. The nucleotide sequence, which codes for amino acids 1-262 of Ets-1 p51, was cloned in a eukaryotic expression vector and used in luciferase transactivation assays. Results showed that Np36 does not inhibit the Ets-1 p51-induced transcriptional activation of the *stromelysin-1* and *collagenase-1* promoters, due to the absence of the DBD domain (Figure 6D). Thus, in contrast to Cp17 fragment, the Np36 fragment is not able to inhibit the transcriptional activity of Ets-1 p51.

Cp17 decreases the Ets-1 p51 target genes expression

Given the dominant-negative function of Cp17, we explored its effect on the expression of endogenous Ets-1 p51 target genes. To this aim, we performed RT-PCR analysis on HIG-82 rabbit synovial fibroblasts, which endogenously express the Ets-1 protein and represent a

good model to study the transcriptional regulation of Ets-1 target genes [41]. We transfected these cells with an empty vector, with a human Ets-1 p51 expression vector or with both human Ets-1 p51 and Cp17 expression vectors. Results showed that the overexpression of human Ets-1 p51 alone induced an increase in the mRNA levels of well-known Ets-1 target genes, such as *gelatinase-B* and *uPA* (Figure 7; compare lane 2 and 3), indicating that Ets-1 p51 up-regulated the expression of these genes. However, the overexpression of both Ets-1 p51 and Cp17 decreased the mRNA levels of these target genes (Figure 7; lane 4). This shows that Cp17 inhibits the expression of endogenous Ets-1 target genes, confirming its dominant-negative function on Ets-1 p51.

DISCUSSION

Although previous studies have described the down-regulation of the Ets-1 p51 protein in cells undergoing apoptosis [31, 32], the molecular mechanism underlying this effect was not known. In this study, we demonstrated that the down-regulation of Ets-1 p51 protein in Jurkat T cells undergoing apoptosis is a consequence of its caspase-dependent cleavage. Caspase cleavage generated three C-terminal fragments, Cp14, Cp17 and Cp20, and one detectable N-terminal fragment, Np36. Screening the amino acid sequence of Ets-1 for putative caspase cleavage sites made possible to identify three consensual sites (DXXD) located in the exon VII-encoded region: DSCD²⁶², a double site DSFD²⁸⁷SED²⁹⁰ and DRAD³¹³. Mutational analysis indicated that Ets-1 p51 processing occurs at these sites, thus generating the Cp20, Cp17 and Cp14 fragments, respectively. Cp17 was the major fragment generated during apoptosis, suggesting that DSFD²⁸⁷SED²⁹⁰ is the main cleavage site. The N-terminal Np36 fragment detected during apoptosis may be the N-terminal counterpart of the C-terminal Cp20 fragment generated through cleavage at the DSCD²⁶² site. Consistent with the location of the caspase sites in the alternate exon VII-encoded region, Ets-1 p42 was not processed by caspases in *in vitro* cleavage experiments, nor during apoptosis.

The exon VII-encoded region of Ets-1 is a regulatory domain described as (i) a regulator of DNA-binding [16, 17, 41], (ii) a mediator of protein-protein interactions [42] and (iii) a target of calcium-mediated phosphorylation [43, 44]. The cleavage of Ets-1 p51 and not Ets-1 p42 allocates a new function to the exon VII-encoded region, thus expanding on the functional differences between the two Ets-1 isoforms.

Cleavage of Ets-1 p51 in the exon VII-encoded region separate the transactivation domain — crucial for transcriptional activity — from the rest of the molecule but leave the

DNA-binding domain intact. Therefore, C-terminal Ets-1 fragments containing the DBD should be able to bind to Ets-1 p51 target promoters without activating transcription, suggesting that they have a dominant-negative function. Our results confirmed this hypothesis for the major cleavage product, Cp17. Its DNA-binding and transcriptional properties were assessed on the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter, which has been shown to be an important target gene for Ets-1 and is involved in the process of tumour invasion and metastasis [45]. Our results demonstrated that Cp17 competes with Ets-1 p51 for binding to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter, demonstrating its dominant-negative effect on Ets-1 p51 binding. This competition involves the formation of an intermediate complex, suggesting that both proteins interact with each other on the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter. Cp17 forms also a binary complex with the DNA, which may represent a transient complex facilitating the binding of a second Cp17 molecule to form a ternary complex. This is consistent with previous work that showed that deleting the N-terminal region of Ets-1 p51 spanning from amino acids 1-300 does not alter the binding stoichiometry for the EBS palindrome found in the *stromelysin-1* promoter [17, 18]. It is noteworthy that we did not detect any binary complexes involving Ets-1 p51 because full-length Ets-1 p51 more readily forms ternary complexes. Furthermore, Cp17 inhibited Ets-1 p51 transactivation of the *stromelysin-1* promoter. This effect may be the result of Cp17 binding to the palindromic EBS, which then becomes inaccessible to Ets-1 p51. Cp17 also repressed the Ets-1 p51-mediated transactivation of the *collagenase-1* promoter. This may result from the ability of Cp17 to replace Ets-1 p51 in the interaction with the AP-1 complex (c-Fos/c-Jun), required for combinatorial regulation. This is supported by the fact that the interaction of Ets-1 p51 with the AP-1 complex is mediated through the DBD domain, which is conserved in Cp17 [12]. The N-terminal Np36 fragment did not have any effect on the Ets-1 p51-induced transcriptional activation of either the *stromelysin-1* or the *collagenase-1* promoters. This is consistent with the inability of Np36 to bind DNA because it lacks the DBD domain. This confirms that the dominant-negative effect of Cp17 effectively results from its binding to the Ets-1 p51 target promoters. Finally, Cp17 decreased Ets-1-induced expression of *uPA* and *gelatinase-B*, two well-known target genes of Ets-1, confirming the dominant-negative function of Cp17 on Ets-1 p51.

Ets-1 functions have been largely studied through the use of artificial dominant-negative constructs made up of the DBD domain of the molecule [23, 46]. These constructs have helped to demonstrate, for instance, the involvement of Ets-1 in tumorigenesis and angiogenesis [46-48]. The Cp17 fragment represents a natural dominant negative generated

by proteolytic cleavage, able to inhibit the transactivation response induced by the full-length protein. However, in contrast to artificial DBD constructs, Cp17 possesses the two inhibitory domains flanking the DBD. Cp17 is thereby more specific, particularly for promoters that have either palindromic EBS or adjacent DNA elements and that can be activated only by overriding Ets-1 autoinhibition.

Along the same lines, we recently demonstrated that a novel Ets-1 isoform, p27, which lacks the Pointed and the transactivation domains but conserves the DBD flanked by the two inhibitory domains, also acts as a dominant negative of Ets-1 p51 [33]. The overexpression of this novel isoform in invasive mammary carcinoma cells represses proliferation, transformation and invasion, and reduces the growth of tumour xenografts in nude mice. The splice variant Ets-1 p27 and the Ets-1 p51 cleavage product Cp17, both of which possess the DBD and the inhibitory domains, represent natural dominant negatives of the full-length protein generated by two different mechanisms.

The caspase-mediated generation of dominant-negative fragments has also been described for several other transcription factors. For instance, NF- κ B p65/RelA subunit [8] and SRF [6] provide two examples of transcription factors in which caspase cleavage leads to separation of the transactivation domain from the DNA binding domain. These truncated proteins are transcriptionally inactive and also act as dominant-negative inhibitors [6, 8].

Since some studies have shown that Ets-1 plays a role in apoptosis through the control of gene expression critical to this process, we can assume that down-regulation of Ets-1 p51 during apoptosis could prevent this transcriptional program. Following this line of reasoning, the dominant-negative function of Cp17 may provide an additional mechanism to amplify the cell death process by inhibiting the Ets-1 p51-mediated expression of anti-apoptotic proteins. This would be consistent with a previous study demonstrating that artificial Ets-dominant negatives suppress Ets transcriptional activity and induce programmed cell death — mediated by lower levels of c-myc expression — in thyroid carcinoma cell lines [23]. Although the anti-apoptotic target genes of Ets-1 p51 and their promoters are currently not well characterised, it would be interesting to assess the dominant-negative properties of Cp17 on these target genes. In addition, we demonstrated that caspase cleavage targets Ets-1 p51 without affecting the Ets-1 p42 isoform. Consequently, during apoptosis, the ratio between the two isoforms is modified in favour of the Ets-1 p42 isoform. Interestingly, it has been shown that, compared to Ets-1 p51, Ets-1 p42 is preferentially associated with the induction of apoptosis. Therefore, the modification of the ratio between the two isoforms may be a mechanism favouring cell death through the specific preservation of the pro-apoptotic isoform.

Taken together, our data suggest a novel mechanism of Ets-1 p51 regulation through caspase-mediated cleavage and generation of a dominant-negative fragment, which may play an active role during apoptosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Dr M. Duterque-Coquillaud for generously providing the human *collagenase-1* promoter as well as the pSG5-c-Fos, and pSG5-c-Jun vectors and Dr D. Monté for providing the pcDNA3-Flag vector. We are grateful to I. Roland for technical assistance.

FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by grants from the Ligue contre le Cancer-Comité Pas-de-Calais, the Fondation pour la Recherche Médicale-Comité Nord-Pas-de-Calais (to M.A. and D.T.), the Association pour la Recherche sur le Cancer and Agence Nationale de la Recherche-Young Investigator Program (to D.T.). A Ph.D. fellowship was provided to S.C. by the CNRS and the Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais (BDI: Bourse de Docteur-Ingénieur), to G.L. by the Ligue Nationale contre le Cancer and to C.L. by the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

REFERENCES

- 1 Song, Z. and Steller, H. (1999) Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol* **9**, M49-52
- 2 Thornberry, N. A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* **5**, R97-103
- 3 Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462
- 4 Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446
- 5 Luthi, A. U. and Martin, S. J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**, 641-650
- 6 Chang, J., Wei, L., Otani, T., Youker, K. A., Entman, M. L. and Schwartz, R. J. (2003) Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation* **108**, 407-413
- 7 Gianni, M. and de Thé, H. (1999) In acute promyelocytic leukemia NB4 cells, the synthetic retinoid CD437 induces contemporaneously apoptosis, a caspase-3-mediated

- degradation of PML/RARalpha protein and the PML retargeting on PML-nuclear bodies. *Leukemia* **13**, 739-749
- 8 Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R. and Raines, E. W. (1999) Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* **1**, 227-233
- 9 Sarrazin, S., Bonod-Bidaud, C., Remy, P., Mehlen, P. and Morle, F. (2002) Caspase cleavage of the transcription factor FLI-1 during preB leukemic cell death. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 123-127
- 10 Graves, B. J. and Petersen, J. M. (1998) Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* **75**, 1-55
- 11 Sharrocks, A. D. (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 827-837
- 12 Dittmer, J. (2003) The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**, 29
- 13 Redlich, K., Kiener, H. P., Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Selzer, E., Radda, I., Stummvoll, G. H., Steiner, C. W., Groger, M., Bitzan, P., Zenz, P., Smolen, J. S. and Steiner, G. (2001) Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* **44**, 266-274
- 14 Raffetseder, U., Wernert, N., Ostendorf, T., van Roeyen, C., Rauen, T., Behrens, P., Floege, J. and Mertens, P. R. (2004) Mesangial cell expression of proto-oncogene Ets-1 during progression of mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* **66**, 622-632
- 15 Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A. and Papas, T. S. (1990) Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**, 675-681
- 16 Fisher, R. J., Fivash, M., Casas-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K. and Papas, T. (1994) Real-time DNA binding measurements of the ETS1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci* **3**, 257-266
- 17 Baillat, D., Begue, A., Stehelin, D. and Aumercier, M. (2002) ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* **277**, 29386-29398
- 18 Leprivier, G., Baillat, D., Begue, A., Hartmann, B. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 p51 and p42 isoforms differentially modulate Stromelysin-1 promoter according to induced DNA bend orientation. *Nucleic Acids Res*
- 19 Lee, G. M., Donaldson, L. W., Pufall, M. A., Kang, H. S., Pot, I., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (2005) The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J Biol Chem* **280**, 7088-7099
- 20 Pufall, M. A. and Graves, B. J. (2002) Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 421-462
- 21 Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and Wasylyk, B. (1991) The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J* **10**, 1127-1134
- 22 Baillat, D., Laitem, C., Leprivier, G., Margerin, C. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 213-217
- 23 de Nigris, F., Mega, T., Berger, N., Barone, M. V., Santoro, M., Viglietto, G., Verde, P. and Fusco, A. (2001) Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res* **61**, 2267-2275

- 24 Li, R., Pei, H. and Papas, T. (1999) The p42 variant of ETS1 protein rescues defective Fas-induced apoptosis in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3876-3881
- 25 Xu, D., Wilson, T. J., Chan, D., De Luca, E., Zhou, J., Hertzog, P. J. and Kola, I. (2002) Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. *Embo J* **21**, 4081-4093
- 26 Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Iwasaka-Yagi, C., Takahashi, S., Yamada, S. and Sato, Y. (2001) Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **188**, 243-252
- 27 Zhang, C., Kavurma, M. M., Lai, A. and Khachigian, L. M. (2003) Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF/Cip1 promoter. *J Biol Chem* **278**, 27903-27909
- 28 Nakazawa, Y., Suzuki, M., Manabe, N., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Tenen, D. G., Iwama, A., Mochizuki, M. and Oikawa, T. (2007) Cooperative interaction between ETS1 and GFI1 transcription factors in the repression of Bax gene expression. *Oncogene* **26**, 3541-3550
- 29 Pei, H., Li, C., Adereth, Y., Hsu, T., Watson, D. K. and Li, R. (2005) Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis. *Cancer Res* **65**, 7205-7213
- 30 Huang, C. C., Papas, T. S. and Bhat, N. K. (1997) A variant form of ETS1 induces apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene* **15**, 851-856
- 31 Yu, Z. and Shah, D. M. (2007) Curcumin down-regulates Ets-1 and Bcl-2 expression in human endometrial carcinoma HEC-1-A cells. *Gynecol Oncol* **106**, 541-548
- 32 Koskela, K. and Lassila, O. (2003) Single-cell analysis of Ets-1 transcription factor expression during lymphocyte activation and apoptosis. *Scand J Immunol* **57**, 56-61
- 33 Laitem, C., Leprivier, G., Choul-Li, S., Begue, A., Monte, D., Larsimont, D., Dumont, P., Duterque-Coquillaud, M. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51. *Oncogene* **28**, 2087-2099
- 34 Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K. M., Vandembunder, B. and Fafeur, V. (1999) The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell* **10**, 551-565
- 35 Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. (1999) Caspases: preparation and characterization. *Methods* **17**, 313-319
- 36 Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D. and Wong, W. W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**, 9677-9682
- 37 Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-17911
- 38 Foveau, B., Leroy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V. and Tulasne, D. (2007) Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* **14**, 752-764
- 39 Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F. C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P. and Fafeur, V. (2004) Proapoptotic function of

- the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* **24**, 10328-10339
- 40 Westermarck, J., Seth, A. and Kahari, V. M. (1997) Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* **14**, 2651-2660
- 41 Baillat, D., Leprivier, G., Regnier, D., Vintonenko, N., Begue, A., Stehelin, D. and Aumercier, M. (2006) Stromelysin-1 expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter. *Oncogene* **25**, 5764-5776
- 42 Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T. and Ito, Y. (1999) Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* **18**, 1609-1620
- 43 Cowley, D. O. and Graves, B. J. (2000) Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* **14**, 366-376
- 44 Rabault, B. and Ghysdael, J. (1994) Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem* **269**, 28143-28151
- 45 Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. and Matrisian, L. M. (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18**, 1135-1149
- 46 Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J. and Sato, H. (2001) Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* **61**, 7985-7991
- 47 Mattot, V., Vercamer, C., Soncin, F., Calmels, T., Huguet, C., Fafeur, V. and Vandebunder, B. (2000) Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene* **19**, 762-772
- 48 Pourtier-Manzanedo, A., Vercamer, C., Van Belle, E., Mattot, V., Mouquet, F. and Vandebunder, B. (2003) Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene* **22**, 1795-1806

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Caspase cleavage of Ets-1

(A) Cleavage of Ets-1 in Jurkat cells undergoing apoptosis. Jurkat cells were treated with staurosporin (1 μ M) for 4 h (lanes 2 and 4) or left untreated (lanes 1 and 3), in the presence (lanes 3 and 4) or in the absence (lanes 1 and 2) of zVAD-FMK (zVAD; 20 μ M). NS, non-specific band. **(B)** *In vitro* cleavage of Ets-1 by recombinant active caspase-3. Total cell lysates were incubated in the absence (lane 1) or in the presence (lane 2) of recombinant active caspase-3 (0.17 μ M) for 4 h at 37°C. **(A and B)** Cell lysates (30 μ g total proteins) were analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) directed against the DBD located in the C-terminal region. The membrane was stripped and reprobed sequentially first with an anti-Ets-1 (N-276) antibody directed against its pointed domain located in the N-terminal region, then with an anti-cleaved caspase-3 antibody and, finally, with an anti-Erk-2 antibody as a loading control. Arrows indicate cleavage fragments. Molecular mass, indicated on the left of each panel, is given in kDa.

Figure 2 Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is cleaved by caspase-3 *in vitro*

(A) *In vitro* cleavage of Ets-1 isoforms by recombinant active caspase-3. pcDNA3 expression vectors without insert (control; lanes 1 and 2), encoding Ets-1 p51 (lanes 3 and 4) or Ets-1 p42 (lanes 5 and 6) were transfected in HEK-293 cells. After 48 h of transfection, total cell lysates were incubated in the absence (lanes 1, 3 and 5) or in the presence (lanes 2, 4 and 6) of recombinant active caspase-3 (0.17 μ M) for 4 h at 37°C. **(B)** *In vitro* cleavage of Ets-1 isoforms by a set of recombinant active caspases. pcDNA3 expression vectors without insert (lane 1), encoding Ets-1 p51 (lanes 2-7) or Ets-1 p42 (lanes 8-13) were transfected in HEK-293 cells and incubated with recombinant active caspase-3 (lanes 3 and 9), -6 (lanes 4 and 10), -7 (lanes 5 and 11), -8 (lanes 6 and 12) or -9 (lanes 7 and 13). **(A and B)** Cell lysates (30 μ g total proteins) were analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) antibody directed against its C-terminal region and an anti-Ets-1 (N-276) antibody directed against its N-terminal region. Arrows indicate cleavage fragments. Molecular mass, indicated on the left of each panel, is given in kDa.

Figure 3 Ets-1 p51, but not Ets-1 p42, is cleaved in HEK-293 and Jurkat cells undergoing apoptosis

(A) Cleavage of transfected Ets-1 isoforms in HEK-293 cells undergoing apoptosis. pcDNA3 expression vectors without insert (control; lanes 1-4), encoding Ets-1 p51 (lanes 5-8) or Ets-1 p42 (lanes 9-12) were transfected in HEK-293 cells. After 24 h, cells, previously incubated with (lanes 3-4, 7-8 and 11-12) or without (lanes 1-2, 5-6 and 9-10) zVAD-FMK (zVAD; 20 μ M), were treated with staurosporin (10 μ M) (lanes 2, 4, 6, 8, 10 and 12) or left untreated (lanes 1, 3, 5, 7, 9 and 11) for 8 h. Cell lysates (30 μ g total proteins) were then analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) antibody and an anti-Erk-2 antibody as a loading control. **(B)** Cleavage of Ets-1 isoforms in Jurkat cells undergoing apoptosis. Jurkat cells, previously incubated with (lane 5) or without (lanes 1-4) zVAD-FMK (zVAD; 20 μ M), were treated with staurosporin (1 μ M) for the indicated time. Cells were then lysed and analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) antibody. The membrane was stripped and reprobed sequentially using an anti-cleaved caspase-3 antibody and then an anti-Erk-2 antibody as a loading control. NS, non-specific band. **(C)** Luminescence from the Western blot was recorded with a CCD camera and the expression levels of the Ets-1 isoforms and the Cp17 fragment were quantified. The percentage of expression was calculated using the signal intensity for Ets-1 p51 at $t = 0$ h as the reference ($n=3$; error bars indicate S.D.).

Figure 4 Identification of the caspase cleavage sites in Ets-1 p51 processing

(A, a) Schematic representation of Ets-1 p51 and Ets-1 p42 proteins, showing the putative caspase cleavage sites (DSCD²⁶², DSFD²⁸⁷SED²⁹⁰ and DRAD³¹³) in the exon VII-encoded region of Ets-1 p51. Pointed domain, transactivation domain (TAD), inhibitory domains (I) and DNA binding domain (DBD) are indicated. The caspase cleavage sites are boxed. **(A, b)** Schematic representation of Cp20, Cp17 and Cp14 fragments generated by cleavage of Ets-1 p51 at the putative caspase cleavage sites. **(A, c)** Sequences of wild-type and mutant (D1N, D3N and D4N) Ets-1 p51, in which Asp (D) residues were mutated to Asn (N). **(B)** Cleavage of wild-type and mutant Ets-1 p51 by recombinant active caspase-3. pcDNA3 expression vectors encoding wild-type (WT, lanes 1-2) or mutant (D1N, lanes 3-4; D3N, lanes 5-6; D4N, lanes 7-8) Ets-1 p51 were transfected in HEK-293 cells. After 48 h of transfection, cell lysates (30 μ g total proteins) were incubated in the absence (lanes 1, 3, 5 and 7) or in the presence (lanes 2, 4, 6 and 8) of recombinant active caspase-3 (0.17 μ M) for 4 h at 37°C. **(C)** Cleavage of wild-type and mutant Ets-1 p51 in MDCK cells undergoing apoptosis. pcDNA3 expression vectors encoding wild-type (WT, lanes 1-2) or mutant (D1N, lanes 3-4; D3N, lanes 5-6; D4N, lanes 7-8) Ets-1 p51 were transfected in MDCK cells. After 48 h of transfection, cells were treated with anisomycin (10 μ M) (lanes 2, 4, 6 and 8) or left untreated (lanes 1, 3, 5, 7) for 8

h. **(B and C)** Cell lysates (30 µg total proteins) were analysed by Western blot using an anti-Ets-1 (C-20) antibody. Longer exposure of the same Ets-1 Western blot is shown in the lower panel.

Figure 5 Cp17 binds to the Ets-binding sites (EBS) palindrome of the *stromelysin-1* promoter and competes with Ets-1 p51 for binding

(A) Structure of the Cp17 fragment compared to the full-length Ets-1 p51. Pointed domain, transactivation domain (TAD), inhibitory domains (I) and DNA binding domain (DBD) are indicated. **(B)** Lysates (30 µg) from HEK-293 cells transiently transfected with the empty vector (1 µg, lanes 1-4), the Cp17 expression vector (1 µg; lanes 9-12) or the Ets-1 p51 recombinant protein (1 µg; lanes 5-8) were incubated with wild-type (WT, lanes 1, 3-5, 7-10, 11 and 12) or EBS mutant (lanes 2, 6 and 10) ³²P-labelled DNA probes (0.5 ng) in the absence (lanes 1-2, 5-6 and 9-10) or in presence of unlabeled competitors (WT 800X, lanes 3, 7 and 11 or EBS mutant 800X, lanes 4, 8 and 12). DNA/protein complexes were separated by electrophoresis in a 5% non-denaturing polyacrylamide gel. Arrow 2 indicates potential binary Cp17/DNA complex. Arrows 3 and 3' indicate potential ternary Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p51 and Cp17/DNA/Cp17 complexes, respectively. **(C)** Lysates (30 µg) from HEK-293 cells transiently transfected with the empty vector (1 µg; lanes 1) or increasing concentrations of the Cp17 expression vector (0.45-1 µg; lanes 2-5 and 7-10) in the absence (lanes 1-5 and 10) or in the presence of Ets-1 p51 recombinant protein (0.5 µg; lanes 6-10) were incubated with the WT ³²P-labelled DNA probe (0.5 ng). DNA/protein complexes were separated by electrophoresis in a 5% non-denaturing polyacrylamide gel. Arrows 3, 3' and 2, as above; arrow i indicates the putative Ets-1 p51/DNA/Cp17 intermediate ternary complex.

Figure 6 Cp17, but not Np36, acts as a dominant negative for transactivation of the *stromelysin-1* and *collagenase-1* promoters mediated by Ets-1 p51

(A) Effect of Cp17 on basal and Ets-1 p51-induced *stromelysin-1* promoter activity. pGL3 luciferase reporter constructs driven by the *stromelysin-1* promoter (200 ng; WT, left panel; EBS mutant, middle panel) were transfected into HEK-293 cells in the absence (-) or in the presence (+) of Ets-1 p51 expression vector (100 ng; lanes 5-8) and with increasing amounts of the Cp17 expression vector (0-200 ng; lanes 2-4 and 6-8). **(B)** Effect of Cp17 on Ets-1 p51-induced *collagenase-1* promoter activity. pGL2 luciferase reporter constructs driven by the *collagenase-1* promoter (100 ng; WT, left panel; TORU mutant, middle panel) were transfected into HEK-293 cells in the absence (-) or in the presence (+) of Ets-1 p51 (100 ng;

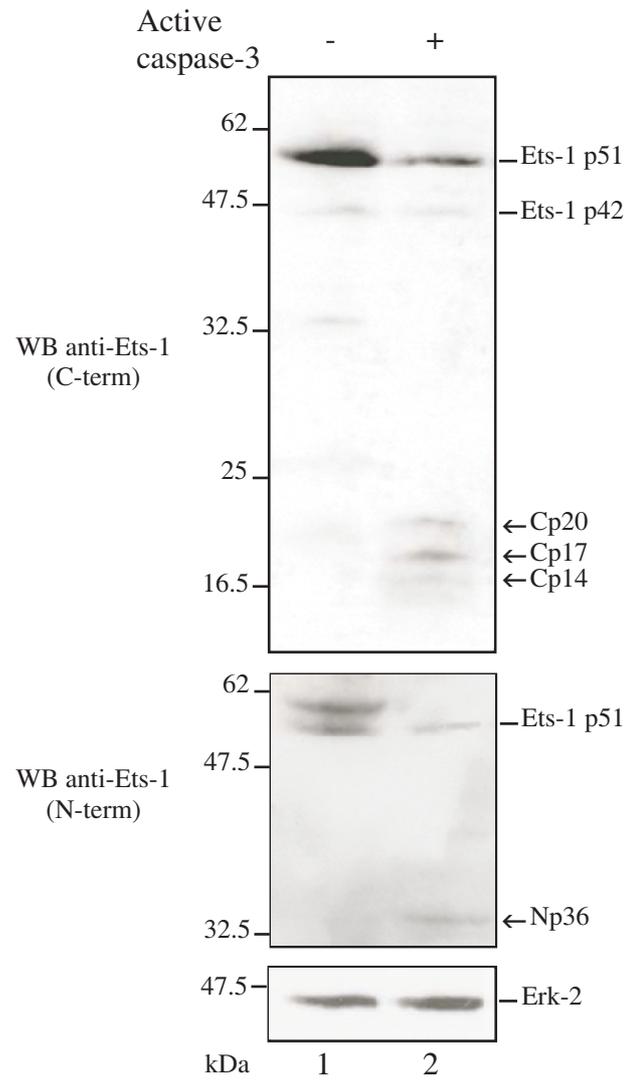
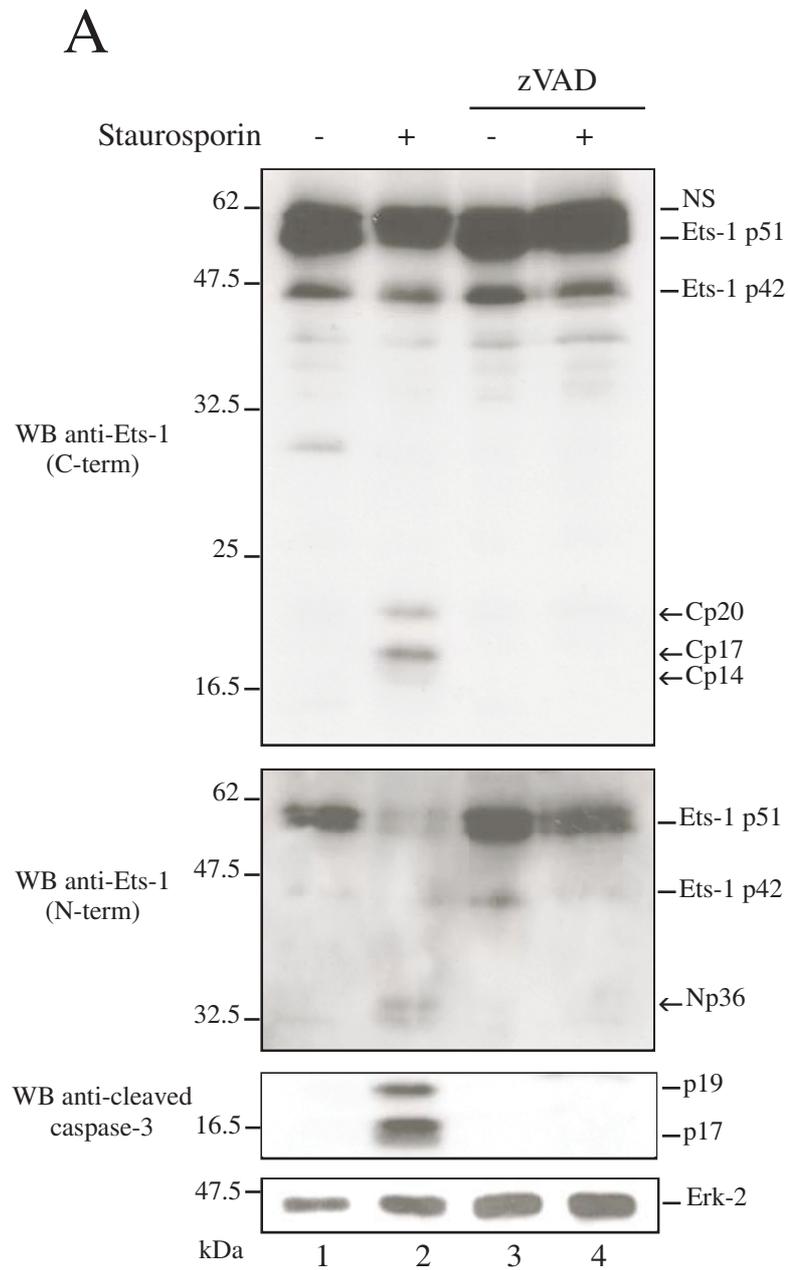
lanes 2 and 4-7), c-Jun (100 ng; lanes 3-7), c-Fos (100 ng; lanes 3-7) and increasing amounts of the Cp17 expression vector (0-100 ng; lanes 5-7). (C) Effect of Np36 on Ets-1 p51-induced *stromelysin-1* and *collagenase-1* promoter activities. WT *stromelysin-1* or *collagenase-1* promoter reporter vector (*stromelysin-1*, 200 ng, left panel; *collagenase-1*, 100 ng, middle panel) were transfected into HEK-293 cells in the absence (-) or in the presence (+) of the Ets-1 p51 expression vector (100 ng; *stromelysin-1*, lanes 2-5; *collagenase-1*, lanes 2 and 4-7), c-Jun (100 ng; *collagenase-1*, lanes 3-7), c-Fos (100 ng; *collagenase-1*, lanes 3-7) and with increasing amounts of the Np36 expression vector (*stromelysin-1*, 0-200 ng, lanes 3-5; *collagenase-1*, 0-100 ng, lanes 5-7). (A, B and C) Luciferase activity, measured 48 h after transfection, was normalised to *renilla* activity using a pRLnull vector (1.25 ng) and is expressed as the percentage of WT construct activity induced by Ets-1 p51 (*stromelysin-1*) or by the synergistic effect of Ets-1 p51 and c-Fos/c-Jun (*collagenase-1*). Cell lysates were analysed by Western blot using indicated antibodies to assess protein expression. Results are the average of two experiments performed in triplicate.

Figure 7 Cp17 decreases the Ets-1 p51 target genes expression

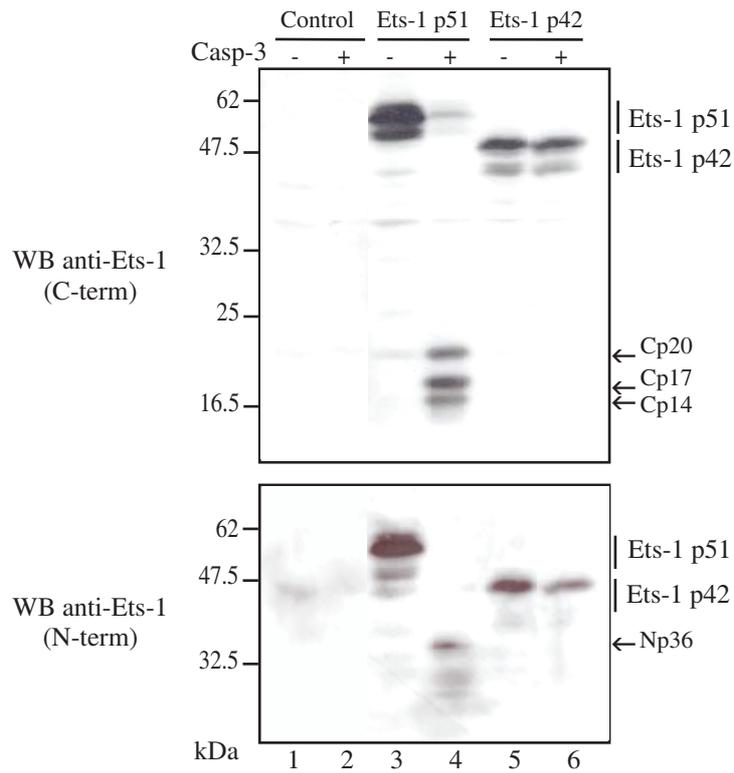
Reverse transcription (RT)-PCR analysis of Ets-1 p51 target genes. Empty vector (1 µg; lane 2), human Ets-1 p51 expression vector (500 ng; lane 3) or human Ets-1 p51 (500 ng) and Cp17 (500 ng) expression vectors (lane 4) were transfected into HIG-82 cells. After 48 h, RNAs of cells were retrotranscribed and cDNAs were amplified by PCR using *uPA* and *gelatinase B* primers (see Experimental). Amplified PCR products were resolved on an agarose gel stained with ethidium bromide. Amplification of human *ets-1* was used to assess expression of the transfected Ets-1 p51 expression vector; amplification of *gapdh* with specific primers was used as a loading control and amplification without template as a negative control (NC, lane 1).

Figure 1

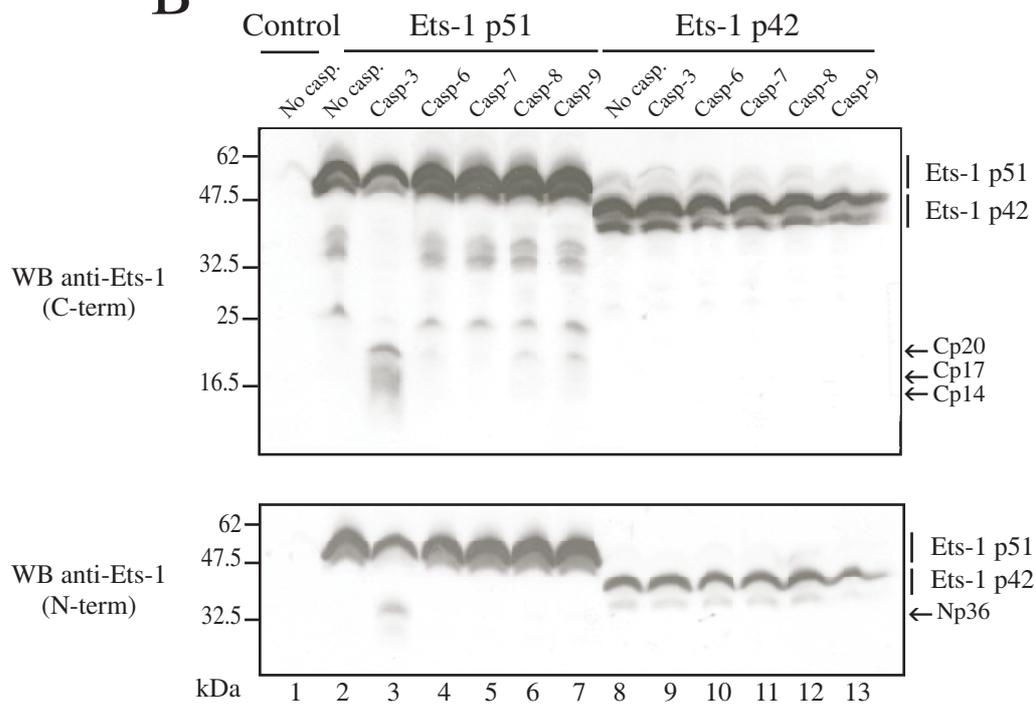
B

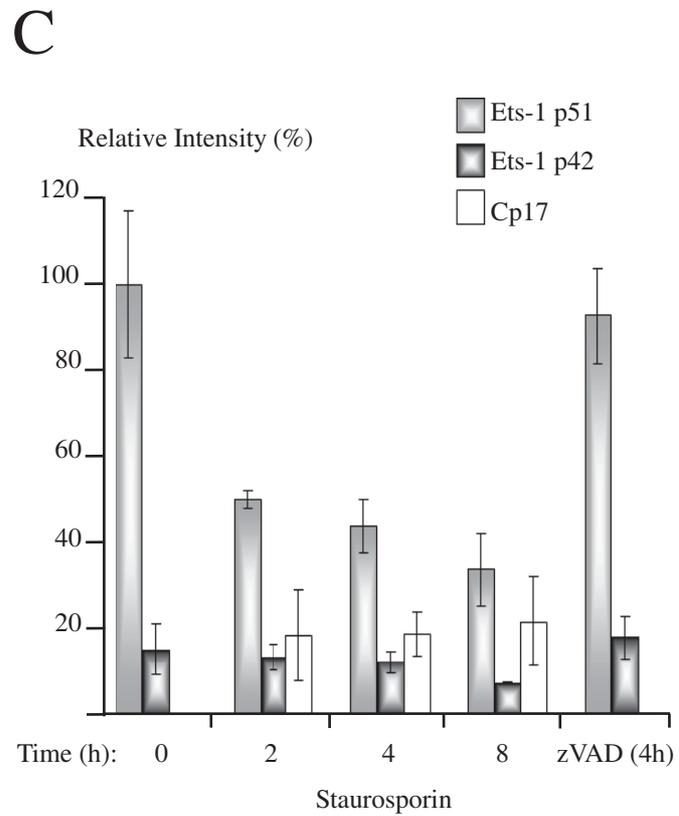
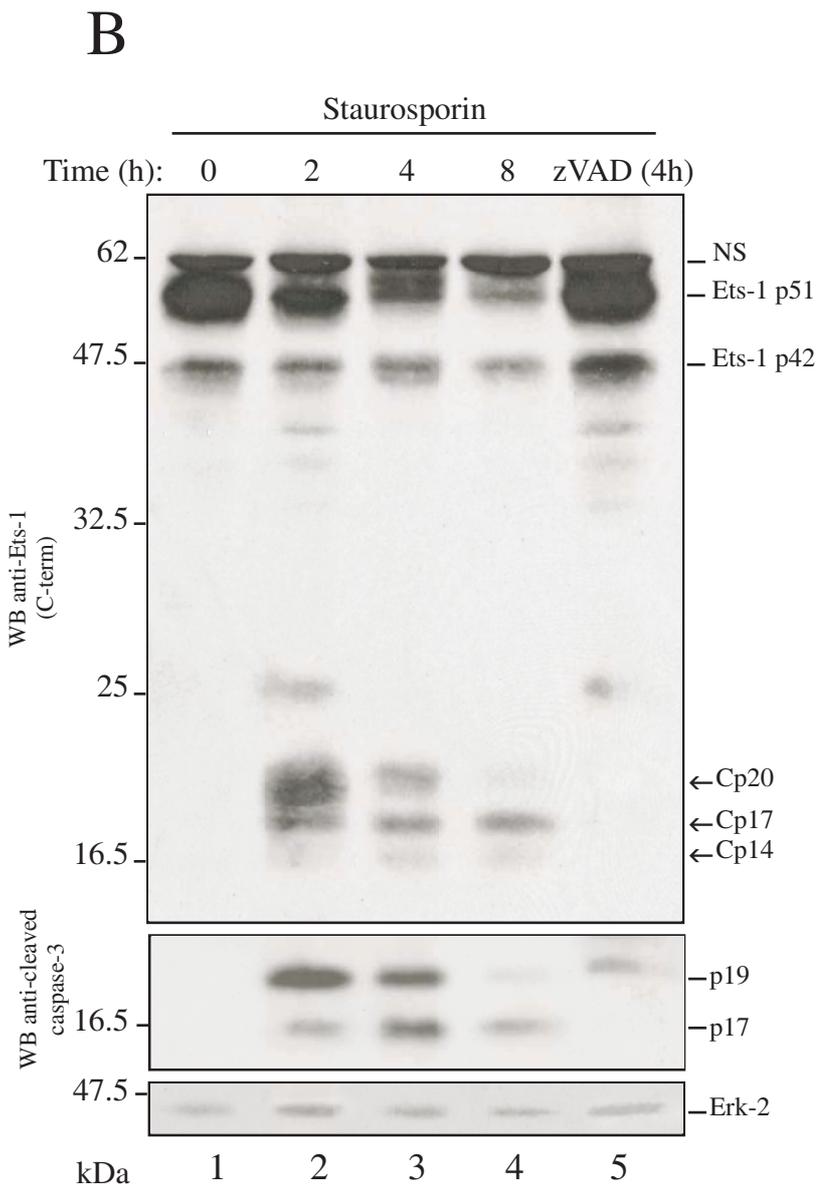
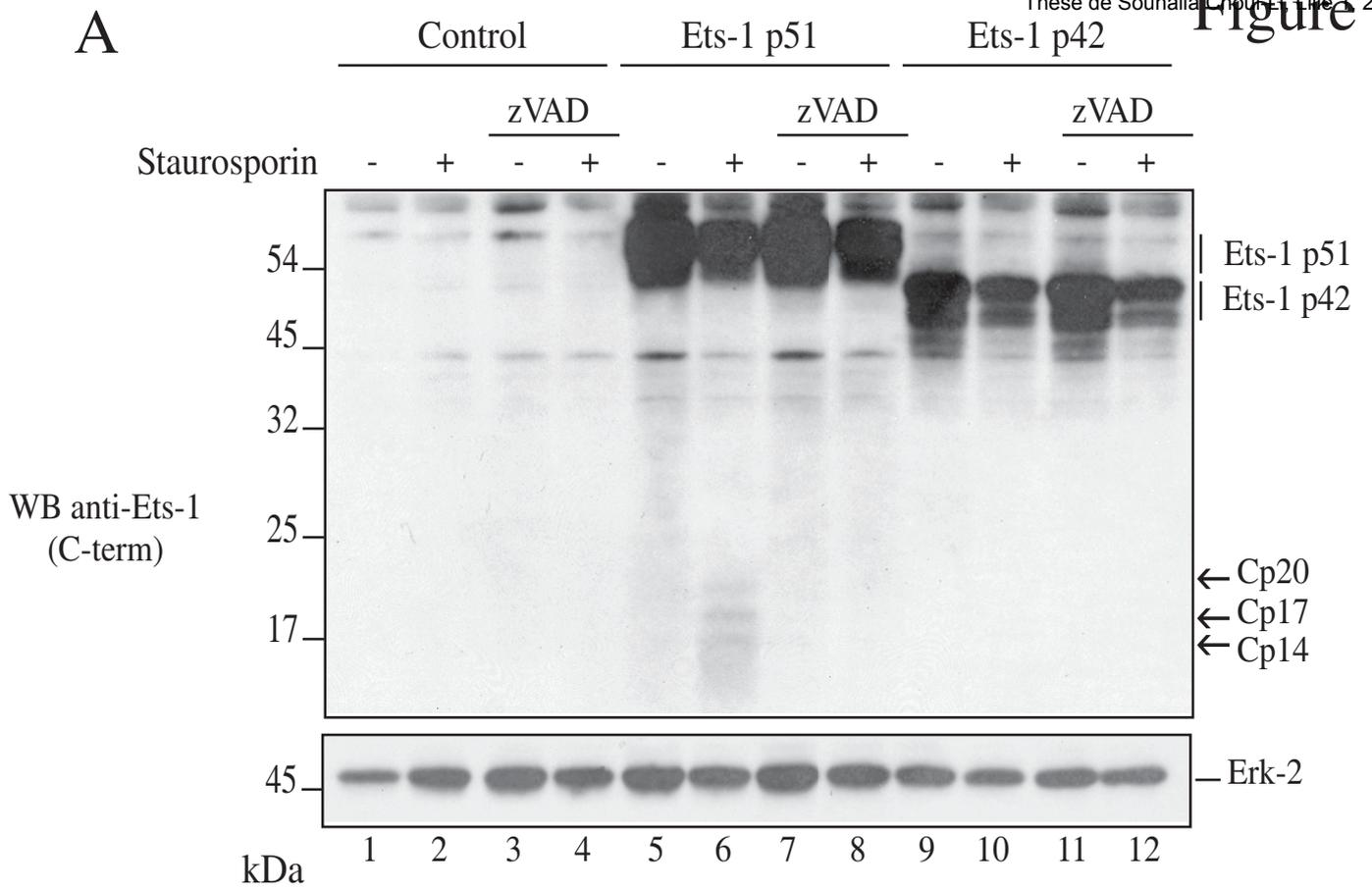


A

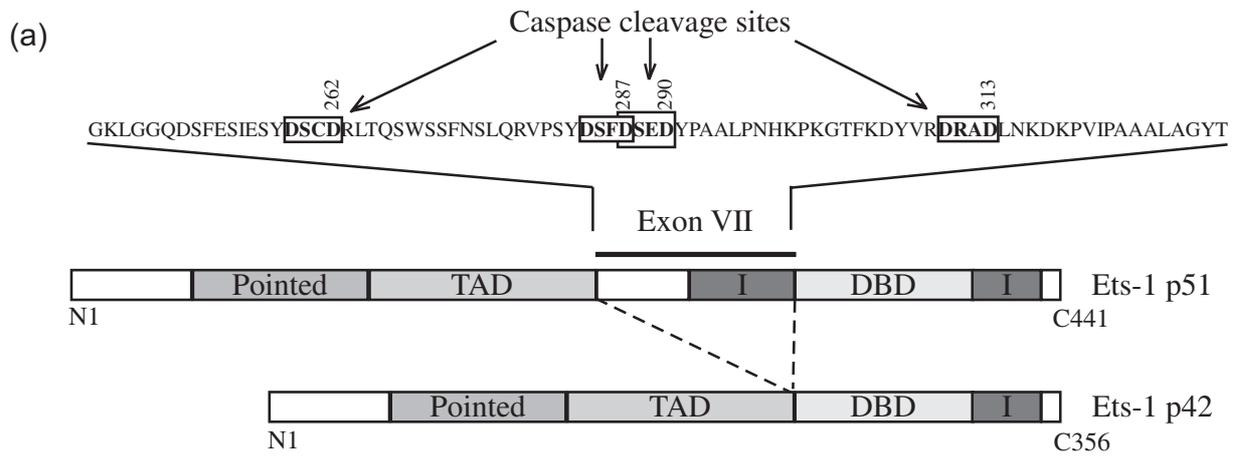


B

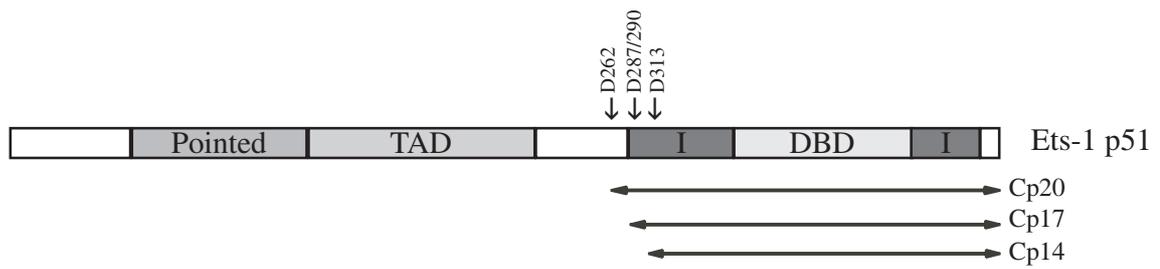




A



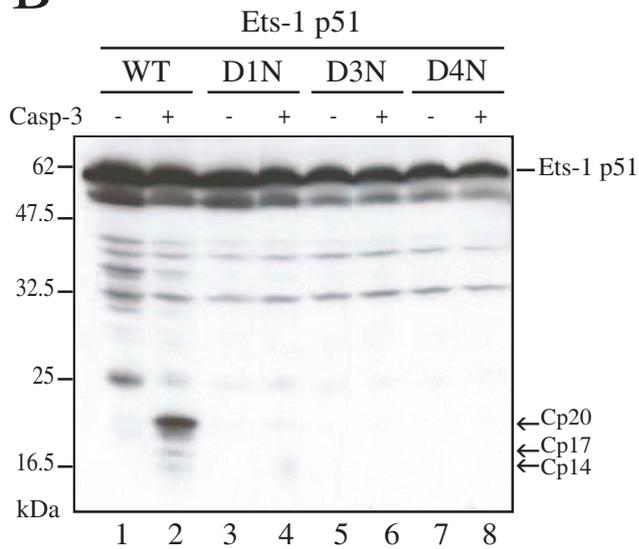
(b)



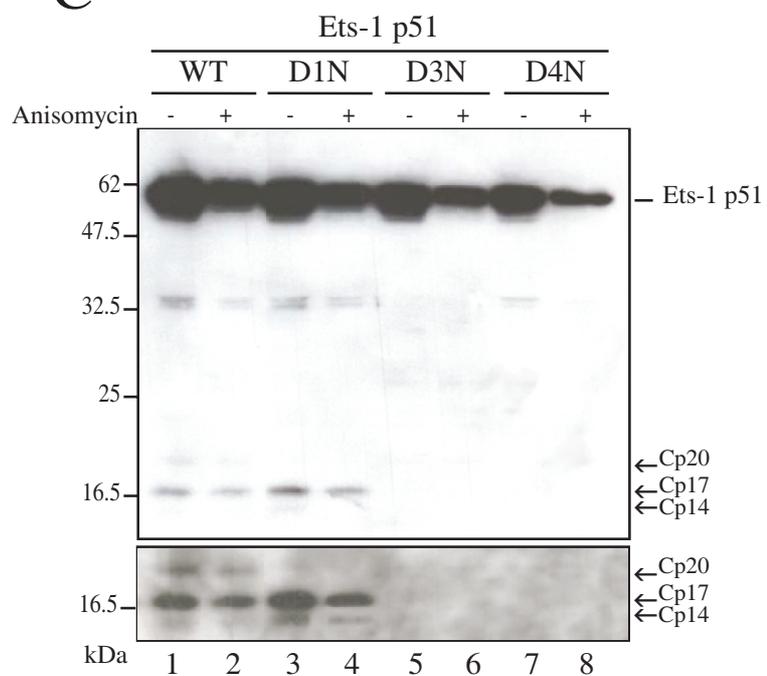
(c)

	262		287	290		313	
	SIESYDSCDRLTQS	---	RVPSYDSFDS	EDYPAAL	---	KDYVRDRADLNKDK	Wild-type
-----	N-----	---	-----	-----	---	-----	D1N (D262N)
-----	N-----	---	N--N--	---	---	-----	D3N (D262/287/290N)
-----	N-----	---	N--N--	---	---	N-----	D4N (D262/287/290/313N)

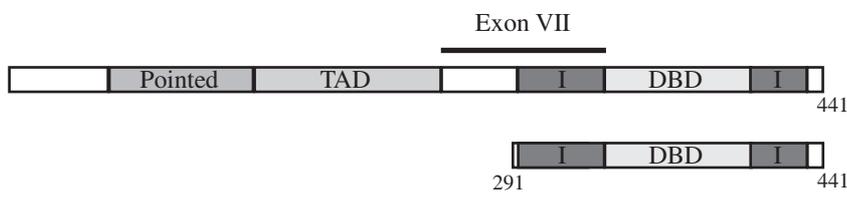
B



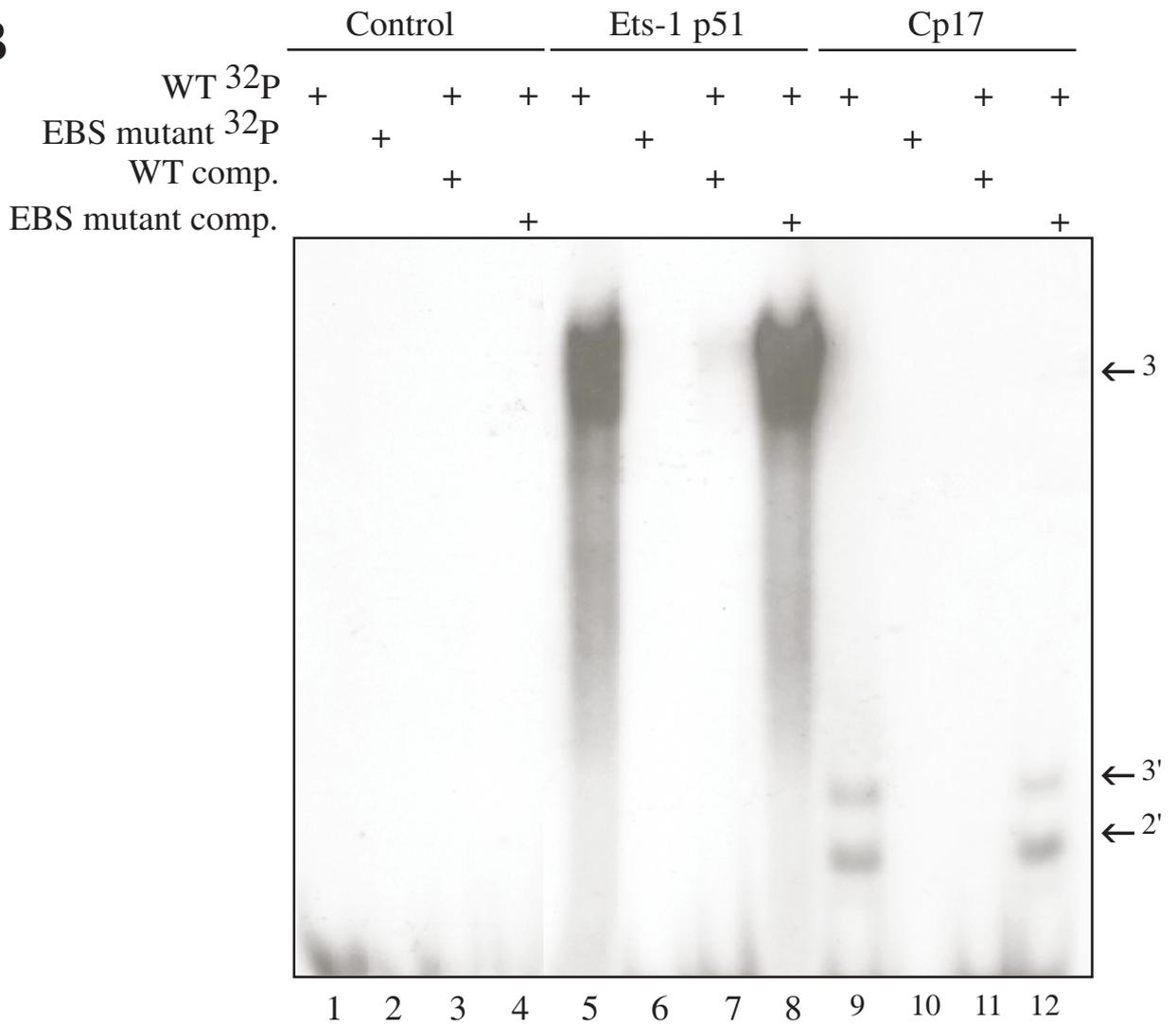
C



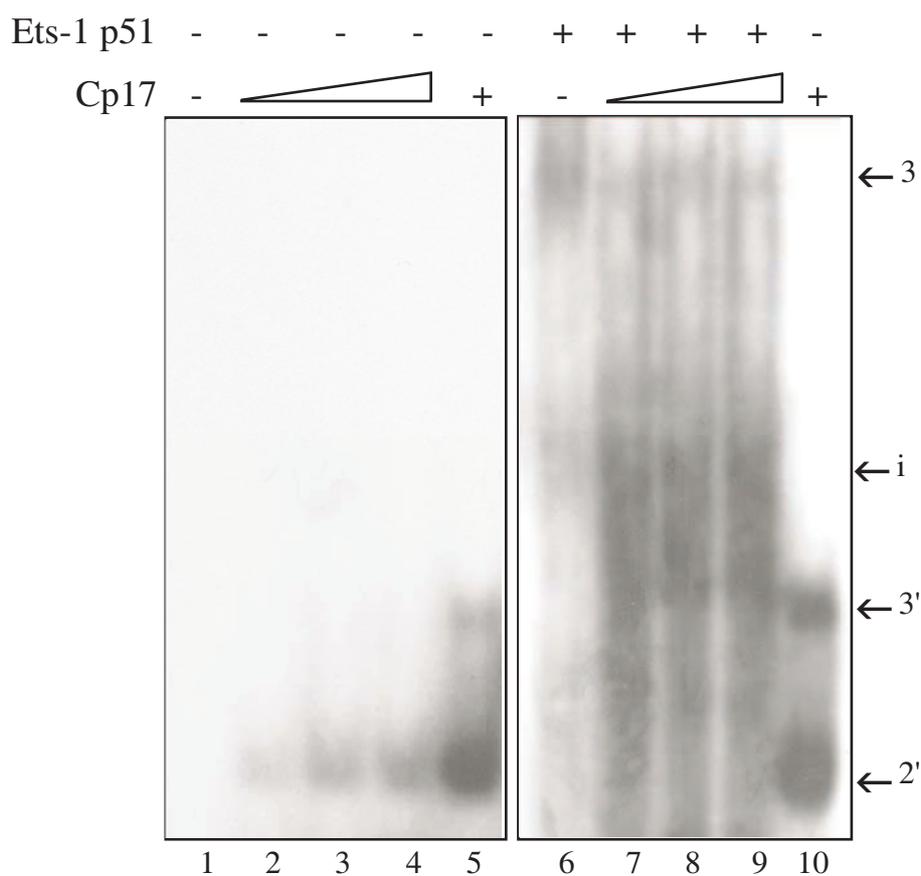
A



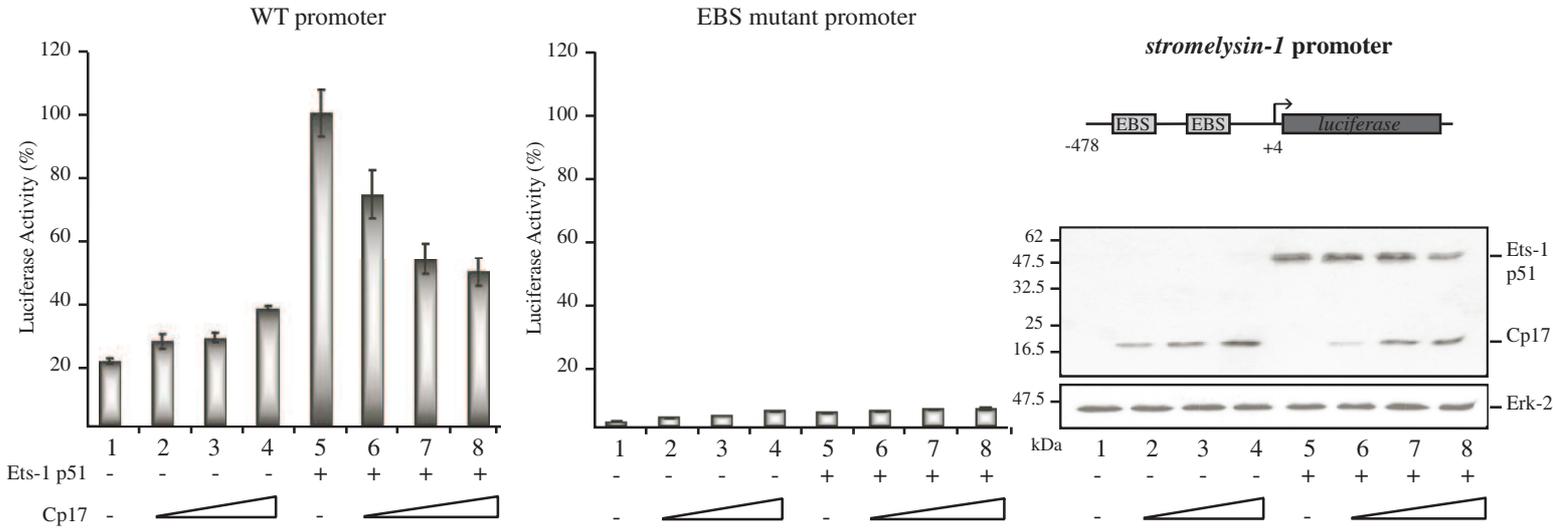
B



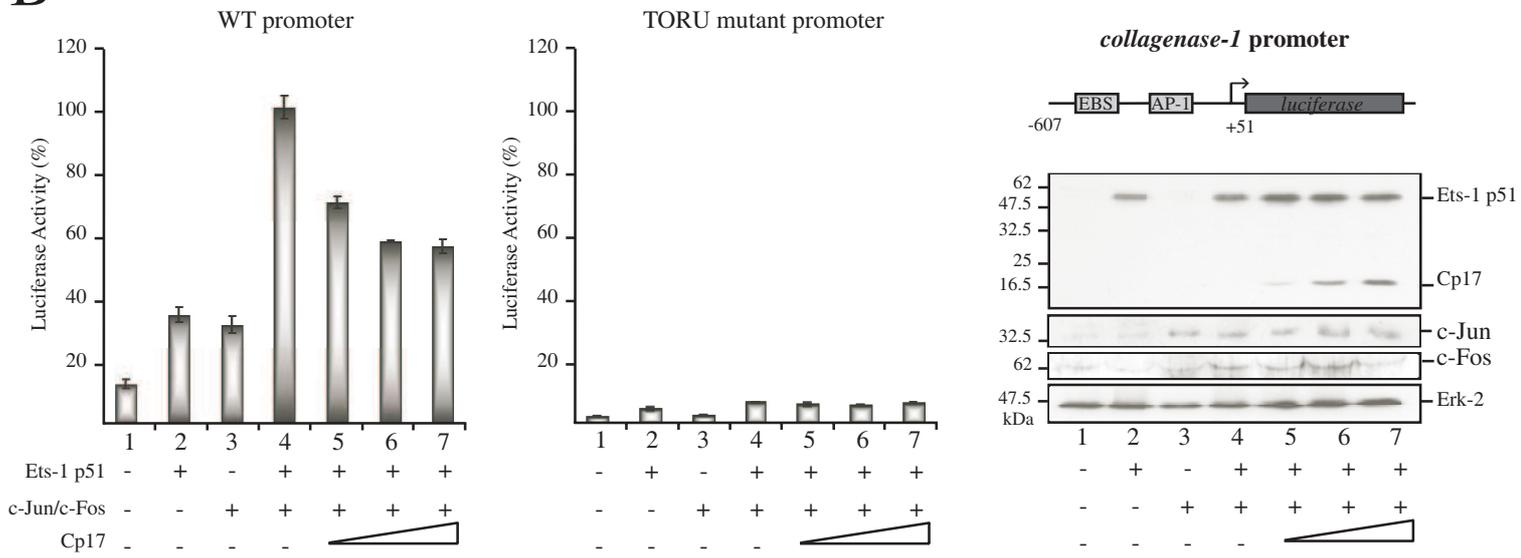
C



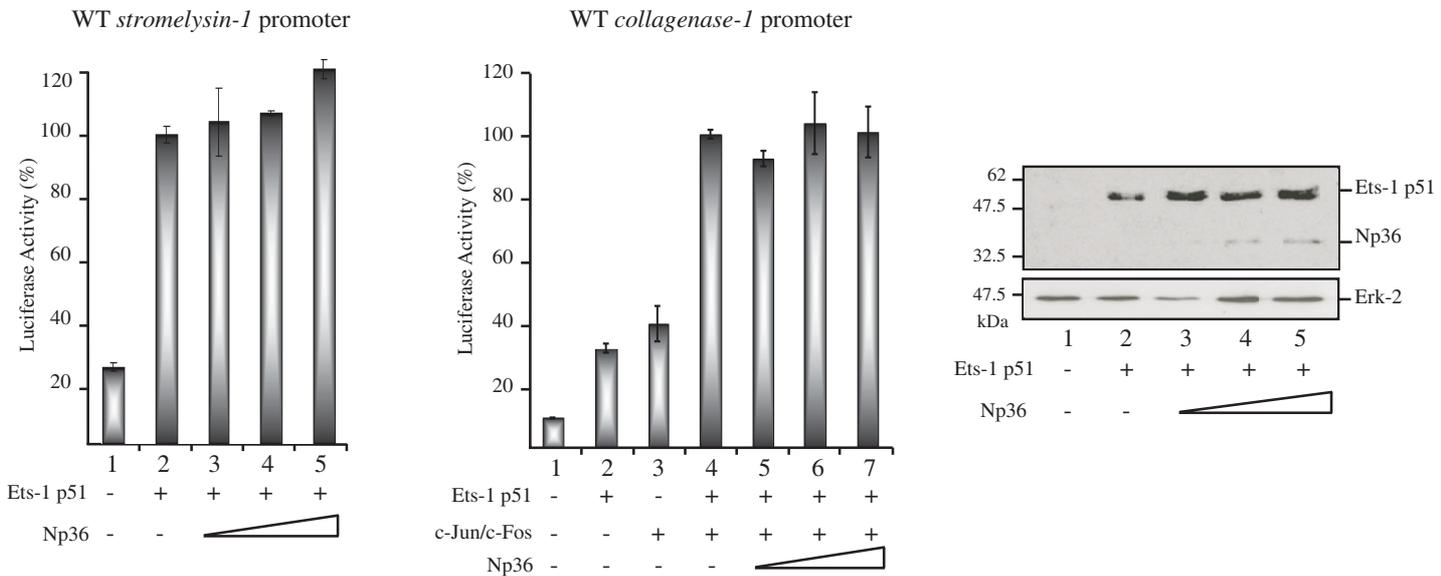
A

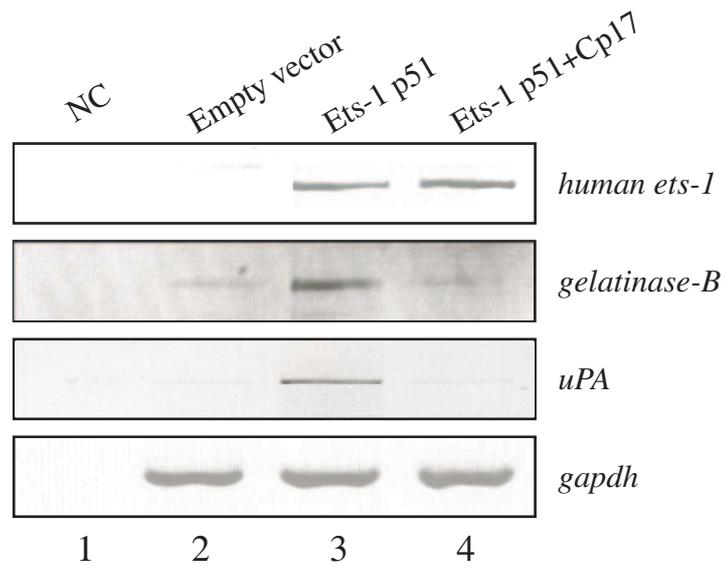


B



C





III/ Résultats complémentaires

III-1/ Effet de Cp17 sur la survie cellulaire

L'étude moléculaire de Cp17 présentée dans l'article N°3 illustre très clairement son rôle de dominant négatif envers Ets-1 p51 au niveau transcriptionnel. Mais qu'en est-il de son effet sur la survie cellulaire ? Pour le déterminer, nous avons réalisé un test de toxicité dont le principe consiste à étudier l'effet d'une molécule sur la viabilité des cellules. Pour cela, les cellules HEK-293 (« human embrionic kidney-293 ») sont transfectées par le vecteur pcDNA3 vide comme contrôle négatif ou par le vecteur d'expression de Cp17 ou de Np36. Les cellules sont ensuite sélectionnées pendant dix jours, grâce à la résistance au G418 (antibiotique qui tue les cellules en bloquant la synthèse protéique), colorées au cristal violet puis comptées. Le résultat montre que les cellules non transfectées et plus de 60% de cellules exprimant Cp17 meurent, tandis que les cellules exprimant Np36 survivent (Figure 40). Ainsi, le fragment de clivage Cp17 induit la mort cellulaire au contraire du fragment Np36 qui, quant à lui n'a aucun effet sur la survie des cellules.

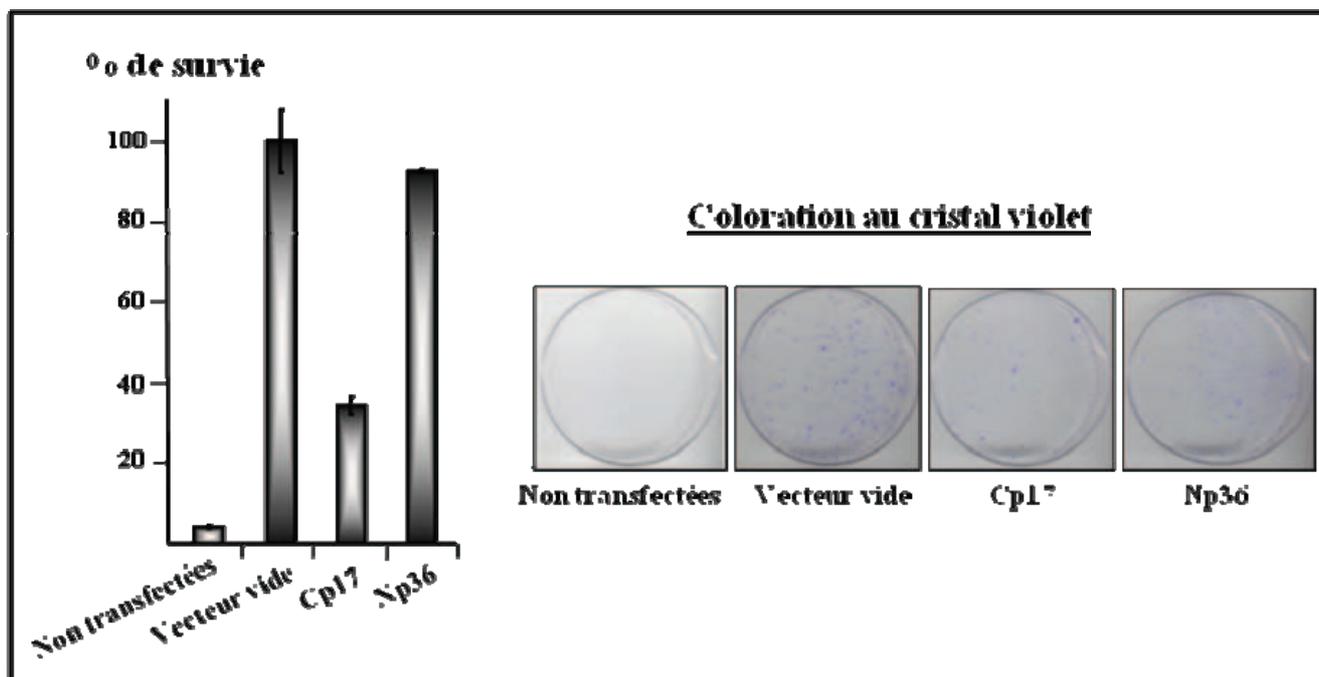


Figure 38 : Le fragment de clivage Cp17 induit la mort cellulaire.

Les cellules HEK-293 sont transfectées ou non par le vecteur pcDNA3 vide ou par le vecteur d'expression de Cp17 ou de Np36. Après deux jours, les cellules sont sélectionnées pendant dix jours avec le G418, puis comptées. Les résultats sont représentés en pourcentage de survie des cellules en utilisant la transfection avec le vecteur vide comme référence. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne d'expériences réalisées en triplicata au cours de trois tests indépendants. Les cellules d'une boîte de culture de chaque condition sont visualisées par coloration au cristal violet.

III-2/ Etude de clivage de l'isoforme Ets-1 p27

Dans la publication N°3, nous avons montré qu'Ets-1 p51, mais pas l'isoforme Ets-1 p42 dépourvu de la région codée par l'exon VII, est clivée par la caspase-3. Mais qu'en est-il de l'isoforme Ets-1 p27 ? Pour déterminer cela, nous avons réalisé des expériences de clivage *in vitro*.

III-2-1/ Mise en évidence du clivage d'Ets-1 p27 par la caspase-3

Ets-1 p27, l'isoforme issue d'un épissage alternatif, est dépourvue de la région codée par les exons III-VI, mais possède la région codée par l'exon VII. Etant donné que les sites de clivage par les caspases sont localisés dans cette région, nous supposons qu'Ets-1 p27 peut être un substrat de la caspase-3 comme Ets-1 p51. Pour vérifier cela, les extraits de cellules HEK-293 transfectées par le vecteur pcDNA3 vide ou par le vecteur d'expression d'Ets-1 p27 sont incubés avec la caspase-3 active recombinante. Les résultats de Western-blot, réalisé avec un anticorps anti-Ets-1 (C-20) reconnaissant la région C-terminale d'Ets-1, montrent que la quantité de protéine Ets-1 p27 diminue drastiquement après incubation avec la caspase-3 active (Figure 41, pistes 3 et 4). Ceci est accompagné par la génération de trois fragments C-terminaux Cp20, Cp17 et Cp14 identiques à ceux obtenus dans le cas du clivage d'Ets-1 p51. L'hybridation du même blot avec un anticorps anti-Ets-1 (N-276) reconnaissant la région N-terminale ne nous a pas permis de détecter Ets-1 p27 ni ses fragments, étant donné qu'Ets-1 p27 est dépourvue de la région N-terminale contenant le peptide de reconnaissance de l'anticorps. Ces résultats montrent que le variant d'épissage Ets-1 p27 est un substrat de la caspase-3.

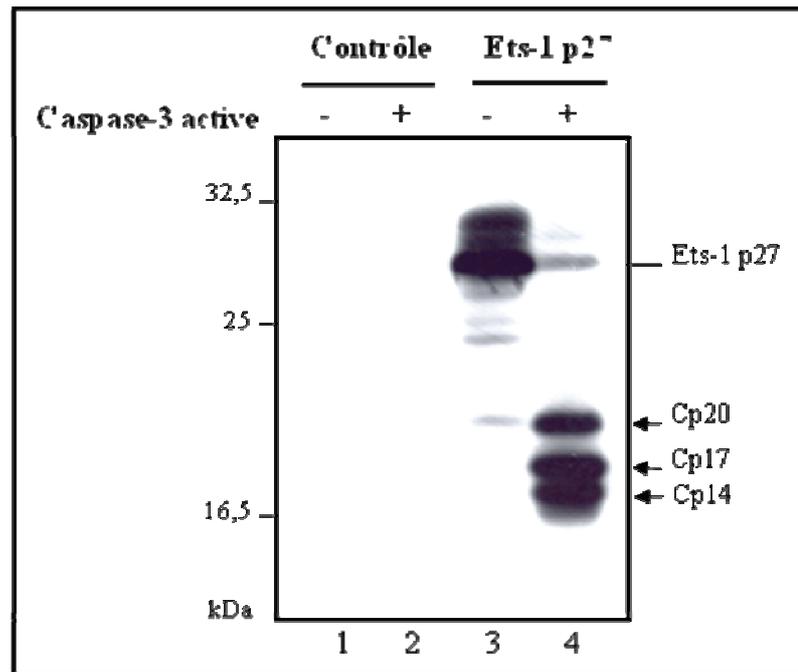


Figure 39 : Ets-1 p27 est clivée par la caspase-3 *in vitro*.

Les cellules HEK-293 sont transfectées par le vecteur pcDNA3 vide comme contrôle (pistes 1 et 2) ou le vecteur d'expression d'Ets-1 p27 (pistes 3 et 4). Après 48 heures, ces cellules sont lysées et les lysats cellulaires sont incubés en absence (pistes 1 et 3) ou en présence (pistes 2 et 4) de la caspase-3 active recombinante. Les lysats cellulaires (30 µg) sont ensuite analysés par Western-blot avec un anticorps anti-Ets-1 (C-20).

III-2-2/ Identification des sites de clivage par les caspases

Etant donné que le clivage d'Ets-1 p27 produit des fragments identiques à ceux générés par le clivage d'Ets-1 p51, il existe une très forte probabilité que les sites de clivage par les caspases soient également les mêmes, à savoir DSCD⁴⁶, le site double DSFD⁷¹SED⁷⁴ et DRAD⁹⁷ (Figure 42).

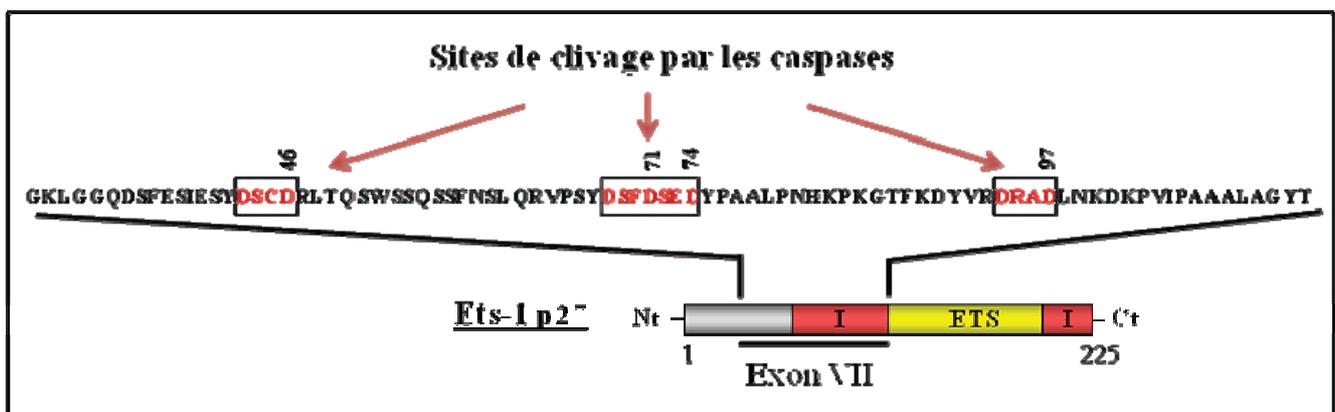


Figure 40 : Représentation schématique de la protéine Ets-1 p27 montrant les sites putatifs de clivage par les caspases.

Les trois sites de clivage présents dans la région codée par l'exon VII sont représentés en rouge. Le numéro de l'aspartate en position P4 est indiqué. Le domaine de liaison à l'ADN (ETS) est représenté en jaune et les domaines inhibiteurs (I) en rouge.

Pour déterminer si Ets-1 p27 est clivée au niveau de ces sites, nous avons généré trois mutants ponctuels : (i) D1N, correspond à la mutation de l'aspartate D⁴⁶ du premier site en une asparagine (N), (ii) D3N, correspond à la substitution de D⁴⁶ du premier site et D⁷¹/D⁷⁴ du site double par une asparagine et (iii) D4N, correspond à la mutation de tous les aspartates en position P4.

Après transfection par Ets-1 p27 Wild-type (WT) ou ses différents mutants, les cellules épithéliales MDCK (« Madin-Darby canine kidney ») sont traitées ou non avec l'anisomycine, un inducteur de l'apoptose. Les lysats cellulaires sont ensuite analysés par Western-blot, en utilisant l'anticorps anti-Ets-1 (C-20). Comme prévu, Ets-1 p27 WT génère les trois fragments C-terminaux, Cp17 étant le fragment majoritaire (Figure 43, piste 2). Le mutant D1N abolit la génération du fragment Cp20, démontrant que ce fragment est formé par clivage au niveau du premier site DSCD⁴⁶ (Figure 43, piste 4). Le mutant D3N, comme D4N, inhibe la génération de tous les fragments (Figure 43, piste 6 et 7), démontrant que le clivage au niveau du site DSFD⁷¹SED⁷⁴ est nécessaire pour la génération des fragments Cp17 et Cp14. Il est à noter que la génération des fragments par les cellules non traitées est très probablement causée par l'induction de stress des cellules MDCK dû aux conditions de transfection.

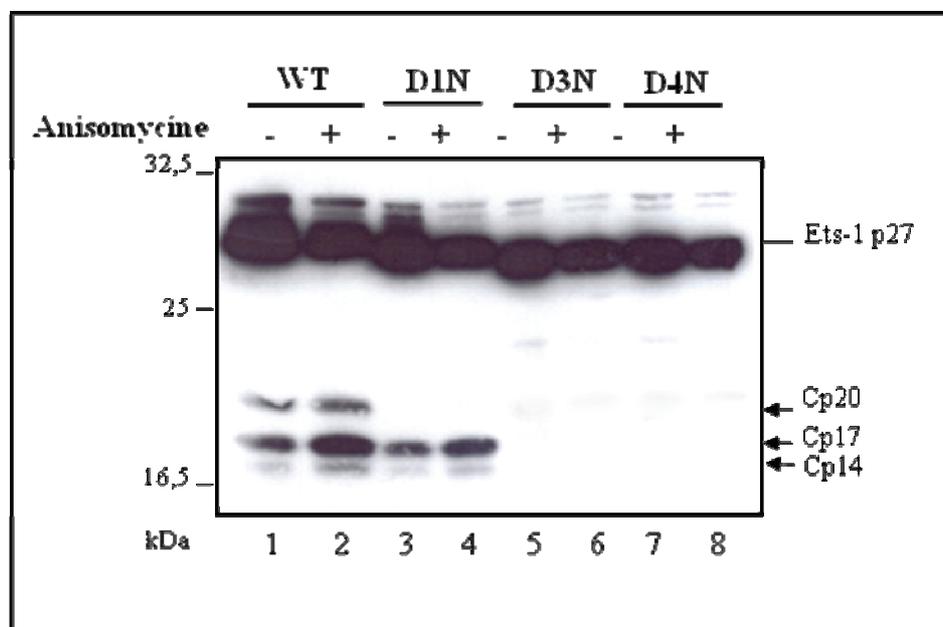


Figure 41 : Ets-1 p27 est clivée au niveau de trois sites localisés dans la région codée par l'exon VII.

Les cellules MDCK sont transfectées par le vecteur d'expression d'Ets-1 p27 (pistes 1 et 2) ou le vecteur d'expression du mutant d'Ets-1 p27 D1N (pistes 3 et 4), D3N (pistes 5 et 6) ou D4N (pistes 7 et 8). Après 48 heures, les cellules sont traitées (pistes 2, 4, 6 et 8) ou non (pistes 1, 3, 5 et 7) avec l'anisomycine (10 μ M) pendant 8 heures. Les cellules sont ensuite lysées et les lysats cellulaires (30 μ g) sont analysés par Western-blot avec un anticorps anti-Ets-1 (C-20).

L'ensemble de ces résultats montre qu'Ets-1 p27 est clivée au niveau des trois sites DSCD⁴⁶, DSFD⁷¹SED⁷⁴ et DRAD⁹⁷ permettant la génération des trois fragments Cp20, C17 et Cp14. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec Ets-1 p51.

IV/ Discussion et conclusion

La mise en évidence du clivage d'Ets-1 par la caspase-3 suggère un nouveau mode de régulation d'Ets-1. Cette régulation réside dans le contrôle négatif de son activité. En effet, le principal fragment de clivage d'Ets-1, Cp17, constitue un dominant négatif naturel des propriétés transcriptionnelles d'Ets-1.

Le clivage d'Ets-1 pendant l'apoptose conduit à la perte de son activité transcriptionnelle. Ceci peut être un moyen pour renforcer la mort cellulaire *via* la diminution de l'expression des gènes cibles anti-apoptotiques d'Ets-1 (voir Partie 1, Chapitre V §I-8). De plus, le fragment dominant négatif Cp17 peut apporter un mécanisme additionnel de l'amplification de la mort programmée en réprimant l'expression des gènes cibles anti-apoptotiques induite par Ets-1 intacte. Le non clivage de l'isoforme Ets-1 p42, connu pour sa capacité à induire l'apoptose (voir Partie 1, Chapitre IV §II-1-1), peut être également un mécanisme favorisant la mort cellulaire *via* la préservation des fonctions pro-apoptotiques d'Ets-1 p42.

Quant au clivage d'Ets-1 p27, il ne se traduit ni par un gain ni par une perte de fonction. En effet, Ets-1 p27, qui joue un rôle de dominant négatif, génère un fragment dominant négatif. Il y a donc une conservation de la fonction d'Ets-1 p27 après clivage par les caspases.

Les données obtenues au cours de cette étude expliquent pour la première fois le mécanisme responsable de la diminution du taux de la protéine Ets-1 pendant l'apoptose. De plus, elles ont permis de mettre en évidence un nouveau mode de régulation de la protéine Ets-1 *via* son clivage-dépendant des caspases, en générant un fragment dominant négatif qui peut jouer un rôle actif durant l'apoptose.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La question majeure posée au début de ce manuscrit est la suivante : comment une protéine Ets donnée est capable d'agir de façon spécifique malgré la forte conservation du domaine ETS de liaison à l'ADN et de son site de fixation à l'ADN ? Cette question a été traitée pour la protéine Ets-1 au cours de l'analyse bibliographique développée dans l'introduction de ce mémoire. Il en ressort que les principaux mécanismes à l'origine de la spécificité d'action d'Ets-1 sont :

- les contacts établis entre les résidus de son domaine ETS et les bases de l'EBS,
- son auto-inhibition de liaison à l'ADN,
- les interactions avec ses partenaires protéiques.

En effet, Ets-1 a besoin de ses partenaires protéiques, notamment pour la reconnaissance de ses gènes cibles ou pour ses modifications post-traductionnelles. Les résultats obtenus au cours de cette Thèse apportent des éléments supplémentaires dans la compréhension de la spécificité d'Ets-1 et de son mode d'action.

Modulation de l'activité d'Ets-1 par l'interaction avec des partenaires protéiques

Bien que de nombreuses données décrivent le mode d'action de la protéine Ets-1 de pleine longueur, très peu de choses sont connues pour Ets-1 p42 et encore moins pour Ets-1 p27 qui a été identifiée que très récemment. Ceci est en pleine corrélation avec le nombre de partenaires connus de chaque isoforme. Ainsi, de nombreuses protéines d'interaction ont été décrites pour Ets-1 p51, alors que seulement deux sont connues pour Ets-1 p42 et aucune pour Ets-1 p27.

Dans le cadre de cette Thèse, nous avons identifié de nouveaux partenaires d'interaction communs aux trois isoformes d'Ets-1. Parmi eux, nous nous sommes intéressés à la DNA-PK, notamment en raison de ses fonctions qui sont cohérentes avec celles d'Ets-1. En effet, depuis sa découverte en 1990, la DNA-PK est connue pour son rôle crucial joué dans la réparation des cassures de l'ADN. Néanmoins, pendant ces dernières années son rôle dans

la régulation transcriptionnelle a commencé à prendre une part importante parmi ses fonctions.

Nos résultats ont montré que les trois isoformes d'Ets-1 interagissent avec la DNA-PK. Ceci nous incite à penser que le domaine ETS de liaison à l'ADN, seule séquence commune aux trois isoformes, est nécessaire pour l'interaction. Ceci est en accord avec des travaux antérieurs montrant qu'Ese-1, membre de la famille Ets, interagit avec le dimère Ku70/86 par l'intermédiaire du domaine ETS. Ceci pourra être vérifié par la technique d'immunoprécipitation en utilisant les différents mutants de délétion d'Ets-1 p51, qui ont déjà été produits par notre équipe.

Les modifications post-traductionnelles ayant un impact majeur sur l'activité de la protéine Ets-1 sont la phosphorylation activatrice de la thréonine 38 en aval de la voie Ras-MAPK (voir Partie 1, Chapitre IV §II-2-1-a) et la phosphorylation des résidus sérines du domaine codé par l'exon VII en réponse à des signaux calciques (voir Partie 1, Chapitre IV §II-2-2-a). Nos résultats ont permis de dévoiler l'existence d'une nouvelle kinase phosphorylant Ets-1, la DNA-PK. L'activité kinase de cette protéine est stimulée par l'ADN. Néanmoins, des études plus récentes ont montré que l'interaction protéine-protéine est un deuxième mécanisme responsable de la stimulation de l'activité kinase de la DNA-PK. Ceci a été montré pour diverses protéines, telles que le facteur de transcription à homéodomaine Oct-1, le facteur nucléaire de liaison à l'ADN C1D et TRBP (« thyroid hormone receptor-binding protein ») [389, 390]. Ets-1 est phosphorylée, comme ces protéines, indépendamment de l'ADN. Nous suggérons donc qu'en interagissant avec la DNA-PK, Ets-1 stimule son activité kinase, et en retour, la DNA-PK phosphoryle Ets-1. Ainsi, cette nouvelle modification post-traductionnelle d'Ets-1 pourrait avoir un impact très important sur ses fonctions *via* la régulation de son activité.

L'identification des sites de phosphorylation par la DNA-PK et l'étude de l'effet de cette phosphorylation sur Ets-1, représentent des perspectives majeures de cette étude. En effet, la DNA-PK est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle ses substrats au niveau d'un résidu sérine ou thréonine immédiatement suivie par une glutamine (S/T-Q) [391]. Sur la base de cette donnée, nous avons réalisé des recherches *in silico* des sites putatifs de phosphorylation par la DNA-PK au niveau des séquences peptidiques des isoformes d'Ets-1. Trois sites de phosphorylation sont proposés pour Ets-1 p51: deux sites, T²⁶⁵Q et S²⁷⁰Q,

localisés dans la région codée par l'exon VII et un site S⁴⁶Q, présent dans la région N-terminale. L'isoforme Ets-1 p42, étant dépourvue de la région codée par l'exon VII ne possède qu'un site potentiel S⁴⁶Q. Quant à l'isoforme Ets-1 p27, elle possède les sites T⁴⁹Q et S⁵⁴Q (équivalents aux sites T²⁶⁵Q et S²⁷⁰Q d'Ets-1 p51), présents dans la région codée par l'exon VII. Il est à noter que la sérine en position 270 est déjà connue pour être phosphorylée par la CaMKII. Nous suggérons que la phosphorylation de ce résidu par la CaMKII ou par la DNA-PK puisse dépendre du contexte cellulaire.

Afin de déterminer si Ets-1 est phosphorylée au niveau de ces sites putatifs, nous envisageons de générer différents mutants ponctuels des isoformes d'Ets-1 en remplaçant le résidu sérine ou thréonine par une alanine. Ceci permettra d'inactiver l'éventuelle phosphorylation d'Ets-1 par la DNA-PK. Ces différents mutants seront ensuite soumis à un test de phosphorylation pour valider les sites exacts responsables de phosphorylation de chaque isoforme. Cette étude devrait être complétée par l'évaluation des conséquences de la phosphorylation des isoformes d'Ets-1 sur leur activité transcriptionnelle. Dans ce même contexte, nous avons montré que la protéine Ku86 diminue la transactivation induite par Ets-1 du gène de la stromélysine-1. Il serait alors intéressant de déterminer le mécanisme responsable d'un tel effet qui peut correspondre : (1) à une inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1 ou (2) à une co-répression transcriptionnelle due à la simple interaction protéine-protéine. Cette dernière possibilité a été montrée pour plusieurs facteurs de transcription, tels que HoxC4 (« homeobox C4 ») et Oct-1 [392]. Il est également intéressant d'identifier les gènes cibles d'Ets-1 endogènes régulés *via* l'interaction entre Ets-1 et Ku86 et ce pour mieux comprendre les diverses fonctions intrinsèques d'Ets-1.

A terme, la caractérisation complète de l'interaction d'Ets-1 avec ses nouveaux partenaires identifiés devrait permettre de mieux comprendre les différents mécanismes découlant de la liaison d'Ets-1 à l'ADN et aboutissant à la régulation de la transcription de ses gènes cibles.

L'ensemble de ces données permettent de mieux appréhender le rôle de la DNA-PK dans la régulation de l'activité d'Ets-1. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure un effet inverse c'est-à-dire la régulation de l'activité de la DNA-PK *via* son interaction avec Ets-1. L'étude de cet aspect pourrait permettre de découvrir de nouvelles fonctions d'Ets-1 dans la réparation des cassures de l'ADN.

Modulation de l'activité d'Ets-1 par les différentes isoformes

L'activité de régulateur transcriptionnel d'Ets-1 est modulée par l'existence de plusieurs isoformes (voir Partie 1, Chapitre IV §II-1). Jusqu'alors, trois isoformes sont décrites chez l'homme : p51, l'isoforme majoritaire de pleine longueur, p42 et p27, respectivement, issues d'un épissage alternatif de l'exon VII et des exons III-VI. La région codée par l'exon VII constitue un domaine régulateur, responsable de la différence d'activité entre Ets-1 p51 et Ets-1 p42. En effet, ce domaine est décrit comme :

- un régulateur de la liaison à l'ADN,
- un médiateur des interactions protéine-protéine,
- et une cible de la voie de phosphorylation Ca²⁺ dépendante.

Au cours de cette Thèse, nous avons révélé l'existence d'une autre fonction du domaine codée par l'exon VII. En effet, les isoformes Ets-1 p51 et Ets-1 p27 sont clivées par la caspase-3 au niveau de ce domaine. Ets-1 p42 étant dépourvue de ce domaine, n'est pas sensible au clivage par les caspases. Ceci permet d'accentuer les différences fonctionnelles entre les isoformes d'Ets-1.

L'isoforme Ets-1 p27 a un pouvoir répressur sur la tumorigénicité des cellules de carcinomes mammaires, processus favorisé par l'action d'Ets-1 p51. De ce point de vue, Ets-1 p27 se rapproche d'Ets-1 p42 puisque cette autre isoforme pourrait également s'opposer à la cancérisation grâce à sa capacité à induire l'apoptose dans des cellules transformées. Ainsi, il peut exister un dialogue fonctionnel entre les trois isoformes permettant de moduler finement la transcription de nombreux gènes, dont les produits sont impliqués dans divers processus physiologiques et pathologiques fondamentaux. Néanmoins, le faible niveau d'expression d'Ets-1 p27 et d'Ets-1 p42 comparé à celui d'Ets-1 p51 n'est pas un argument en faveur de l'activité de ces deux isoformes vis-à-vis d'Ets-1 p51. La présence de différents domaines au niveau de chaque isoforme permet tout de même d'envisager des mécanismes qui serviraient à pallier ces faibles taux d'expression. La différence de sensibilité au clivage par les caspases peut représenter un de ces mécanismes. En effet, le clivage d'Ets-1 p51 par la caspase-3 induit son inactivation spécifique par rapport à Ets-1 p42, qui peut donc s'opposer à la cancérisation en favorisant la mort cellulaire. Quant à Ets-1 p27, son clivage n'a aucune conséquence sur ses propriétés transcriptionnelles étant déjà dépourvue du domaine de transactivation.

Le clivage d'Ets-1 p51 produit un dominant négatif, Cp17, qui agit directement sur les propriétés transcriptionnelles d'Ets-1. Ce type de clivage caspases-dépendant qui génère des fragments dominant négatifs a été également mis en évidence pour plusieurs autres facteurs de transcription, tels que NF-kB p65/RelA [344] et SRF (« serum response factor ») [393]. Le clivage de ces protéines a pour conséquences, en plus de leur inactivation en séparant le domaine de transactivation du domaine de liaison à l'ADN, la génération d'un fragment dominant négatif qui réprime la transactivation des gènes cibles induite par la protéine de pleine longueur.

Un autre moyen d'inactivation des facteurs de transcription *via* leur coupure caspases-dépendante est le clivage à l'intérieur du domaine de transactivation, comme démontré pour le facteur de transcription MEF2 (« myocyte enhancer factor 2 ») [394]. Le clivage au niveau du domaine de liaison à l'ADN peut représenter une autre possibilité d'inactivation des facteurs de transcription. Ceci n'a jamais été mis en évidence à nos connaissances, mais il peut représenter un moyen pour induire une perte totale de fonction de la protéine sans en acquérir d'autres (au niveau transcriptionnelle) *via* les fragments de clivage.

Le clivage d'Ets-1 présente une particularité importante par rapport au clivage des autres facteurs de transcription. En effet, une de ses importantes caractéristiques est son auto-inhibition de la liaison à l'ADN qui représente une des clés de sa spécificité d'action. De ce fait, il ne suffirait pas d'avoir le domaine ETS de liaison à l'ADN séparé du domaine de transactivation, comme c'est le cas de certains facteurs de transcription, pour obtenir un fragment dominant négatif spécifique. Ainsi, le fragment majoritaire, Cp17, possède les deux domaines inhibiteurs entourant le domaine de liaison à l'ADN. Il est donc plus spécifique du facteur Ets-1, particulièrement au niveau des promoteurs contenant des organisations palindromiques d'EBS ou des éléments d'ADN adjacents qui sont activés uniquement après la levée de l'auto-inhibition d'Ets-1.

Une des perspectives majeure de ce travail est donc de déterminer la relevance biologique de la génération du fragment Cp17 à fonction de dominant négatif. L'hypothèse la plus probable est l'inhibition de l'expression des gènes cibles d'Ets-1 anti-apoptotiques pour participer à l'exécution du programme apoptotique. L'induction de la mort cellulaire par Cp17 mais pas par Np36, dépourvue du domaine de liaison à l'ADN, permet de suggérer que cet effet passe par la voie apoptotique en régulant négativement les gènes anti-apoptotiques. Il est donc intéressant de tester l'effet de Cp17 sur les gènes cibles anti-apoptotiques d'Ets-1 tel que Bcl-2. Néanmoins, une caractérisation préalable du promoteur de ce gène est nécessaire.

En conclusion, l'identification des partenaires protéiques d'Ets-1 ainsi que la compréhension de la régulation de son activité sont essentielles pour appréhender la fonction de ce facteur mais illustrent également la complexité de son mode d'action. En effet, la régulation transcriptionnelle induite par Ets-1 est assujettie au ratio des différentes isoformes exprimées, à leur état de modification post-traductionnelle ou encore à la présence de leurs partenaires protéiques. De plus, cette régulation est versatile puisque ces paramètres varient en fonction du contexte et de l'environnement cellulaire. La complexité des mécanismes qui contrôlent l'activité d'Ets-1 fait que ce facteur agira d'une façon donnée dans un contexte bien précis. Par conséquent et de façon assez surprenante, c'est cette complexité qui est à l'origine de la spécificité d'action d'Ets-1.

ANNEXES

Matériel et méthode complémentaires à la publication N°3

Test de toxicité. Les cellules HEK-293,ensemencées dans des plaques de culture, sont transfectées avec 1 µg d'ADN par cupule, en utilisant le réactif ExGen 500 (Euromedex) suivant les instructions du fabricant. Après 48 heures, les cellules sont dispatchées en trois boîtes de culture de 100 mm contenant le milieu de culture DMEM à 10% de SVF. Le jour suivant, le milieu de culture est supplémenté avec 1,1 mg/ml de G418. Dix jours après, les cellules sont colorées au cristal violet, puis comptées.

Mutagenèse dirigée. Pour produire les mutants ponctuels d'Ets-1 p27, les résidus aspartates (D) sont remplacés par des résidus asparagines (N) en position 46 pour D1N, 46/71/74 pour D3N et 46/71/74/97 pour D4N, et ce en utilisant le Kit QuickChange Site-directed Mutagenesis (Stratagene). Brièvement, le vecteur d'expression pcDNA3-Flag-Ets-1 p27 a été utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR en utilisant les amorces suivantes (les codons mutés sont soulignés) :

5'-TACGATAGTTGCAAATCGGCTCACACAG-3' et 5'-CTGTGTGAGCCGATTGCAACTATCGTA-3' pour la mutation D46N;

5'-GACAGCTTCAACTCCGAGAACTTATCCGGCCGGC-3' et 5'-GCCGGCCGGATAGTTTCTCGGAGTTTGAAGCTGTC-3' pour les mutations D71/74N et 5'-CGTGACCGCGCTAACCCTCAACAAGGACAAG-3' et 5'-CTTGTCCTTGTTGAGGTTAGCGCGGTTCACG-3' pour la mutation D97N.

Réaction de clivage in vitro par la caspase-3 et induction de l'apoptose par l'anisomycine. Ces expériences ont été réalisées comme décrit dans la section « Experimental » de la publication.

PUBLICATION N°4

Ets-1 p27 : une nouvelle isoforme d'Ets-1 aux effets dominants négatifs sur les propriétés transcriptionnelles et la localisation subcellulaire d'Ets-1 p51

Le travail présenté dans cet article, publié dans le journal « Oncogene » et auquel j'ai participé, décrit la caractérisation moléculaire et cellulaire d'Ets-1 p27, une nouvelle isoforme d'Ets-1.

Dans cette étude, j'ai mis en évidence le rôle de dominant négatif d'Ets-1 p27 sur la localisation subcellulaire d'Ets-1 p51. En effet, Ets-1 p27 est une protéine nucléaire et cytoplasmique qui délocalise la protéine Ets-1 p51 du noyau vers le cytoplasme l'empêchant ainsi de jouer son rôle de régulateur transcriptionnel.

ORIGINAL ARTICLE

Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51C Laitem^{1,4}, G Leprivier^{1,3,4}, S Choul-Li¹, A Begue¹, D Monte¹, D Larsimont², P Dumont¹, M Duterque-Coquillaud¹ and M Aumercier¹¹CNRS Unité Mixte de Recherche 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Universités de Lille 1 and Lille 2, IFR 142, Lille, France and ²Department of Pathology, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

The transcription factor Ets-1 is implicated in various physiological processes and invasive pathologies. We identified a novel variant of *ets-1*, *ets-1Δ(III–VI)*, resulting from the alternative splicing of exons III to VI. This variant encodes a 27 kDa isoform, named Ets-1 p27. Ets-1 p27 lacks the threonine-38 residue, the Pointed domain and the transactivation domain, all of which are required for the transactivation of Ets-1 target genes. Both inhibitory domains surrounding the DNA-binding domain are conserved, suggesting that Ets-1 p27, like the full-length Ets-1 p51 isoform, is autoinhibited for DNA binding. We showed that Ets-1 p27 binds DNA in the same way as Ets-1 p51 does and that it acts both at a transcriptional and a subcellular localization level, thereby constituting a dual-acting dominant negative of Ets-1 p51. Ets-1 p27 blocks Ets-1 p51-mediated transactivation of target genes and induces the translocation of Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm. Furthermore, Ets-1 p27 overexpression represses the tumor properties of MDA-MB-231 mammary carcinoma cells in correlation with the known implication of Ets-1 in various cellular mechanisms. Thus the dual-acting dominant-negative function of Ets-1 p27 gives to the Ets-1 p27/Ets-1 p51 ratio a determining effect on cell fate.

Oncogene (2009) 28, 2087–2099; doi:10.1038/onc.2009.72; published online 20 April 2009

Keywords: Ets-1; transcriptional regulation; subcellular localization; dominant-negative isoform; alternative splicing

Introduction

Splicing of intronic sequences is a physiological cellular mechanism implicated in RNA maturation. During this

process, exonic sequences can be alternatively spliced, generating either nonsense mRNAs, which will be degraded, or mature mRNAs, which can encode proteins with different structures and properties, called isoforms (Smith and Valcarcel, 2000; Stamm *et al.*, 2005). Alternative splicing of mRNA precursors can be modulated in a spatiotemporal manner and can participate in the regulation of gene functions (Shin and Manley, 2004). Alternative splicing occurs in numerous members of the Ets family of transcription factors such as GABP α (O'Leary *et al.*, 2005), Tel (Sasaki *et al.*, 2004), Spi-B (Ray-Gallet *et al.*, 1996), Ets-1 (Baillat *et al.*, 2002), Fli-1 (Sarrazin *et al.*, 2000), ER81 (Coutte *et al.*, 1999), Erg (Hewett *et al.*, 2001), ESE-1 (Lei *et al.*, 2007), ELF-1 (Cho *et al.*, 2004), Elk-1 (Araud *et al.*, 2007) and ER-71 (De Haro and Janknecht, 2005).

The Ets family is characterized by a well-conserved DNA-binding domain (DBD), called the ETS domain, and recognizes specific DNA elements, called Ets-binding sites (EBS), found in the promoters of target genes. The founding member of this family, Ets-1, is involved in numerous cellular mechanisms such as proliferation (de Nigris *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2007), differentiation (Lulli *et al.*, 2006; John *et al.*, 2007), migration (Kita *et al.*, 2001), invasion (Taniguchi *et al.*, 2007) and apoptosis (Teruyama *et al.*, 2001). However, when overexpressed, Ets-1 is partly responsible for the development of invasive pathologies such as rheumatoid arthritis (Redlich *et al.*, 2001), glomerulonephritis (Raffetseder *et al.*, 2004) or cancers (Dittmer, 2003). Ets-1 is now considered as a marker of poor prognosis in numerous cancers (Nakayama *et al.*, 2001; Alipov *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2005).

The activity of Ets-1 is tightly controlled, especially at the DNA-binding level, to ensure a specific biological action. Indeed, Ets-1 is autoinhibited for DNA binding due to the presence of two inhibitory domains surrounding and interacting with its DBD (Lee *et al.*, 2005). To counteract autoinhibition and improve DNA binding, Ets-1 interacts with partners, enabling their cooperative binding to adjacent DNA elements (Pufall and Graves, 2002). Ets-1 can also counteract its autoinhibition on its own by binding to a particular organization of palindromic EBS spaced by 4 bp, as in the *stromelysin-1* matrix metalloproteinase and the *p53* oncosuppressor promoters (Wasylyk *et al.*, 1991; Baillat *et al.*, 2002, 2009). Two molecules of Ets-1 cooperatively bind to the

Correspondence: Dr M Aumercier, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Prof Calmette, BP 447, 59021, Lille Cedex, France.

E-mail: marc.aumercier@ibl.fr

³Current address: Department of Molecular Oncology, British Columbia Cancer Research Centre, Vancouver, British Columbia, Canada.

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 21 October 2008; revised 4 February 2009; accepted 10 March 2009; published online 20 April 2009

EBS palindrome, thereby forming an Ets-1/DNA/Ets-1 ternary complex, which is critical for full transactivation (Baillat *et al.*, 2002).

Until now, only two isoforms of Ets-1 have been described: the full-length protein Ets-1 p51 (usually called Ets-1) and the isoform encoded by the *ets-1ΔVII* alternative splicing variant Ets-1 p42 (Koizumi *et al.*, 1990). This latter variant lacks exon VII, which encodes, in particular, the N-terminal inhibitory domain. Therefore, Ets-1 p42 is not autoinhibited and presents different DNA-binding and transcriptional properties from the full-length Ets-1 p51 protein (Fisher *et al.*, 1994; Baillat *et al.*, 2002). Thus, Ets-1 p51 and Ets-1 p42 regulate different target genes, illustrating regulation of Ets-1 function through alternative splicing (Li *et al.*, 1999; de Nigris *et al.*, 2001; Taniguchi *et al.*, 2007).

In this study, we identified a novel variant of *ets-1*, named *ets-1Δ(III–VI)*, which results from the alternative splicing of exons III to VI. This variant encodes a 27 kDa isoform, named Ets-1 p27. By characterizing the molecular and cellular properties of Ets-1 p27, we show that Ets-1 p27 is the first natural Ets-1 dominant negative that acts both at a transcriptional and a subcellular localization level and which represses the tumoral properties of invasive mammary carcinoma cells.

Results

ets-1Δ(III–VI) is a novel *ets-1* variant expressed in a tissue-specific manner

A novel *ets-1* variant was identified by reverse transcription (RT)–PCR using flanking primers in HIG-82 rabbit synovial fibroblastic cells in addition to transcripts corresponding to full-length *ets-1* and exon-VII-deleted *ets-1ΔVII* (data not shown). The complete coding sequence of this variant, which is available in GenBank under accession number EU939724, demonstrates that it results from the alternative splicing of exons III to VI (Figure 1a, left). Therefore, this novel *ets-1* variant was called *ets-1Δ(III–VI)*. Its expression was confirmed in HIG-82 cells by RT–PCR using two other primer pairs (Figure 1a): the pair 1, composed of primers designed in exon A and exon VII and the pair 2, composed of primers located at the *ets-1Δ(III–VI)* splicing junction and in exon VII.

Using this two primer pairs, we showed by RT–PCR that both *ets-1* and *ets-1Δ(III–VI)* transcripts were synthesized in HIG-82 cells, MG-63 human osteosarcoma cells and MDA-MB-231 invasive human mammary adenocarcinoma cells (Figure 1b). The complete coding sequence of the human *ets-1Δ(III–VI)* variant in MDA-MB-231 cells was determined and is available in GenBank under accession number AY943926.

Reverse transcription–PCR performed on RNAs from human mammary adenocarcinomas (Figure 1c, lanes 1–3) and PCR on cDNA from a human mammary tissue library (Figure 1c, lane 4) revealed that the two transcripts were expressed in tumor mammary tissues, but not in normal tissues. Next, cDNA libraries of

human fetal and adult tissues were analysed by PCR (Figure 1d). Both *ets-1* and *ets-1Δ(III–VI)* were detected in all fetal tissues tested, but varied with tissue type in adult tissues. Indeed, both *ets-1* and *ets-1Δ(III–VI)* were expressed in spleen, thymus, placental and ovarian tissues, but neither in brain nor kidney tissues. Thus, *ets-1Δ(III–VI)* was expressed along with full-length *ets-1* in some tissue and their ratio depended on cell and tissue types, suggesting a tissue-dependent effect of *ets-1Δ(III–VI)* on *ets-1* properties.

ets-1Δ(III–VI) variant encodes Ets-1 p27, a novel Ets-1 isoform

The novel *ets-1Δ(III–VI)* variant gives rise to a 225-amino-acid Ets-1 protein, which lacks the threonine-38 (Thr38) residue as well as the Pointed (PNT) and transactivation (TAD) domains, all of which are required for the transactivation of Ets-1 target genes (Jayaraman *et al.*, 1999; Seidel and Graves, 2002; Foulds *et al.*, 2004). However, it conserves the DBD flanked by the two inhibitory domains. Given its apparent molecular mass of 27 kDa, this isoform was called Ets-1 p27, in contrast to full-length Ets-1 that has a mass of 51 kDa (Figure 2a). Western blot analysis of native and *ets-1Δ(III–VI)* cDNA-transfected HIG-82 cells, using the C-20 anti-Ets-1 antibody directed against Ets-1 DBD, showed the presence of a 27 kDa endogenous protein (Figure 2b, lane 1), which migrates exactly the same way as exogenous Ets-1 p27 does (Figure 2b, lane 2). Thus, Ets-1 p27 was endogenously expressed in HIG-82 cells. Furthermore, its intensity was roughly equivalent to that of Ets-1 p42. A higher molecular mass protein was also detected in transfected HIG-82 cells (Figure 2b, lane 2). This protein probably corresponds to post-translationally modified Ets-1 p27, which was only weakly observed in native cells due to its low expression level.

Expression of Ets-1 p27 was then assessed in various cell lines by western blot using either the C-20 anti-Ets-1 antibody directed against Ets-1 DBD or a specific anti-Ets-1 p27 antibody, directed against the Ets-1 p27 alternative splicing junction (Figure 2c). Results showed that HIG-82 (Figure 2c, lane 2), MDA-MB-231 (Figure 2c, lane 3), MG-63 (Figure 2c, lane 4) and Jurkat (Figure 2c, lane 5) cells expressed endogenously the novel Ets-1 p27 isoform, which was recognized by both antibodies. The Ets-1 p27 isoform is thus endogenously expressed in numerous cell lines.

Ets-1 p27 binds to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter in the same way as Ets-1 p51 does and competes with Ets-1 p51 for binding

We then determined whether Ets-1 p27 was autoinhibited like Ets-1 p51 and whether autoinhibition is counteracted by cooperative binding to the palindromic EBS of the *stromelysin-1* promoter. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were carried out using Ets-1 p51 or Ets-1 p27 recombinant proteins and 30-mer ³²P-labeled DNA probes containing wild-type (WT) or mutant EBS palindromes of the *stromelysin-1* promoter

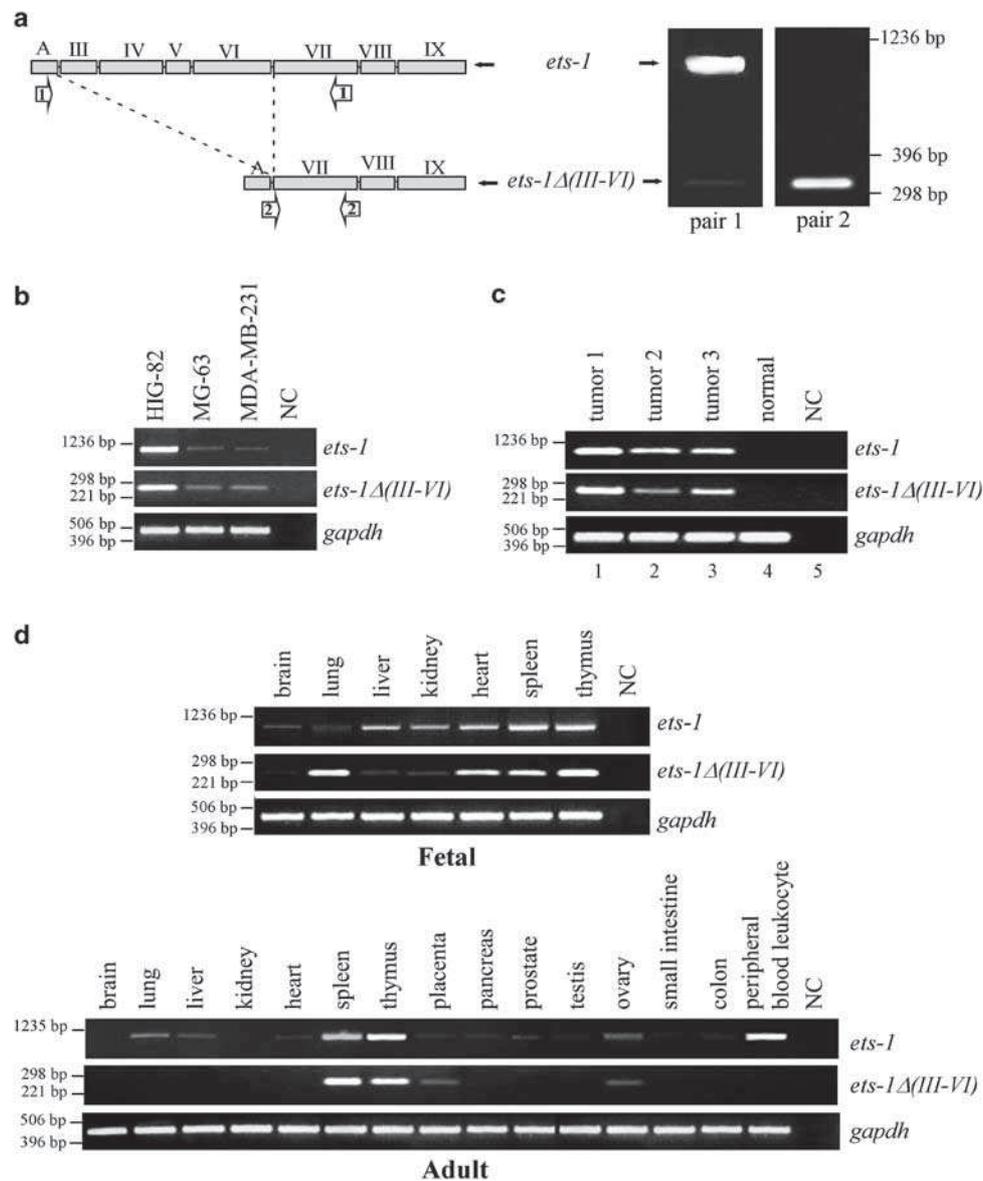


Figure 1 Evidence for a novel *ets-1* alternative splicing variant, named *ets-1Δ(III-VI)*, and its cellular and tissue distribution along with *ets-1*. (a) The *ets-1* and *ets-1Δ(III-VI)* schematic representation and detection by reverse transcription (RT)-PCR in HIG-82 cells. Left: translated exons are represented as boxes and noted from A to IX. Arrow couples (indicated by 1 and 2) represent primer pairs, used in subsequent PCR experiments. Right: single-strand cDNAs were synthesized from HIG-82 total RNAs and *ets-1* cDNAs were amplified by PCR using the two primer pairs (pairs 1 and 2) indicated in the left. Amplified PCR products, which correspond to *ets-1* and *ets-1Δ(III-VI)*, were resolved on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and are indicated by arrows related to the scheme. (b) RT-PCR analysis of different cell lines. RNAs from HIG-82, MG-63 and MDA-MB-231 cells were retrotranscribed and *ets-1* cDNAs were amplified by PCR using the two primer pairs described in (a). Amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) with specific primers was used as a loading control and amplification without template as a negative control (NC). (c) Analysis of tumor and normal mammary tissues by RT-PCR and PCR. RNAs extracted from human mammary adenocarcinomas (lanes 1-3) and cDNAs from a normal mammary tissue library (lane 4) were amplified by RT-PCR and PCR, respectively, as described in (b). (d) Analysis of fetal and adult human tissues by PCR. cDNAs from fetal and adult human tissue libraries were amplified by PCR as described in (b).

(Table 1; Figure 3a). As expected, results showed that Ets-1 p51 and Ets-1 p27 formed ternary complexes with the wild-type EBS palindrome (indicated by arrows 1 and 2 in Figure 3a, lanes 1 and 5), whereas mutation of one (M1, M2) or both (M1M2) EBS prevented both isoforms from forming DNA/protein complexes (Figure 3a, lanes 2-4 and 6-8). In both cases, these complexes were disrupted by an 800 × molar excess of

WT non-labeled DNA probe (Figure 3b, lanes 2 and 5), but not by an 800 × molar excess of M1M2 non-labeled DNA probe (Figure 3b, lanes 3 and 6). This confirmed the complexes' specificity to the EBS palindrome.

Surface plasmon resonance (SPR) measurement experiments were then carried out using Biacore technology (Figure 3c). For both Ets-1 p27 and Ets-1 p51, the measured resonance unit (RU) signal corre-

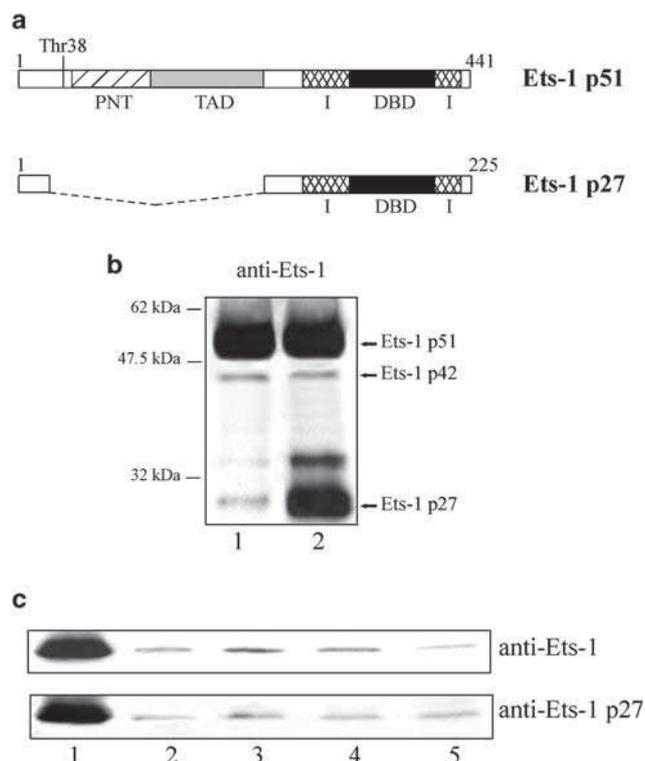


Figure 2 *ets-1Δ(III-VI)* encodes a 27 kDa protein, called Ets-1 p27. (a) Schematic representation of Ets-1 p51 and Ets-1 p27 proteins. Boxes correspond to translated regions and dotted lines to untranslated regions. Threonine-38 (Thr38), Pointed domain (PNT), transactivation domain (TAD), inhibitory domain (I) and DNA-binding domain (DBD) are indicated. (b) Western blot analysis of Ets-1 expression in HEK-293 cells. pcDNA3 expression vectors without insert (lane 1) and encoding Ets-1 p27 (lane 2) were transfected in HEK-293 cells at 50–80% confluence. At 48 h after transfection, cell lysates (30 μg total proteins) were analysed by western blot using the C-20 anti-Ets-1 antibody directed against DBD. (c) Western blot analysis of Ets-1 p27 expression in several cell lines. Cell lysates (30 μg total proteins) of HEK-293 previously transfected with Ets-1 p27 encoding pcDNA3 expression vector (lane 1), HIG-82 (lane 2), MG-63 (lane 3), MDA-MB-231 (lane 4) and Jurkat (lane 5) were analysed by western blot using the C-20 anti-Ets-1 antibody and a specific anti-Ets-1 p27 antibody directed against Ets-1 p27 alternative splicing junction.

sponding to binding to the WT probe was higher than the sum of those obtained with M1 and M2 probes (Figure 3c, indicated by dotted line M1 + M2). Ets-1 p27 thus binds cooperatively to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter in the same way as Ets-1 p51 does.

Next, we assessed the ability of Ets-1 p27 to compete with Ets-1 p51 for binding. For this purpose, EMSA experiments were carried out using the 30-mer ³²P-labeled WT DNA probe (Table 1) and various Ets-1 p51/Ets-1 p27 ratios (Figure 3d). Results showed that the Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p51 ternary complex (Figure 3d, lane 1) was disrupted in a dose-dependent manner in the presence of Ets-1 p27 (Figure 3d, lanes 2–4), leading to the formation of an Ets-1 p27/DNA/Ets-1 p27 ternary complex (Figure 3d, lane 5). This disruption was accompanied by the formation of an intermediate migrating complex (indicated by arrow i), composed of one molecule of each isoform. Thus, the

Table 1 Wild-type and mutant sequences of the *stromelysin-1* promoter

Name	Sequences
WT	5'...ACCAAGACAGGAA GCACTTCC TGGAGATTA...3'
M1	5'...ACCAAGACA AAAA GCACTTCCCTGGAGATTA...3'
M2	5'...ACCAAGACAGGAAGCAC TTTT TGGAGATTA...3'
M1M2	5'...ACCAAGACA AAAA GCAC TTTT TGGAGATTA...3'

Sequences of the –223/–193 EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter and its mutants.

The EBS core sequences are represented as boldface letters in the sequence. Mutations are boxed.

novel Ets-1 p27 isoform competes with Ets-1 p51 for binding to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter.

Ets-1 p27 is a dominant negative for Ets-1 p51 and other autoinhibited Ets proteins transcriptional transactivation

To verify if Ets-1 p27 can block Ets-1 p51 transcriptional properties, luciferase transactivation assays were performed with the *stromelysin-1* promoter (WT or M1M2) using increasing concentrations of Ets-1 p27 with or without Ets-1 p51 (Figure 4a). HEK-293 cells were used because they lack endogenous Ets-1, allowing us to monitor the expression of the different Ets-1 isoforms. It appeared that Ets-1 p27 was unable to activate the *stromelysin-1* promoter on its own (Figure 4a, lanes 1–8). Nevertheless, it repressed in a dose-dependent manner the activation of the WT promoter mediated by Ets-1 p51 (Figure 4a, lanes 9–12). This was mediated through the EBS palindrome, because EBS mutations abrogated any Ets-1 p27 effects (Figure 4a, lanes 13–16). Thus, Ets-1 p27 constitutes a dominant-negative isoform for Ets-1 p51 transactivation of the *stromelysin-1* promoter. Because autoinhibited Ets-2 and PEA-3 proteins also activate this promoter through the EBS palindrome (Buttice and Kurkinen, 1993; Higashino *et al.*, 1995), luciferase transactivation assays were also carried out, as described above, using Ets-2 (Figure 4b) and PEA-3 (Figure 4c) as transcriptional activators. Results showed that Ets-1 p27 acts also as a dominant negative for Ets-2 and PEA-3 transactivation of the *stromelysin-1* promoter. Furthermore, we demonstrated that Ets-1 p27 repressed in a dose-dependent manner the synergistic activation of the *collagenase-1* promoter induced by Ets-1 p51 and the c-Jun/c-Fos (AP-1) complex, through the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) oncogene response unit, composed of an EBS adjacent to an AP-1 site (see Supplementary Information, Figure S1 and Table S1). Thus, Ets-1 p27 is also a dominant negative for Ets-1 p51 transactivation of target promoters mediated through combinatorial regulation with interaction partners.

Ets-1 p27 delocalizes Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm

To mediate its transcriptional dominant-negative function, Ets-1 p27 must be coexpressed with Ets-1 p51 in

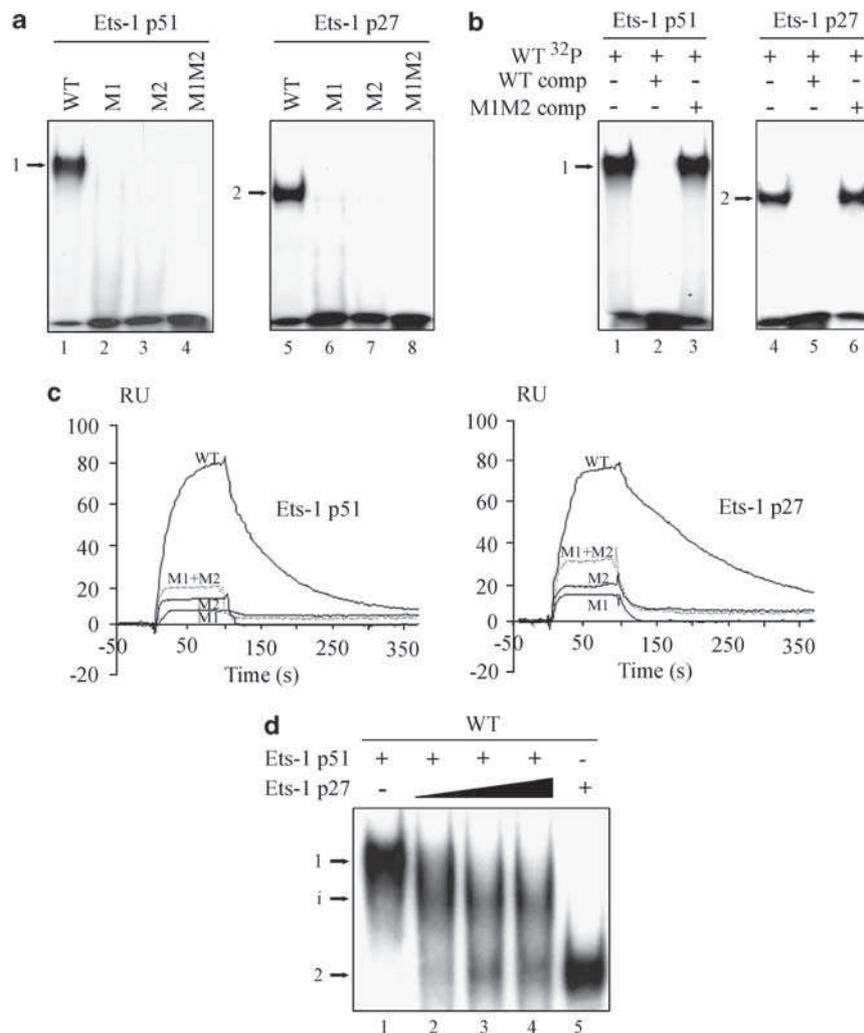


Figure 3 Ets-1 p27 binds cooperatively to the Ets-binding sites (EBS) palindrome of the *stromelysin-1* promoter and competes with Ets-1 p51 for binding. **(a)** Electrophoretic mobility shift assay. Ets-1 p51 (lanes 1–4) or Ets-1 p27 (lanes 5–8) (4 pmol) was incubated with wild-type (WT, lanes 1 and 5), mutant M1 (lanes 2 and 6), mutant M2 (lanes 3 and 7) or mutant M1M2 (lanes 4 and 8) ³²P-labeled DNA probes (0.5 ng). **(b)** Binding specificity of Ets-1 p51 and Ets-1 p27 to the EBS palindrome. Ets-1 p51 (lanes 1–3) or Ets-1 p27 (lanes 4–6) (4 pmol) was incubated with WT ³²P-labeled DNA probe (0.5 ng) in the absence (lanes 1 and 4) or presence of unlabeled competitors (WT 800 ×, lanes 2 and 5 or M1M2 800 ×, lanes 3 and 6). For both experiments, DNA/protein complexes were separated by electrophoresis in a 5% nondenaturing polyacrylamide gel. Free probes were detected at the bottom of the gel. Arrows indicate ternary complexes (arrow 1, Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p51 and arrow 2, Ets-1 p27/DNA/Ets-1 p27). **(c)** Sensorgrams illustrating real-time binding of Ets-1 p51 and Ets-1 p27 (200 nM) to a sensor chip functionalized with 150 RU of WT, M1 and M2 oligonucleotides. The dotted line (M1 + M2) represents the sum of M1 and M2 sensorgrams. A flow cell functionalized with M1M2 oligonucleotide was used as a reference for nonspecific binding. Data are expressed as relative responses in resonance units (RU) after subtraction of the nonspecific signal. **(d)** Electrophoretic mobility shift assay. Ets-1 p51 (4 pmol; lane 1), Ets-1 p27 (4 pmol; lane 5) or Ets-1 p51 (4 pmol) with an increase amount of Ets-1 p27 (0–15 pmol) (lanes 2–4) was incubated with WT ³²P-labeled DNA probe (0.5 ng). DNA/protein complexes were separated by electrophoresis in a 5% nondenaturing polyacrylamide gel. Arrows 1 and 2 are described above and arrow i corresponds to Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p27 intermediate ternary complex.

the nucleus. To determine the subcellular localization of Ets-1 p27, immunofluorescence assays were performed on HEK-293 cells exogenously expressing Ets-1 p51 or Ets-1 p27 (Figure 5a). Results confirmed the nuclear localization of Ets-1 p51 (Figure 5a, lane 2) and showed a nuclear and cytoplasmic expression of the novel Ets-1 p27 isoform (Figure 5a, lane 3). Thus, not only is Ets-1 p27 present in the nucleus but its presence in the cytoplasm suggests that Ets-1 p27 may sequester Ets-1 p51 partners in the cytoplasm or directly delocalize Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm.

To test this hypothesis, we performed colocalization experiments using Ets-1 p51 fused to a Flag-tagged and Ets-1 p27 fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP). Immunofluorescence experiments performed on HEK-293 cells expressing Flag-Ets-1 p51 (Figure 5b) or EGFP-Ets-1 p27 (Figure 5c) confirmed that tags did not alter protein subcellular localization of either isoform. Vector used to encode EGFP-Ets-1 p27 intrinsically expressed EGFP detected in control (Figure 5c, lane 1). Colocalization experiments showed that in the presence of Ets-1 p27, Ets-1 p51 was mainly

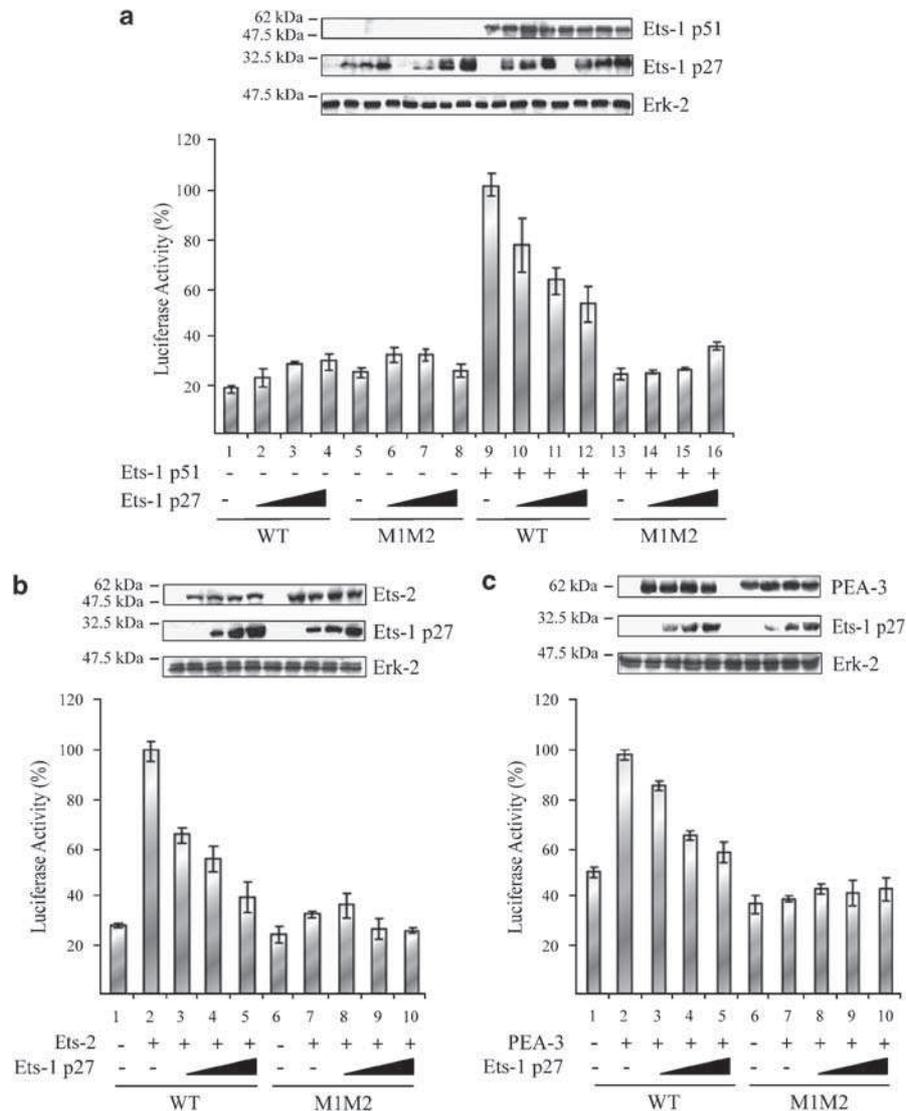
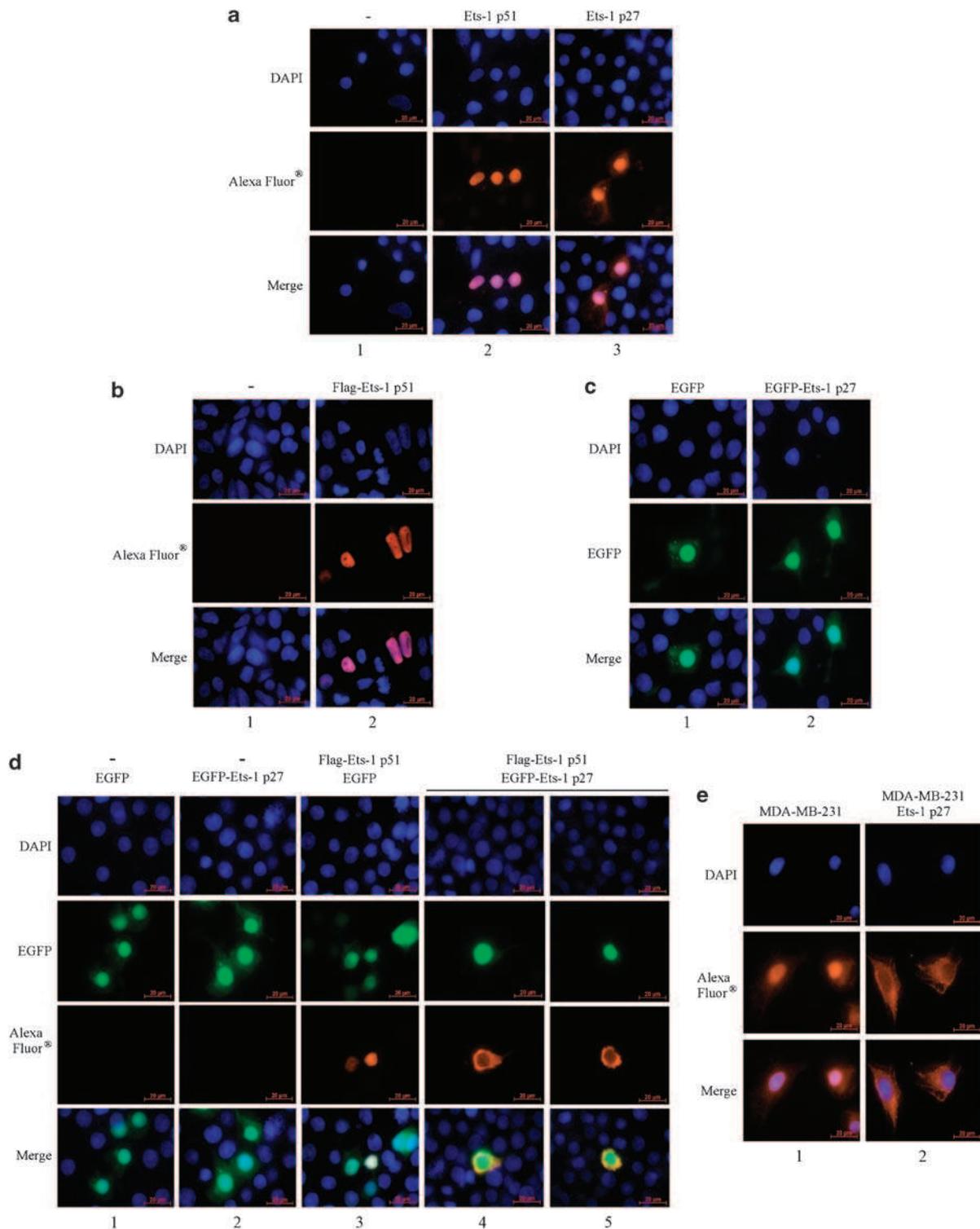


Figure 4 Ets-1 p27 acts as a dominant negative for transactivation of the *stromelysin-1* promoter mediated by autoinhibited Ets-1 p51, Ets-2 and PEA-3 through the Ets-binding sites (EBS) palindrome. **(a)** Effect of Ets-1 p27 on the basal or Ets-1 p51-induced *stromelysin-1* promoter activity. pGL3 luciferase reporter constructs (100 ng; wild-type (WT), lanes 1–4 and 9–12 or M1M2, lanes 5–8 and 13–16) were transfected into HEK-293 cells at a 50–80% confluence in the absence (–) or in the presence (+) of Ets-1 p51 expression vector (100 ng; lanes 9–16) and with increasing amounts of Ets-1 p27 expression vector (0–100 ng; lanes 2–4, 6–8, 10–12 and 14–16). **(b)** Effect of Ets-1 p27 on the Ets-2-induced *stromelysin-1* promoter activity. pGL3 luciferase reporter constructs (100 ng; WT, lanes 1–5 or M1M2, lanes 6–10) were transfected into HEK-293 cells at a 50–80% confluence with Ets-2 expression vector (100 ng; lanes 2–5 and 7–10) and an increasing amount of Ets-1 p27 expression vector (0–100 ng; lanes 3–5 and 8–10). **(c)** Effect of Ets-1 p27 on the PEA3-induced *stromelysin-1* promoter activity. pGL3 luciferase reporter constructs (100 ng; WT, lanes 1–5 or M1M2, lanes 6–10) were transfected into HEK-293 cells at a 50–80% confluence with PEA3 expression vector (100 ng; lanes 2–5 and 7–10) and an increasing amount of Ets-1 p27 expression vector (0–100 ng; lanes 3–5 and 8–10). In all experiments, luciferase activity, measured 48 h after transfection, is expressed as the percentage of WT construct activity induced by Ets-1 p51, Ets-2 or PEA3, respectively. Cell lysates (30 µg total proteins) were analysed by western blot using different antibodies (see Materials and methods). Results are the average of three experiments performed in triplicate.

Figure 5 Ets-1 p27 delocalizes Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm. **(a)** Native Ets-1 p51 and Ets-1 p27 subcellular localization. HEK-293 cells were transfected with empty (1 µg, lane 1), Ets-1 p51 (1 µg, lane 2) or Ets-1 p27 (1 µg, lane 3) pcDNA3 expression vectors. Cells were fixed with paraformaldehyde and treated with rabbit C-20 anti-Ets-1 antibody followed by goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 594. **(b)** Effect of Flag-tag on Ets-1 p51 localization. HEK-293 cells were transfected with empty (1 µg, lane 1) or Flag-Ets-1 p51 (1 µg, lane 2) pcDNA3 expression vectors, fixed with paraformaldehyde and treated, to detect Flag proteins, with mouse anti-Flag M2 antibody followed by goat anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 594. **(c)** Effect of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tag on Ets-1 p27 localization. HEK-293 cells were transfected with EGFP (1 µg, lane 1) or EGFP-Ets-1 p27 (1 µg, lane 2) pEGFP-C1 expression vectors, fixed with paraformaldehyde and natural fluorescence of EGFP was examined. The empty pEGFP-C1 vector encodes EGFP. **(d)** Effect of Ets-1 p27 on Ets-1 p51 subcellular localization. HEK-293 cells were transfected with empty (500 ng, lanes 1 and 2) or Flag-Ets-1 p51 (500 ng, lanes 3–5) pcDNA3 expression vector, and with EGFP (500 ng, lanes 1 and 3) or EGFP-Ets-1 p27 (500 ng, lanes 2–5) pEGFP-C1 expression vectors. Proteins were detected as described in **(b)** and **(c)**. **(e)** Endogenous effect of Ets-1 p27. MDA-MB-231 cells stably expressing Flag-Ets-1 p27 (lane 2) or not (lane 1) were fixed with paraformaldehyde and treated with rabbit C-20 anti-Ets-1 antibody followed by goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 594. In all experiments, nuclei were visualized with Hoechst stain. Cells were examined by fluorescence microscopy at × 100 magnification. Scale bar = 20 µm.

detected in the cytoplasm instead of the nucleus (Figure 5d, lanes 4–5), but EGFP alone did not have this effect on Ets-1 p51 (Figure 5d, lane 3). Thus, Ets-1 p27 induces Ets-1 p51 translocation from the nucleus to the cytoplasm. The capacity of Ets-1 p27 to delocalize endogenous Ets-1 p51 was then tested in MDA-MB-231 cells, which express the three Ets-1 isoforms. In control

MDA-MB-231 cells, Ets-1 proteins were mainly detected in the nucleus, but weak signals were also observed in the cytoplasm (Figure 5e, lane 1). This cytoplasmic signal probably corresponded to endogenous Ets-1 p27 or Ets-1 p51 delocalized by the endogenous Ets-1 p27 isoform. In MDA-MB-231 cells stably overexpressing Ets-1 p27, Ets-1 proteins were



clearly transferred from the nucleus to the cytoplasm (Figure 5e, lane 2). Taken together, these experiments unambiguously demonstrate that an increase in the Ets-1 p27/Ets-1 p51 ratio induces the delocalization of endogenous Ets-1 protein from the nucleus to the cytoplasm.

Ets-1 p27 overexpression represses the tumoral properties of MDA-MB-231 cells

Owing to the dual-acting dominant-negative function of Ets-1 p27 and the known implication of Ets-1 p51 in various cellular processes, we explored the effect of the increase of Ets-1 p27 expression on endogenous Ets-1 p51 properties. As Ets-1 isoforms are expressed in cells that have invasive properties, Ets-1 p27 was stably overexpressed in invasive MDA-MB-231 mammary carcinoma cells by retroviral infection (Figure 6a, clones 2 and 3 indicated by 2 and 3, respectively) and compared to cells that did not overexpress Ets-1 p27 (Figure 6a, clone 1 indicated by 1). Phenotypic analysis of these clones showed that Ets-1 p27 overexpression (1) slowed down anchorage growth of MDA-MB-231 cells and induced the arrest of their proliferation at a lower confluent state (Figure 6b), (2) reduced the number and the size of the colonies formed in soft agar (Figure 6c) and (3) repressed the cells' ability to digest the reconstituted basement membrane and migrate through the porous membrane of an invasion chamber (Figure 6d). Taken together, these results demonstrate that an increase in the Ets-1 p27/Ets-1 p51 ratio represses the properties of proliferation, transformation and invasion of MDA-MB-231 cells. This effect appeared stronger in clone 3, where Ets-1 p27 expression was slightly higher, compared to clone 2 (Figure 6a), suggesting a dose-dependent effect of Ets-1 p27. As a control of specificity, we also stably overexpressed Ets-1 p27 in noninvasive MCF-7 mammary carcinoma cells (data not shown), which do not endogenously express Ets-1 and some of its target genes such as *stromelysin-1* and *collagenase-1*. However, we could not detect any effect of Ets-1 p27 on the phenotype of these cells (data not shown), suggesting that the Ets-1 p27 effect described in MDA-MB-231 cells may function mainly by counteracting endogenous Ets-1 properties.

Moreover, RT-PCR analysis of the MDA-MB-231 clones treated with or without phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a tumor inducer that increases *ets-1* expression, showed that the overexpression of Ets-1 p27 induced a decrease in the mRNA levels of Ets-1 target genes such as *stromelysin-1*, *gelatinase-B*, *uPA*, *p53* and *p21*, at basal and/or PMA-induced levels (Figure 6e). Furthermore, the phenotypic results were corroborated by those obtained *in vivo* (Figure 6f). Xenografts of MDA-MB-231 clones in nude mice by subcutaneous injection showed that the growth of the tumor formed by clones 2 and 3 was repressed compared to that of clone 1, as illustrated by the size of the tumor and the time it took for the tumor to double in volume. The repression of tumor growth was higher for clone 3 compared to clone 2, suggesting once again a dose-

dependent effect of Ets-1 p27 on MDA-MB-231 properties. Thus, overexpression of Ets-1 p27 in MDA-MB-231 cells reduces tumor growth.

Discussion

Although several variants of *ets-1* were detected in human (Jorcyk *et al.*, 1991), only two isoforms have been described up to now: Ets-1 p51, the full-length protein and Ets-1 p42, an isoform lacking the exon-VII-encoding domain. In this study, we identified *ets-1A(III-VI)*, a novel *ets-1* variant resulting from the alternative splicing of exons III to VI. This variant, first identified in HIG-82 rabbit synovial fibroblastic cells, was detected in many human tissues known for expressing Ets-1 (Rowe and Propst, 1992; Maroulakou and Bowe, 2000; Takai *et al.*, 2006; Figure 1). The relative ratio of both *ets-1* and *ets-1A(III-VI)* varied with cell and tissue type, suggesting tissue-specific effects of *ets-1A(III-VI)*.

This *ets-1A(III-VI)* variant encodes a 27 kDa isoform, named Ets-1 p27, the structure of which suggested a dominant-negative function (Figure 2). Results of this study enable us to confirm this assumption and to propose a model in which Ets-1 p27 constitutes a dual-acting dominant negative for Ets-1 p51 (Figure 7). In this model, Ets-1 p27 acts both at a transcriptional level in blocking Ets-1 p51-mediated transactivation of target genes and at a subcellular localization level in inducing the translocation of Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm (Figure 7b).

The DNA-binding and transcriptional properties of Ets-1 p27 were assessed on the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter, the regulation of which is well documented. The *stromelysin-1* promoter is stimulated through this EBS palindrome by autoinhibited Ets-1 (Wasylyk *et al.*, 1991), Ets-2 (Buttice and Kurkinen, 1993) or PEA-3 (Higashino *et al.*, 1995). Here, we demonstrated that autoinhibited Ets-1 p27 competes with Ets-1 p51 for binding to the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter (Figure 3), demonstrating its dominant-negative effect toward Ets-1 p51 binding (Figure 7b). This competition implicates the formation of an intermediate Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p27 ternary complex, suggesting that both isoforms interact with each other on the EBS palindrome of the *stromelysin-1* promoter. Furthermore, Ets-1 p27 blocks, on the one hand, the transactivation of the *stromelysin-1* promoter induced not only by Ets-1 p51 but also by Ets-2 and PEA-3 (Figure 4). This effect most likely arises owing to the formation of the Ets-1 p27 ternary complex, rendering the EBS inaccessible to other Ets activator factors. On the other hand, Ets-1 p27 blocks the synergistic transactivation of the *collagenase-1* promoter induced by Ets-1 p51 and c-Jun/c-Fos complex (see Supplementary Information, Figure S1). In this context, the dominant-negative effect of Ets-1 p27 may result from its ability to replace Ets-1 p51 in the interaction with its partners (Figure 7b). This is supported by the fact that the interaction of Ets-1 p51 with the AP-1

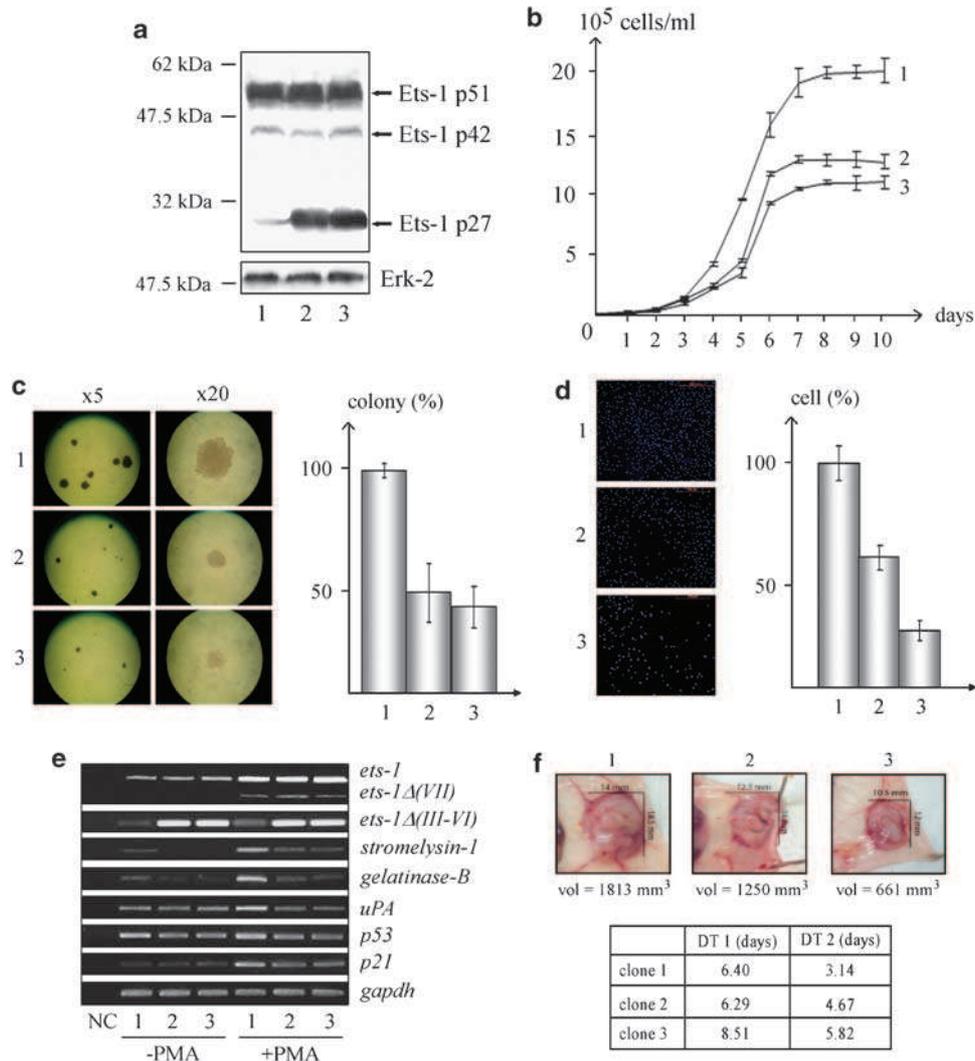


Figure 6 Ets-1 p27 overexpression represses the tumoral properties of MDA-MB-231 cells. **(a)** Western blot analysis of Ets-1 expression in MDA-MB-231 clones stably overexpressing Ets-1 p27. MDA-MB-231 cells stably overexpressing Ets-1 p27 (clone 2, indicated by 2 and clone 3, indicated by 3) and a control without overexpression (clone 1, indicated by 1) were analysed by western blot (30 µg total proteins) using the C-20 anti-Ets-1 and the C-14 anti-Erk-2 (loading control) antibodies. **(b)** Growth assay. MDA-MB-231 clones (20 000 cells per well) were seeded in 12-well plates and counted every 24 h. Results are the average of three experiments performed in triplicate. **(c)** Soft agar colony formation assay. MDA-MB-231 clones (2000 cells per well) were transferred to soft agar plates for incubation. After 2 weeks, the colony numbers were scored with a microscope and photographs were taken with a camera adapted to a microscope at $\times 5$ and $\times 20$ magnifications. Colony numbers were scaled to the colony number of clone 1, used as a reference and set to 100%. Results are the average of three experiments performed in triplicate. **(d)** Invasion assays. MDA-MB-231 clones (50 000 cells per well), added to a medium containing 0.1% fetal bovine serum, were placed in the invasion chamber and allowed to invade over a period of 16 h in an attractive medium containing 5% fetal bovine serum. Cells that had invaded were fixed, stained, scored and photographed through an inverted fluorescence microscope. The invasive cell number of clone 1 was used as a reference and set to 100%. Results are the average of three experiments performed in triplicate. **(e)** Reverse transcription (RT)-PCR analysis of MDA-MB-231 clones treated with or without phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). After 36 h starvation, MDA-MB-231 clones were then incubated for 24 h in a medium containing 1 ng/ml PMA. RNAs of clones treated with or without PMA were then retrotranscribed and cDNAs were amplified by PCR using different primer pairs (see Materials and methods). Amplified PCR products were resolved on an agarose gel stained with ethidium bromide. Amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) with specific primers was used as a loading control and amplification without template as a negative control (NC). **(f)** Xenografts of MDA-MB-231 clones in nude mice. Nude mice were injected subcutaneously in each flank with 10⁶ MDA-MB-231 cells (clones 1, 2 or 3). Two weeks after injection, tumor volume was calculated twice a week for 5–6 weeks. Photographs of representative tumors are shown. The doubling time of tumor volume was calculated for the passage from 100 to 200 mm³ (DT 1) and from 200 to 400 mm³ (DT 2). DT 1 and DT 2 were based on the mean values of tumor volume for each clone.

complex is mediated through the DBD (Dittmer, 2003), which is conserved in the structure of Ets-1 p27. Therefore, Ets-1 p27 may be able to interact with the AP-1 complex on the *collagenase-1* promoter, effectively blocking Ets-1 p51-mediated transactivation.

Interaction with partners is crucial for counteracting Ets-1 p51 autoinhibition and, therefore, for Ets-1 p51 recruitment to target promoters. Given its structure, Ets-1 p27 should conserve Ets-1 p51 partner interactions that are mediated through the inhibitory

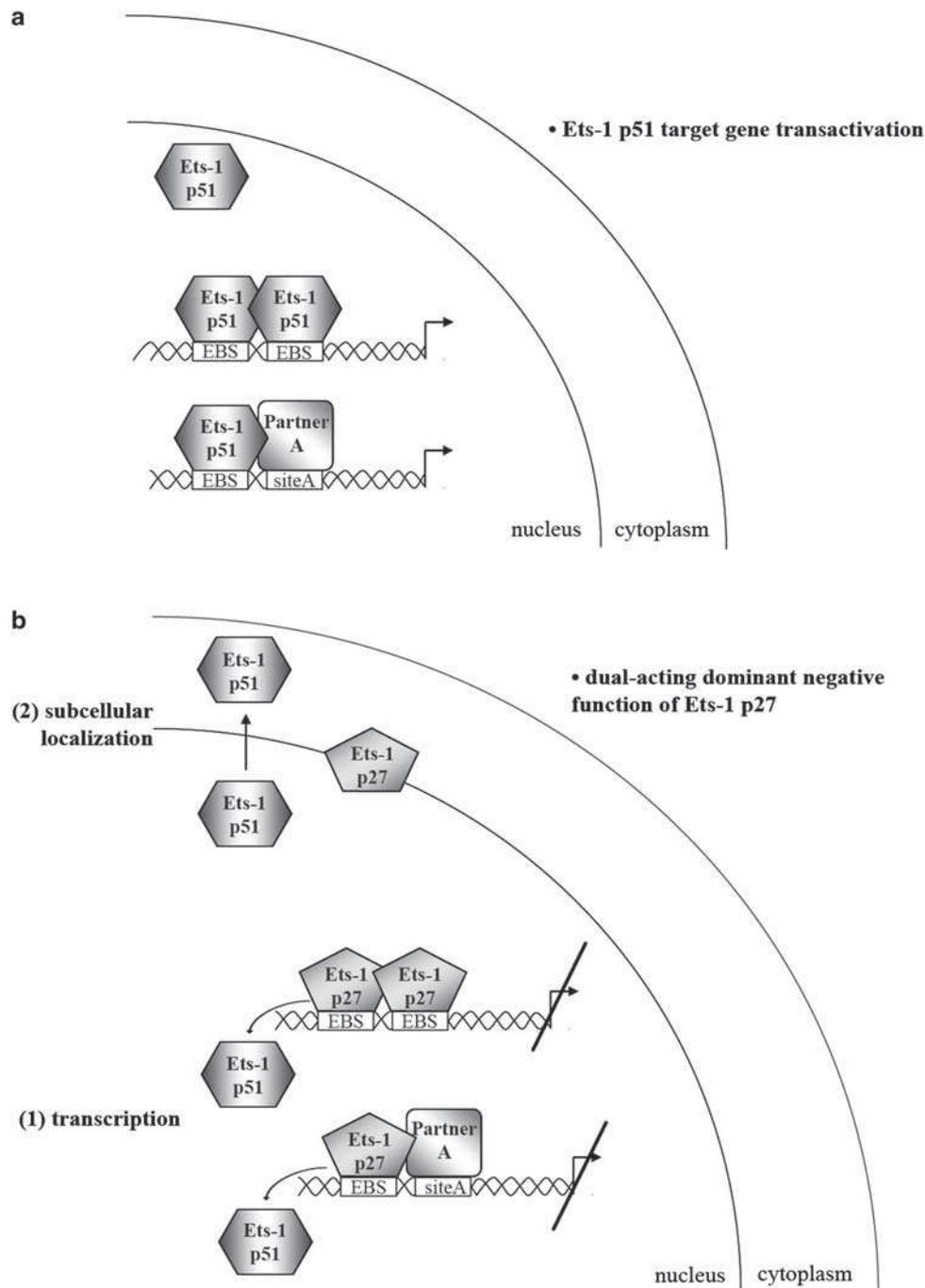


Figure 7 Proposed model for the dual-acting dominant-negative function of Ets-1 p27 on Ets-1 p51. **(a)** Ets-1 p51 target gene transactivation. Owing to its autoinhibition, to bind DNA and activate transcription, the nuclear Ets-1 p51 factor requires target promoters that have either palindromic Ets-binding sites (EBS) spaced by 4 bp to form the Ets-1 p51/DNA/Ets-1 p51 ternary complex or adjacent partner DNA elements to recruit Ets-1 p51 through interaction with partners. **(b)** Dual-acting dominant-negative function of Ets-1 p27. (1) Dominant negative for transcription. Autoinhibited Ets-1 p27 binds DNA the same way as Ets-1 p51 does, and thereby prevents Ets-1 p51 from binding. Nevertheless, due to its lack of the Thr38 residue and the Pointed (PNT) and transactivation (TAD) domains, Ets-1 p27 has no transcriptional effect on the target promoters and effectively blocks Ets-1 p51-mediated transactivation. (2) Dominant negative for subcellular localization. Ets-1 p27 is able to delocalize Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm.

domains and the DBD. However, interactions implicating the PNT and TAD domains are probably abolished. Therefore, Ets-1 p27 may compete with Ets-1 p51 for only some of its target promoters. Furthermore, generation of a novel peptide sequence at the

splicing junction of Ets-1 p27 suggests the existence of different interaction partners and, possibly, different target genes. Thus, Ets-1 p27 may act on selected target promoters, increasing its specificity and efficacy.

In addition to its transcriptional dominant-negative effect, Ets-1 p27 is also shown to be localized (Figure 5): (1) in the nucleus, required for the mediation of its transcriptional properties and (2) in the cytoplasm, leaving the possibilities open as to other functions. As illustrated by our model (Figure 7b), we also demonstrated that Ets-1 p27 has the ability to delocalize Ets-1 p51 from the nucleus to the cytoplasm. Translocation of Ets-1 p51 has been described during the terminal differentiation of erythroid progenitors (Lulli *et al.*, 2006). When localized in the nucleus in these cells, Ets-1 p51 induces the expression of the *GATA-2* gene, which effectively blocks differentiation. Therefore, the delocalization of Ets-1 p51 makes this transcription factor unavailable for the regulation of *GATA-2*. Translocation of Ets-1 p51 has also been described in a study performed on mouse thymocytes (Pognonec *et al.*, 1990). The stimulation of these cells with a calcium ionophore induces the phosphorylation of Ets-1 p51 on the exon-VII-encoded domain, which is then redistributed from the nucleus to the cytoplasm. This phosphorylation also reinforces Ets-1 p51 autoinhibition and, therefore, represses DNA binding (Cowley and Graves, 2000). As Ets-1 p27 conserves the exon-VII-encoded domain, it may also be phosphorylated, thereby repressing DNA binding in response to calcium signaling. In this case, dominant-negative function of Ets-1 p27 may act preferentially through subcellular localization rather than through transcriptional effects. Thus, depending on the cellular signaling pathway, Ets-1 p27 may favor one or the other of its two dominant-negative functions.

Even if Ets-1 is mainly described as a nuclear factor (Kitange *et al.*, 1999; Redlich *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007), other studies have shown a cytoplasmic localization, in particular in breast (Mylona *et al.*, 2006), ovary (Takai *et al.*, 2002) and endometrial (Takai *et al.*, 2000) carcinomas as well as in quiescent endothelial cells (Valter *et al.*, 1999). In these studies, the different isoforms of Ets-1 could not be discriminated. However, we can speculate that the cytoplasmic localization of Ets-1 may correspond to the detection of either delocalized Ets-1 p51 protein or Ets-1 p27 isoform, whose expression may be increased in these situations. In spite of its weak expression, Ets-1 p27 may optimize its dominant-negative function, suggesting that Ets-1 p27 has a real biological effect. Furthermore, Ets-1 p27 may also increase its dominant-negative potential toward Ets-1 p51 through the sequestration of its partners that participate in Ets-1 p51 effects.

The dominant-negative function of Ets-1 p27 toward endogenous Ets-1 p51 is confirmed in the context of the MDA-MB-231 mammary carcinoma cells, because an increase in the Ets-1 p27/Ets-1 p51 ratio represses their tumoral properties (Figure 6). The biological relevance of this effect is supported by the fact that we detected Ets-1 p27 expression *in vivo* in breast adenocarcinomas (Figure 1c). Surprisingly, the Ets-1 p27-encoded variant is highly expressed in fetal lung but not in adult lung (Figure 1d). Therefore, it would be very interesting to assess the expression of Ets-1 p27 in lung carcinoma

explants to determine if it is synthesized in these tumors. Owing to the implication of Ets-1 in various cellular mechanisms, the existence of this dual-acting dominant-negative isoform and its repressor effect on tumor cell properties suggests a determinant effect of the Ets-1 p27/Ets-1 p51 ratio on cell fate.

Materials and methods

Isolation of rabbit and human *ets-1Δ(III-VI)* cDNA

We used the RT-PCR technique to isolate *ets-1Δ(III-VI)* cDNA from HIG-82 and MDA-MB-231 cells. A primer pair flanking the *ets-1* open-reading frame (5'-GCACCAT GAAGGCGGCCGTGG-3' and 5'-CCCCTCCATGTCCA TCACTC-3'; Baillat *et al.*, 2006) was used to amplify *ets-1* cDNAs after reverse transcription. PCR product corresponding to the shorter cDNAs was purified, cloned into pCR Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced. Sequences are available in the GenBank database under accession number EU939724 for the rabbit sequence and AY943926 for the human sequence.

Retroviral infection

Retrovirus production and infection were performed using empty pLPCX (clone 1) or Flag-Ets-1 p27 pLPCX (clones 2 and 3) as previously described (Kherrouche *et al.*, 2006). After infection, MDA-MB-231 cells were selected with 1 μg/ml puromycin for 96 h and routinely cultured in the presence of 500 ng/ml puromycin.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (Baillat *et al.*, 2006) using (1) 30 μg of total cell lysate proteins or (2) 25 μl of total cell lysates in the case of reporter gene assays, which were boiled in Laemmli buffer (50 mM Tris (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Primary antibodies used (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were the C-20 anti-Ets-1, C-20 anti-Ets-2, 16 anti-PEA3, C-14 anti-Erk-2, H-79 anti-cJun and H-125 anti-cFos. The specific anti-Ets-1 p27 was produced (Eurogentec, Angers, France) in rabbit against an immunogen peptide (of the sequence ELFPSPGKLG) designed at the alternative splicing junction.

Electrophoretic mobility shift assay

Double-stranded synthetic oligonucleotides corresponding to the WT and mutants (M1, M2 and M1M2) of the human *stromelysin-1* (-223/-193) promoter region were used to perform EMSA experiments as previously described (Laitem *et al.*, 2008). For probe competition, 400 ng of WT or M1M2 non-labeled probe (800 ×) were added to the reaction mixture. For protein competition, Ets-1 p51 (4 pmol) was incubated with increasing quantity of recombinant Ets-1 p27 (0-15 pmol) with 0.5 ng of WT-labeled probe in the same conditions.

SPR-binding assay

Surface plasmon resonance measurements were carried out using a BIAcore 2000 apparatus (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA), as previously described (Baillat *et al.*, 2002).

See Supplementary Information for Cell culture, RNA extraction and RT-PCR assays, eukaryotic expression vector constructions, bacterial expression vector constructions and recombinant protein production, reporter vector constructions, transient transfection, transfection and reporter gene

assay, immunofluorescence, growth assay, soft agar colony formation assay, invasion assay and xenograft in nude mice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

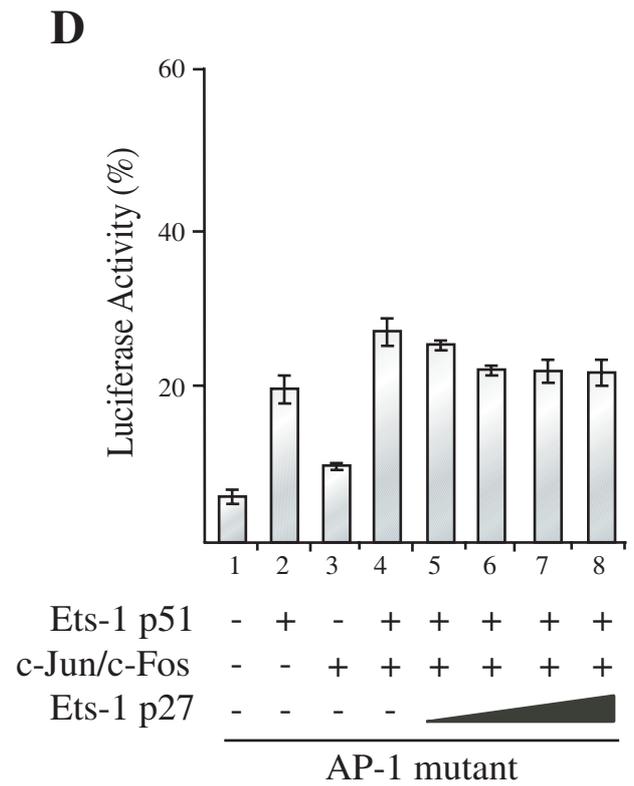
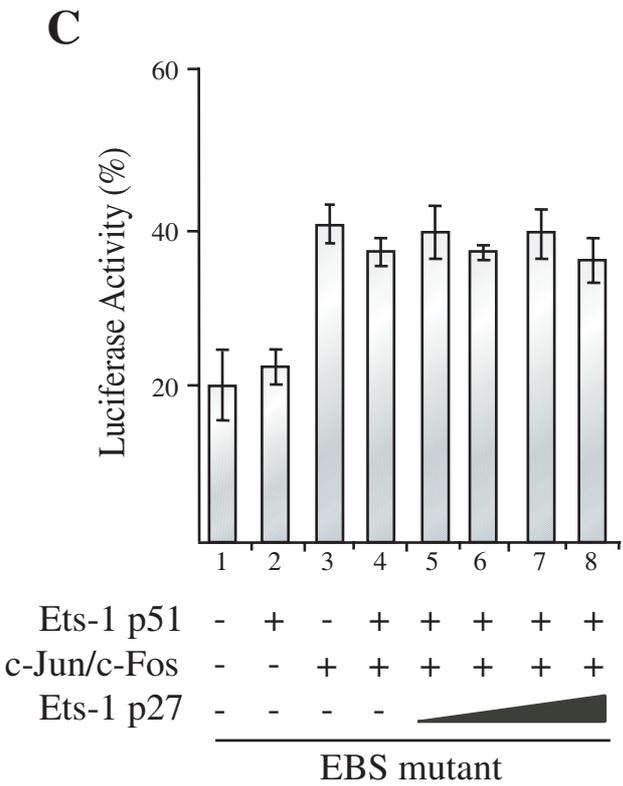
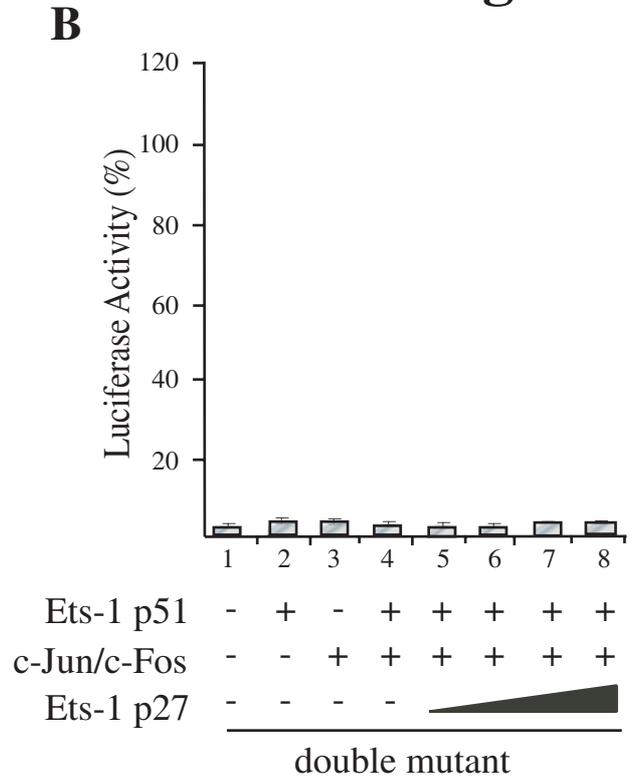
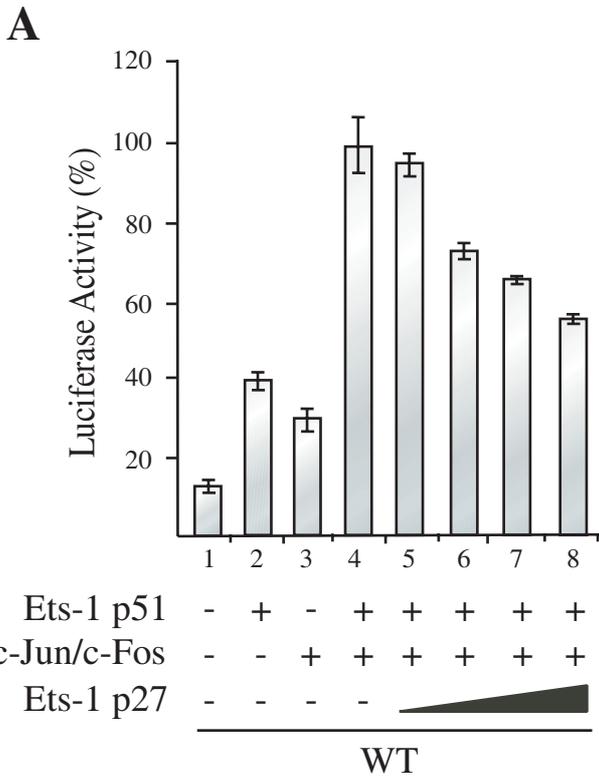
We thank Isabelle Roland, Anne-Claire Flourens, Nathalie Tomavo and Arnaud Legrand for technical assistance, and

References

- Alipov G, Nakayama T, Ito M, Kawai K, Naito S, Nakashima M *et al.* (2005). Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology* **46**: 202–208.
- Araud T, Genoet R, Jaquier-Gubler P, Curran J. (2007). Alternatively spliced isoforms of the human elk-1 mRNA within the 5' UTR: implications for ELK-1 expression. *Nucleic Acids Res* **35**: 4649–4663.
- Baillat D, Begue A, Stehelin D, Aumercier M. (2002). ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* **277**: 29386–29398.
- Baillat D, Laitem C, Leprivier G, Margerin C, Aumercier M. (2009). Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **378**: 213–217.
- Baillat D, Leprivier G, Regnier D, Vintonenko N, Begue A, Stehelin D *et al.* (2006). Stromelysin-1 expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter. *Oncogene* **25**: 5764–5776.
- Buttice G, Kurkinen M. (1993). A polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *J Biol Chem* **268**: 7196–7204.
- Cho JY, Akbarali Y, Zerbin LF, Gu X, Boltax J, Wang Y *et al.* (2004). Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific *blk* gene. *J Biol Chem* **279**: 19512–19522.
- Coutte L, Monte D, Imai K, Pouilly L, Dewitte F, Vidaud M *et al.* (1999). Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human. *Oncogene* **18**: 6278–6286.
- Cowley DO, Graves BJ. (2000). Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* **14**: 366–376.
- De Haro L, Janknecht R. (2005). Cloning of the murine ER71 gene (*Etsrp71*) and initial characterization of its promoter. *Genomics* **85**: 493–502.
- de Nigris F, Mega T, Berger N, Barone MV, Santoro M, Viglietto G *et al.* (2001). Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res* **61**: 2267–2275.
- Dittmer J. (2003). The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**: 29.
- Fisher RJ, Fivash M, Casas-Finet J, Erickson JW, Kondoh A, Bladen SV *et al.* (1994). Real-time DNA binding measurements of the ETS1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci* **3**: 257–266.
- Foulds CE, Nelson ML, Blaszcak AG, Graves BJ. (2004). Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. *Mol Cell Biol* **24**: 10954–10964.
- Hewett PW, Nishi K, Daft EL, Clifford Murray J. (2001). Selective expression of erg isoforms in human endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 347–355.
- Dr Yvan de Launoit for stimulating discussions. We thank the Microscopy Facility of the Institut Pasteur de Lille Campus. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by grants from la Ligue contre le Cancer-Comité du Pas-de-Calais and from the Fondation pour la Recherche Médicale-Comité Nord-Pas-de-Calais (FRM). The Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur provided a student fellowship to Clélia Laitem. La Ligue contre le Cancer provided a student fellowship to Gabriel Leprivier. The CNRS and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais provided a PhD fellowship (BDI) to Souhaila Choul-li.
- Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K. (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* **10**: 1461–1463.
- Higuchi T, Bartel FO, Masuya M, Deguchi T, Henderson KW, Li R *et al.* (2007). Thymomegaly, microsplenias, and defective homeostatic proliferation of peripheral lymphocytes in p51-Ets1 isoform-specific null mice. *Mol Cell Biol* **27**: 3353–3366.
- Jayaraman G, Srinivas R, Duggan C, Ferreira E, Swaminathan S, Somasundaram K *et al.* (1999). p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J Biol Chem* **274**: 17342–17352.
- John SA, Clements JL, Russell LM, Garrett-Sinha LA. (2007). Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem* **283**: 951–962.
- Jorcyk CL, Watson DK, Mavrothalassitis GJ, Papas TS. (1991). The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* **6**: 523–532.
- Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. (2005). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* **20**: 119–126.
- Kherrouche Z, Blais A, Ferreira E, De Launoit Y, Monte D. (2006). ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. *Biochem J* **396**: 547–556.
- Kita D, Takino T, Nakada M, Takahashi T, Yamashita J, Sato H. (2001). Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* **61**: 7985–7991.
- Kitange G, Kishikawa M, Nakayama T, Naito S, Iseki M, Shibata S. (1999). Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors. *Mod Pathol* **12**: 618–626.
- Koizumi S, Fisher RJ, Fujiwara S, Jorcyk C, Bhat NK, Seth A *et al.* (1990). Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**: 675–681.
- Laitem C, Choul-Li S, Baillat D, Begue A, Aumercier M. (2008). Efficient system for biotinylated recombinant Ets-1 production in *Escherichia coli*: a useful tool for studying interactions between Ets-1 and its partners. *Protein Expr Purif* **62**: 53–63.
- Lee GM, Donaldson LW, Pufall MA, Kang HS, Pot I, Graves BJ *et al.* (2005). The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J Biol Chem* **280**: 7088–7099.
- Lei W, Jaramillo RJ, Harrod KS. (2007). Transactivation of lung lysozyme expression by Ets family member ESE-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**: L1359–L1368.
- Li B, Lager J, Wang D, Li D. (2007). Ets-1 participates in and facilitates developmental expression of hypoxia-induced mitogenic factor in mouse lung. *Front Biosci* **12**: 2269–2278.

- Li R, Pei H, Papas T. (1999). The p42 variant of ETS1 protein rescues defective Fas-induced apoptosis in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3876–3881.
- Lulli V, Romania P, Morsilli O, Gabbianelli M, Pagliuca A, Mazzeo S *et al.* (2006). Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ* **13**: 1064–1074.
- Maroulakou IG, Bowe DB. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* **19**: 6432–6442.
- Mylona EE, Alexandrou PT, Giannopoulou IA, Rafailidis PI, Markaki S, Keramopoulos A *et al.* (2006). Study of the topographic distribution of ets-1 protein expression in invasive breast carcinomas in relation to tumor phenotype. *Cancer Detect Prev* **30**: 111–117.
- Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Sekine I. (2001). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* **14**: 415–422.
- O'Leary DA, Koleski D, Kola I, Hertzog PJ, Ristevski S. (2005). Identification and expression analysis of alternative transcripts of the mouse GA-binding protein (Gbp) subunits alpha and beta. *Gene* **344**: 79–92.
- Pognonec P, Boulukos KE, Bosselut R, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Ghysdael J. (1990). Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and *in vitro* DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene* **5**: 603–610.
- Pufall MA, Graves BJ. (2002). Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 421–462.
- Raffetseder U, Wernert N, Ostendorf T, van Roeyen C, Rauen T, Behrens P *et al.* (2004). Mesangial cell expression of proto-oncogene Ets-1 during progression of mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* **66**: 622–632.
- Ray-Gallet D, Tavitian A, Moreau-Gachelin F. (1996). An alternatively spliced isoform of the Spi-B transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 257–263.
- Redlich K, Kiener HP, Schett G, Tohidast-Akrad M, Selzer E, Radda I *et al.* (2001). Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* **44**: 266–274.
- Rowe A, Propst F. (1992). Ets-1 and Ets-2 protooncogene expression in theca cells of the adult mouse ovary. *Exp Cell Res* **202**: 199–202.
- Sarrazin S, Starck J, Gonnet C, Doubeikovski A, Melet F, Morle F. (2000). Negative and translation termination-dependent positive control of FLI-1 protein synthesis by conserved overlapping 5' upstream open reading frames in Fli-1 mRNA. *Mol Cell Biol* **20**: 2959–2969.
- Sasaki K, Nakamura Y, Maki K, Waga K, Nakamura F, Arai H *et al.* (2004). Functional analysis of a dominant-negative DeltaETS TEL/ETV6 isoform. *Biochem Biophys Res Commun* **317**: 1128–1137.
- Seidel JJ, Graves BJ. (2002). An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* **16**: 127–137.
- Shin C, Manley JL. (2004). Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 727–738.
- Smith CW, Valcarcel J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* **25**: 381–388.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D *et al.* (2005). Function of alternative splicing. *Gene* **344**: 1–20.
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. (2000). Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer* **89**: 2059–2067.
- Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. (2002). c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Med* **9**: 287–292.
- Takai N, Ueda T, Narahara H, Miyakawa I. (2006). Expression of c-Ets1 protein in normal human placenta. *Gynecol Obstet Invest* **61**: 15–20.
- Taniguchi H, Fujiwara Y, Doki Y, Sugita Y, Sohma I, Miyata H *et al.* (2007). Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* **121**: 1609–1617.
- Teruyama K, Abe M, Nakano T, Iwasaka-Yagi C, Takahashi S, Yamada S *et al.* (2001). Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **188**: 243–252.
- Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T *et al.* (1999). Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* **59**: 5608–5614.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* **10**: 1127–1134.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)



E



Cell culture

HIG-82 cells were obtained commercially (ATCC, Manassa, VA, CRL-1832) and cultured in F-12 medium (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) between 7 and 14 passages. HEK-293 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen™). MG-63 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen™). Jurkat human acute T-cell leukemia cells were cultured in suspension in RPMI 1640 medium (Invitrogen™) and maintained at a concentration between 1×10^5 and 1×10^6 cells mL^{-1} . MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM (Invitrogen™). All media were supplemented with 10% fetal bovine serum and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ gentamycin. Stably transfected MDA-MB-231 clones were maintained in the same medium supplemented with 500 ng mL^{-1} puromycin (Sigma, St Louis, MO, USA). For PMA-treatment experiments, 50% confluent cells were starved for 36 h in DMEM medium containing 0,1% fetal bovine serum. The medium was then replaced by the same fresh medium supplemented with 1 ng/mL^{-1} PMA (Sigma) followed by a 24h incubation.

RNA extraction and RT-PCR assays

RNAs were extracted from HIG-82, MG-63, MDA-MB-231 cell lines or from breast adenocarcinoma explants after broken with a cap in liquid nitrogen using TRIzol®, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen™). Reverse-transcription was performed with random hexameric oligonucleotides with $1 \mu\text{g}$ of cDNA with the RevertAid™ First Strand cDNA kit (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). PCR reactions were performed with the High Fidelity PCR Master mixture (Roche, Meylan, France) with 50 ng of reverse-transcribed RNAs or with 5 ng cDNAs derived from libraries (normal human mammary tissue PCR Ready First strand cDNA (BioChain®, Hayward, CA, USA); MTC fetal and adult human tissues (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)) and with 125 ng of forward and reverse primers, each: for *ets-1*, 5'-ATGAAGGCGGCCGTCGATCTC-3' (in exon A) and 5'-TTGGTCCACTGCCTGTGTAG-3' (in exon VII); for *ets-1Δ(III-VI)*, 5'-CCTCCCCCGGTAAGCTCGG-3' (at the alternative splicing junction) and 5'-TTGGTCCACTGCCTGTGTAG-3' (in exon VII); for *gapdh*, 5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3' and 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'; for *stromelysin-1*, 5'-GGCCATCTCTTCCTTCAG-3' and 5'-GTCACCTTCTTTGCATTTGG-3'; for *gelatinase-B*, 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3' and 5'-GCCACTTGTCGGCGATAAGG-3'; for *uPA*, 5'-TGCGTCCTGGTCGTGAGCG-3' and 5'-

CAAGCGTGTTCAGCGCTGTAG-3’; for *p53*, 5’-
 CTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCC-3’ and 5’-
 CTCATTCAGCTCTCGGAACATCTCGAAGCG-3’ and for *p21*, 5’-
 GCTGAGCCGCGACTGTGATG-3’ and 5’- CCTGAGCGAGGCACAAGGGT-3’. PCRs
 were run for 29 cycles for *gapdh*, 40 cycles for *ets-1Δ(III-VI)* and 35 cycles for *ets-1* with 30 s
 denaturation at 94°C, 30 s hybridization at 55°C and 30 s elongation at 72°C. Amplified
 products were analyzed on 2% agarose gels run in 0.5X tris-borate ethylenediaminetetraacetic
 acid (TBE) buffer and stained with ethidium bromide.

Eukaryotic expression vector constructions

To produce rabbit and human Ets-1 p27, rabbit or human *ets-1Δ(III-VI)* cDNAs,
 obtained by PCR amplification (using the following primers: 5’-
 ATTTAAAGATCTATGAAGGCGGCCGTCGAT-3’ and 5’-
 TATGCGGCCGCTCACTCGTCGGCATCTGGCTTGAC-3’) were cloned between *Bam*HI
 and *Not*I restriction sites into pcDNA3 expression vector (Invitrogen™). To produce pcDNA3
 vector expressing human Ets-1 p51 fused to a Flag-tag at the 5’ end, human full-length *ets-1*
 cDNA, obtained by PCR amplification (using the following primers: 5’-
 ATTTAAAGATCTAAGGCGGCCGTCGATCTC-3’ and 5’-
 TATGCGGCCGCTCACTCGTCGGCATCTGGCTTGAC-3’), was cloned between the
*Bam*HI and *Not*I restriction sites in a modified pcDNA3 expression vector (kindly provided
 by Dr. D. Monté). This vector contained the coding sequence for a Flag epitope followed by a
*Bam*HI cloning site to yield pcDNA3-Flag-Ets-1 p51. To produce human Ets-1 p27 pEGFP-
 C1 expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA), human *ets-1Δ(III-VI)* cDNA,
 obtained by PCR amplification (using the following primers: 5’-
 ATTTAAAGATCTAAGGCGGCCGTCGAT-3’ and 5’-ATAAATAGATCTCACTCGTCG-
 3’), was cloned in *Bgl*II site of the pEGFP-C1 expression vector. To produce human Flag-Ets-
 1 p27 retroviral pLPCX expression vector, human *ets-1Δ(III-VI)* cDNA, obtained by PCR
 amplification (using the following primers: 5’-
 ATTTAAAGATCTATGAAGGCGGCCGTCGAT-3’ and 5’-
 TATGCGGCCGCTCACTCGTCGGCATCTGGCTTGAC-3’), was cloned between *Bgl*II and
*Not*I sites into the pLPCX vector (Clontech) containing the coding sequence for a Flag
 epitope. For all vectors, correct insertion was checked by sequencing. The pSG5 expressing

human Ets-2 already existed (Wakiya et al., 1996). The pcDNA3-PEA3 was a gift from Dr. D. Monté, the pSG5-cJun and the pSG5-cFos from Dr. M. Duterque-Coquillaud.

Bacterial expression vector constructions and recombinant protein production

Human Ets-1 p27 pTyb2 expression vector (New England Biolabs[®], Ipswich, MA, USA) was obtained in the same way as human Ets-1 p51 as described in (Baillat et al., 2002). Constructs were checked for nucleotide sequence. *Escherichia coli* (ER2566) were transformed with pTyb2 vector expressing human Ets-1 p51 or Ets-1 p27. Protein expression and purification was performed using the T7-Impact System according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs[®]).

Reporter vector constructions

The construction of the -478/+4 wild-type and mutant human *stromelysin-1* promoter pGL3 reporter vectors (Promega, Madison, WI, USA) has already been described (Baillat et al., 2002). Fragment -607/+51 of the wild-type human *collagenase-1* promoter inserted in the reporter vector pGL2 (Promega) (Carrere et al., 1998) was used as a template to generate EBS and AP-1 mutants through PCR. The template was first amplified with a forward mutant primer, 5'-GCTAATCAAGAAAAAGTTATAAAG-3' for the EBS mutant or 5'-GTTATAAAGCAGGAGTCAGACAGCCTCT-3' for the AP-1 mutant and with a 3'-end reverse primer, 5'-TGCCAAGCTTGCCTTTGTCTTCTTTC-3'. The template was then amplified with complementary mutant primers used as a reverse primer and with a 5'-end forward primer, 5'-CTAAGTAAGCTTGCCTCCTGAAAT-3'. The final amplification was performed on the first two PCR products with the 3'-end and 5'-end primers to generate the complete mutant fragment. For the double mutant, the pGL2 vector containing the AP-1 mutant *collagenase-1* promoter was used as a template for mutation of the EBS site by the same way. Correct insertions and mutations were confirmed by sequencing.

Transient transfection

HIG-82 or HEK-293 cells were grown in 6-well plates to reach 60-80 % confluence at the time of transfection. Transient transfection was then performed by incubating the Exgen 500 transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Euromedex, Souffelweyersheim, France) with 1 µg pcDNA3 expression vector, 1 µg rabbit Ets-1 p27 pcDNA3 expression vector (for HIG-82 cells) or 1 µg human Ets-1 p27 pcDNA3 expression vector (for HEK-293 cells). 48 h after transfection, cells were lysed by sonication (10 seconds, 16µm amplitude) in 100 µL of buffer (50 mM Tris pH=8; 150 mM NaCl; 0.1 mM

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche)). Yields were measured by colorimetry (Bio-Rad assay) before Western blot analysis.

Transfection and reporter gene assay

HEK-293 cells were grown in 12-well plates to reach 60-80% confluence at the time of transfection. Transfections were then performed by incubating the Exgen 500 transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Euromedex) with: (i) 200 ng of human *stromelysin-1* promoter pGL3 reporter vector, 100 ng of each human Ets-1 p51 pcDNA3 expression vector, or human Ets-2 pSG5 expression vector or human PEA3 pcDNA3 expression vector, 0-100 ng of human Ets-1 p27 pcDNA3 expression vector, 1,25 ng of pRL-null normalization vector (Promega) and sufficient amount of pUC19 to reach 500 ng of DNA, (ii) 200 ng of human *collagenase-1* promoter pGL2 reporter vector, 100 ng of human Ets-1 p51 pcDNA3 expression vector, 50 ng of human cJun pSG5 expression vector, 50 ng of human cFos pSG5 expression vector, 0-100 ng of human Ets-1 p27 pcDNA3 expression vector, 1,25 ng of pRL-null normalization vector (Promega) and sufficient amount of pUC19 to reach 500 ng of DNA. Cells were harvested 48 h after transfection with 250 μ L of cell lysis buffer (1% Triton X-100, 25 mM glycylglycine, pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA), 1 mM DTT) and each supernatant was sequentially tested for firefly and *renilla* luciferase activity (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega) using a Centro LB 960 (Berthold, Bad Wildbad, Germany). Expression of interest protein was tested by Western blot analysis.

Immunofluorescence

MDA-MB-231 cells, stably expressing Flag-Ets-1 p27 after retroviral infection, were grown on sterile 17 mm glass coverslips precoated with 40 μ g mL⁻¹ poly-L-lysine (Sigma) until they reached 90% confluence. HEK-293 cells were grown in the same conditions until they reached 70% confluence and were then transiently transfected with vectors using Exgen 500 transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Euromedex). In both cases, cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 4 min at room temperature. Cells were then incubated for 30 min at room temperature with rabbit C-20 anti-Ets-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology®) or mouse anti-Flag M2 antibody (Sigma) diluted 1:500 in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.5) containing 1% bovine serum albumin (BSA). After washings, antibody binding was detected with Alexa Fluor® 594 of either goat anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins G

(IgGs) (Invitrogen™) at a 1:500 dilution for 30 min at room temperature in the dark. Nuclei were counterstained with $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) fluorescent dye for 1 min at room temperature. Coverslips were mounted in DAKO Fluorescent Mounting Medium. Fluorescent signals of Alexa Fluor® 594 and EGFP were examined using a Zeiss Axio Imager Z1 microscope.

Growth assay

MDA-MB-231 cells (clones 1, 2 and 3) were seeded in 12-well plates at a density of 20,000 cells per well and incubated at 37°C. Twelve plates were prepared to count cells every 24 h using a Beckman Coulter™ 2Z apparatus.

Soft agar colony formation assay

MDA-MB-231 cells (clones 1, 2 and 3) were seeded in 6-well plates at a density of 2,000 cells per well in a medium containing 0.35% agar overlaid with 0.5% agar. Plates were incubated at 37°C with a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 2 weeks. Colonies were counted using an inverted Leica microscope (Leitz DM IRB). The colony number in the control sample (clone 1) was used as a reference and set to 100%. Pictures were taken with a camera adapted to the microscope (5X and 20X magnifications). Experiments were performed in triplicate and mean values were used.

Invasion assay

MDA-MB-231 cells (clones 1, 2 and 3) were seeded onto the top of the invasion chamber inserts with 8.0 μm pore size and with a reconstituted growth-factor-reduced basement membrane (BD Biosciences), at a density of 50,000 cells per well (24-well format). Cells were stimulated to migrate across the filters by providing 5% fetal bovine serum as a chemoattractant in the assay chambers beneath the inserts. After 16 h incubation at 37°C, non-migratory cells were removed from the top of the filter by scraping. Cells that had migrated through the filter pore to the lower face of the inserts were fixed in methanol, stained with Hoechst and counted. Experiments were performed in triplicate and mean values were used.

Xenograft in Nude mice

MDA-MB-231 clones (1, 2 and 3) (1×10^6 cells) were injected subcutaneously into the flanks of female NU/NU SWISS mice (4 to 5 weeks old, Charles River Laboratories, four mice per group). Tumor dimensions were measured twice a week, and the volume (V , mm^3)

calculated as $V = (L^2 \times W)/6$, where L and W are the length and width of the tumor xenografts, respectively. The doubling times, DT1 and DT2, correspond to the time required for the tumor volume to increase from 100 mm³ to 200 mm³ and from 200 mm³ to 400 mm³, respectively.

Baillat D, Begue A, Stehelin D and Aumercier M. (2002). *Journal of biological chemistry, The*, **277**, 29386-98.

Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D and Duterque-Coquillaud M. (1998). *Oncogene*, **16**, 3261-8.

Wakiya K, Begue A, Stehelin D and Shibuya M. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 30823-8.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A. and Becker, J. W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* **3**, 619-625
- 2 Leprince, D., Duterque-Coquillaud, M., Li, R. P., Henry, C., Flourens, A., Debuire, B. and Stehelin, D. (1988) Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus: implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *J Virol* **62**, 3233-3241
- 3 Radke, K., Beug, H., Kornfeld, S. and Graf, T. (1982) Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene. *Cell* **31**, 643-653
- 4 Souza, L. M., Strommer, J. N., Hillyard, R. L., Komaromy, M. C. and Baluda, M. A. (1980) Cellular sequences are present in the presumptive avian myeloblastosis virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5177-5181
- 5 de Taisne, C., Gegonne, A., Stehelin, D., Bernheim, A. and Berger, R. (1984) Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature* **310**, 581-583
- 6 Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**, 395-397
- 7 Degnan, B. M., Degnan, S. M., Naganuma, T. and Morse, D. E. (1993) The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa. *Nucleic Acids Res* **21**, 3479-3484
- 8 Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D. and Duterque-Coquillaud, M. (1999) Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* **18**, 1351-1359
- 9 Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J. and Papas, T. S. (1992) Genomic dispersal of the ets gene family during metazoan evolution. *Oncogene* **7**, 1713-1719
- 10 Oikawa, T. and Yamada, T. (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **303**, 11-34
- 11 Sharrocks, A. D. (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 827-837
- 12 Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (1996) Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *Embo J* **15**, 125-134
- 13 Sementchenko, V. I. and Watson, D. K. (2000) Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* **19**, 6533-6548
- 14 Mackereth, C. D., Scharpf, M., Gentile, L. N., MacIntosh, S. E., Slupsky, C. M. and McIntosh, L. P. (2004) Diversity in structure and function of the Ets family PNT domains. *J Mol Biol* **342**, 1249-1264
- 15 Fitzsimmons, D., Lutz, R., Wheat, W., Chamberlin, H. M. and Hagman, J. (2001) Highly conserved amino acids in Pax and Ets proteins are required for DNA binding and ternary complex assembly. *Nucleic Acids Res* **29**, 4154-4165
- 16 Tootle, T. L. and Rebay, I. (2005) Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays* **27**, 285-298
- 17 Bellacosa, A., Datta, K., Bear, S. E., Patriotis, C., Lazo, P. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Tsichlis, P. N. (1994) Effects of provirus integration in the Tpl-1/Ets-1 locus in Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: levels of expression, polyadenylation, transcriptional initiation, and differential splicing of the Ets-1 mRNA. *J Virol* **68**, 2320-2330
- 18 Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J. and Papas, T. S. (1991) The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* **6**, 523-532
- 19 Collyn d'Hooghe, M., Galiegue-Zouitina, S., Szymiczek, D., Lantoine, D., Quief, S., Loucheux-Lefebvre, M. H. and Kerckaert, J. P. (1993) Quantitative and qualitative variation of ETS-1 transcripts in hematologic malignancies. *Leukemia* **7**, 1777-1785
- 20 Laitem, C., Leprivier, G., Choul-Li, S., Begue, A., Monte, D., Larsimont, D., Dumont, P., Duterque-Coquillaud, M. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51. *Oncogene* **28**, 2087-2099
- 21 Reddy, E. S. and Rao, V. N. (1988) Structure, expression and alternative splicing of the human c-ets-1 proto-oncogene. *Oncogene Res* **3**, 239-246
- 22 Lionneton, F., Lelievre, E., Baillat, D., Stehelin, D. and Soncin, F. (2003) Characterization and functional analysis of the p42Ets-1 variant of the mouse Ets-1 transcription factor. *Oncogene* **22**, 9156-9164
- 23 Chen, J. H. (1985) The proto-oncogene c-ets is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **5**, 2993-3000

- 24 Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D. and Stehelin, D. (1986) Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1714-1718
- 25 Fujiwara, S., Fisher, R. J., Seth, A., Bhat, N. K., Showalter, S. D., Zweig, M. and Papas, T. S. (1988) Characterization and localization of the products of the human homologs of the v-ets oncogene. *Oncogene* **2**, 99-103
- 26 Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A. and Papas, T. S. (1990) Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**, 675-681
- 27 Pognonec, P., Boulukos, K. E., Bosselut, R., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. M. and Ghysdael, J. (1990) Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and in vitro DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene* **5**, 603-610
- 28 Huang, C. C., Papas, T. S. and Bhat, N. K. (1997) A variant form of ETS1 induces apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene* **15**, 851-856
- 29 Buggy, Y., Maguire, T. M., McGreal, G., McDermott, E., Hill, A. D., O'Higgins, N. and Duffy, M. J. (2004) Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* **91**, 1308-1315
- 30 Ballschmieter, P., Braig, M., Lindemann, R. K., Nordheim, A. and Dittmer, J. (2003) Splicing variant DeltaVII-Ets1 is downregulated in invasive Ets1-expressing breast cancer cells. *Int J Oncol* **22**, 849-853
- 31 Fleischman, L. F., Holtzclaw, L., Russell, J. T., Mavrothalassitis, G. and Fisher, R. J. (1995) ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. *Mol Cell Biol* **15**, 925-931
- 32 Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (1996) Structural coupling of the inhibitory regions flanking the ETS domain of murine Ets-1. *Protein Sci* **5**, 296-309
- 33 Garvie, C. W., Hagman, J. and Wolberger, C. (2001) Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol Cell* **8**, 1267-1276
- 34 Werner, M. H., Clore, G. M., Fisher, C. L., Fisher, R. J., Trinh, L., Shiloach, J. and Gronenborn, A. M. (1997) Correction of the NMR structure of the ETS1/DNA complex. *J Biomol NMR* **10**, 317-328
- 35 Liang, H., Mao, X., Olejniczak, E. T., Nettesheim, D. G., Yu, L., Meadows, R. P., Thompson, C. B. and Fesik, S. W. (1994) Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. *Nat Struct Biol* **1**, 871-875
- 36 Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C. Z., Piccialli, G., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R. A. and Ely, K. R. (1996) A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature* **380**, 456-460
- 37 Batchelor, A. H., Piper, D. E., de la Brousse, F. C., McKnight, S. L. and Wolberger, C. (1998) The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* **279**, 1037-1041
- 38 Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K. and Marmorstein, R. (1998) Structures of SAP-1 bound to DNA targets from the E74 and c-fos promoters: insights into DNA sequence discrimination by Ets proteins. *Mol Cell* **2**, 201-212
- 39 Wang, Y., Feng, L., Said, M., Balderman, S., Fayazi, Z., Liu, Y., Ghosh, D. and Gulick, A. M. (2005) Analysis of the 2.0 Å crystal structure of the protein-DNA complex of the human PDEF Ets domain bound to the prostate specific antigen regulatory site. *Biochemistry* **44**, 7095-7106
- 40 Goroncy, A., Kigawa, T., Koshiha, S., Kobayashi, N., Tochio, N., Inoue, M., Yokoyama, S. (2006) Solution structure of the ETS-domain of the Ets domain transcription factor. En préparation. (**PDB : 1WXX**)
- 41 Gajiwala, K. S. and Burley, S. K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 110-116
- 42 Qiao, F. and Bowie, J. U. (2005) The many faces of SAM. *Sci STKE* **2005**, re7
- 43 Slupsky, C. M., Gentile, L. N., Donaldson, L. W., Mackereth, C. D., Seidel, J. J., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (1998) Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12129-12134
- 44 Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157
- 45 Seidel, J. J. and Graves, B. J. (2002) An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes and development* **16**, 127-137
- 46 Carrere, S., Verger, A., Flourens, A., Stehelin, D. and Dutertre-Coquillaud, M. (1998) Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* **16**, 3261-3268
- 47 Abramczyk, O., Rainey, M. A., Barnes, R., Martin, L. and Dalby, K. N. (2007) Expanding the repertoire of an ERK2 recruitment site: cysteine footprinting identifies the D-recruitment site as a mediator of Ets-1 binding. *Biochemistry* **46**, 9174-9186

- 48 Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M. and Ghysdael, J. (1992) Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein. *New Biol* **4**, 512-519
- 49 Garnier, J., Gibrat, J. F. and Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* **266**, 540-553
- 50 Mitchell, P. J. and Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-378
- 51 Augustijn, K. D., Duval, D. L., Wechselberger, R., Kaptein, R., Gutierrez-Hartmann, A. and van der Vliet, P. C. (2002) Structural characterization of the PIT-1/ETS-1 interaction: PIT-1 phosphorylation regulates PIT-1/ETS-1 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12657-12662
- 52 Bradford, A. P., Wasylyk, C., Wasylyk, B. and Gutierrez-Hartmann, A. (1997) Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Molecular and cellular biology* **17**, 1065-1074
- 53 Garvie, C. W., Pufall, M. A., Graves, B. J. and Wolberger, C. (2002) Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships. *J Biol Chem* **277**, 45529-45536
- 54 Lee, G. M., Donaldson, L. W., Pufall, M. A., Kang, H. S., Pot, I., Graves, B. J. and McIntosh, L. P. (2005) The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J Biol Chem* **280**, 7088-7099
- 55 Cowley, D. O. and Graves, B. J. (2000) Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes and development* **14**, 366-376
- 56 Hagman, J. and Grosschedl, R. (1992) An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8889-8893
- 57 Lim, F., Kraut, N., Framptom, J. and Graf, T. (1992) DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intramolecular mechanism. *Embo J* **11**, 643-652
- 58 Jonsen, M. D., Petersen, J. M., Xu, Q. P. and Graves, B. J. (1996) Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Mol Cell Biol* **16**, 2065-2073
- 59 Pufall, M. A. and Graves, B. J. (2002) Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 421-462
- 60 Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* **21**, 2309-2319
- 61 Pufall, M. A., Lee, G. M., Nelson, M. L., Kang, H. S., Velyvis, A., Kay, L. E., McIntosh, L. P. and Graves, B. J. (2005) Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science* **309**, 142-145
- 62 Rabault, B. and Ghysdael, J. (1994) Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem* **269**, 28143-28151
- 63 Vetter, M., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Manns, J., Wesselborg, S., Thomssen, C. and Dittmer, J. (2005) Ets1 is an effector of protein kinase Calpha in cancer cells. *Oncogene* **24**, 650-661
- 64 Grenningloh, R., Miaw, S. C., Moisan, J., Graves, B. J. and Ho, I. C. (2008) Role of Ets-1 phosphorylation in the effector function of Th cells. *Eur J Immunol* **38**, 1700-1705
- 65 Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. and Owerbach, D. (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**, 27233-27238
- 66 Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12
- 67 Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T. (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**, 12654-12659
- 68 Gill, G. (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-2059
- 69 Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533
- 70 Wilson, V. G. and Heaton, P. R. (2008) Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO. *Expert Rev Proteomics* **5**, 121-135
- 71 Guo, B., Yang, S. H., Witty, J. and Sharrocks, A. D. (2007) Signalling pathways and the regulation of SUMO modification. *Biochem Soc Trans* **35**, 1414-1418
- 72 Ji, Z., Degerny, C., Vintonenko, N., Deheuninck, J., Foveau, B., Leroy, C., Coll, J., Tulasne, D., Baert, J. L. and Fafeur, V. (2007) Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitylation. *Oncogene* **26**, 395-406
- 73 Nishida, T., Terashima, M. and Fukami, K. (2006) PIASy-mediated repression of the Ets-1 is independent of its sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1536-1546

- 74 Macauley, M. S., Errington, W. J., Scharpf, M., Mackereth, C. D., Blaszcak, A. G., Graves, B. J. and
McIntosh, L. P. (2006) Beads-on-a-string, characterization of ETS-1 sumoylated within its flexible N-
terminal sequence. *J Biol Chem* **281**, 4164-4172
- 75 Hahn, S. L., Wasylyk, B. and Criqui-Filipe, P. (1997) Modulation of ETS-1 transcriptional activity by
huUBC9, a ubiquitin-conjugating enzyme. *Oncogene* **15**, 1489-1495
- 76 Nishida, T., Terashima, M., Fukami, K. and Yamada, Y. (2007) PIASy controls ubiquitination-
dependent proteasomal degradation of Ets-1. *Biochem J* **405**, 481-488
- 77 Gill, G. (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 536-541
- 78 Kalkhoven, E. (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**, 1145-1155
- 79 Czuwara-Ladykowska, J., Sementchenko, V. I., Watson, D. K. and Trojanowska, M. (2002) Ets1 is an
effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the
profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem* **277**, 20399-20408
- 80 Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D. and Graves, B. J. (1992) Interaction of murine
ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes and
development* **6**, 975-990
- 81 Choi, Y. S. and Sinha, S. (2006) Determination of the consensus DNA-binding sequence and a
transcriptional activation domain for ESE-2. *Biochem J* **398**, 497-507
- 82 Graves, B. J. and Petersen, J. M. (1998) Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv
Cancer Res* **75**, 1-55
- 83 Klemsz, M. J., Maki, R. A., Papayannopoulou, T., Moore, J. and Hromas, R. (1993) Characterization of
the ets oncogene family member, fli-1. *J Biol Chem* **268**, 5769-5773
- 84 Szymczyna, B. R. and Arrowsmith, C. H. (2000) DNA binding specificity studies of four ETS proteins
support an indirect read-out mechanism of protein-DNA recognition. *J Biol Chem* **275**, 28363-28370
- 85 Bosselut, R., Levin, J., Adjadj, E. and Ghysdael, J. (1993) A single amino-acid substitution in the Ets
domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and
E74. *Nucleic Acids Res* **21**, 5184-5191
- 86 Hollenhorst, P. C., Shah, A. A., Hopkins, C. and Graves, B. J. (2007) Genome-wide analyses reveal
properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev* **21**,
1882-1894
- 87 Nelsen, B., Tian, G., Erman, B., Gregoire, J., Maki, R., Graves, B. and Sen, R. (1993) Regulation of
lymphoid-specific immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science*
261, 82-86
- 88 John, S., Marais, R., Child, R., Light, Y. and Leonard, W. J. (1996) Importance of low affinity Elf-1
sites in the regulation of lymphoid-specific inducible gene expression. *J Exp Med* **183**, 743-750
- 89 Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K. and Marmorstein, R. (2000) Structure of the elk-1-DNA complex
reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA. *Nat Struct Biol* **7**, 292-297
- 90 von Hippel, P. H. (1994) Protein-DNA recognition: new perspectives and underlying themes. *Science*
263, 769-770
- 91 Lee, G. M., Donaldson, L. W., Pufall, M. A., Kang, H. S., Pot, I., Graves, B. J. and McIntosh, L. P.
(2005) The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J Biol Chem* **280**, 7088-
7099
- 92 Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T. and Graves, B. J. (1995)
Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix.
Science **269**, 1866-1869
- 93 Myszka, D. G., Jonsen, M. D. and Graves, B. J. (1998) Equilibrium analysis of high affinity interactions
using BIACORE. *Anal Biochem* **265**, 326-330
- 94 Wang, H., McIntosh, L. P. and Graves, B. J. (2002) Inhibitory module of Ets-1 allosterically regulates
DNA binding through a dipole-facilitated phosphate contact. *J Biol Chem* **277**, 2225-2233
- 95 Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T. and Ito, Y. (1999) Mutual
activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains.
EMBO journal, The **18**, 1609-1620
- 96 Dickinson, L. A., Trauger, J. W., Baird, E. E., Dervan, P. B., Graves, B. J. and Gottesfeld, J. M. (1999)
Inhibition of Ets-1 DNA binding and ternary complex formation between Ets-1, NF-kappaB, and DNA
by a designed DNA-binding ligand. *J Biol Chem* **274**, 12765-12773
- 97 Tian, G., Erman, B., Ishii, H., Gangopadhyay, S. S. and Sen, R. (1999) Transcriptional activation by
ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* **19**,
2946-2957
- 98 Wheat, W., Fitzsimmons, D., Lennox, H., Krautkramer, S. R., Gentile, L. N., McIntosh, L. P. and
Hagman, J. (1999) The highly conserved beta-hairpin of the paired DNA-binding domain is required for
assembly of Pax-Ets ternary complexes. *Mol Cell Biol* **19**, 2231-2241

- 99 Fitzsimmons, D., Lukin, K., Lutz, R., Garvie, C. W., Wolberger, C. and Hagman, J. (2009) Highly cooperative recruitment of Ets-1 and release of autoinhibition by Pax5. *J Mol Biol* **392**, 452-464
- 100 Gu, T. L., Goetz, T. L., Graves, B. J. and Speck, N. A. (2000) Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Mol Cell Biol* **20**, 91-103
- 101 Sun, W., Graves, B. J. and Speck, N. A. (1995) Transactivation of the Moloney murine leukemia virus and T-cell receptor beta-chain enhancers by cbf and ets requires intact binding sites for both proteins. *J Virol* **69**, 4941-4949
- 102 Goetz, T. L., Gu, T. L., Speck, N. A. and Graves, B. J. (2000) Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2. *Mol Cell Biol* **20**, 81-90
- 103 Goetz, T. L., Gu, T. L., Speck, N. A. and Graves, B. J. (2000) Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2. *Mol Cell Biol* **20**, 81-90
- 104 Buttice, G. and Kurkinen, M. (1993) A polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *J Biol Chem* **268**, 7196-7204
- 105 Wasyluk, C., Gutman, A., Nicholson, R. and Wasyluk, B. (1991) The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J* **10**, 1127-1134
- 106 Venanzoni, M. C., Robinson, L. R., Hodge, D. R., Kola, I. and Seth, A. (1996) ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene* **12**, 1199-1204
- 107 Baillat, D., Begue, A., Stehelin, D. and Aumercier, M. (2002) ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* **277**, 29386-29398
- 108 Baillat, D., Leprivier, G., Regnier, D., Vintonenko, N., Begue, A., Stehelin, D. and Aumercier, M. (2006) Stromelysin-1 expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter. *Oncogene* **25**, 5764-5776
- 109 Lamber, E. P., Vanhille, L., Textor, L. C., Kachalova, G. S., Sieweke, M. H. and Wilmanns, M. (2008) Regulation of the transcription factor Ets-1 by DNA-mediated homo-dimerization. *Embo J* **27**, 2006-2017
- 110 Leprivier, G., Baillat, D., Begue, A., Hartmann, B. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 p51 and p42 isoforms differentially modulate Stromelysin-1 promoter according to induced DNA bend orientation. *Nucleic Acids Res*
- 111 Baillat, D., Laitem, C., Leprivier, G., Margerin, C. and Aumercier, M. (2009) Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 213-217
- 112 Xu, D., Wilson, T. J., Chan, D., De-Luca, E., Zhou, J., Hertzog, P. J. and Kola, I. (2002) Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. *EMBO journal*, The **21**, 4081-4093
- 113 Fisher, R. J., Fivash, M., Casas-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K. and Papas, T. (1994) Real-time DNA binding measurements of the ETS1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci* **3**, 257-266
- 114 Wasyluk, C., Kerckaert, J. P. and Wasyluk, B. (1992) A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev* **6**, 965-974
- 115 Pei, H., Li, C., Adereth, Y., Hsu, T., Watson, D. K. and Li, R. (2005) Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis. *Cancer Res* **65**, 7205-7213
- 116 Majerus, M. A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J. B., Wasyluk, B. and Bailleul, B. (1992) Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res* **20**, 2699-2703
- 117 Oka, T., Rairkar, A. and Chen, J. H. (1991) Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the ets-1 gene. *Oncogene* **6**, 2077-2083
- 118 Wilson, L. A., Gemin, A., Espiritu, R. and Singh, G. (2005) ets-1 is transcriptionally up-regulated by H2O2 via an antioxidant response element. *Faseb J* **19**, 2085-2087
- 119 Nakazawa, Y., Suzuki, M., Manabe, N., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Tenen, D. G., Iwama, A., Mochizuki, M. and Oikawa, T. (2007) Cooperative interaction between ETS1 and GFI1 transcription factors in the repression of Bax gene expression. *Oncogene* **26**, 3541-3550
- 120 Chen, J. H. and Wright, C. D. (1993) PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter. *Oncogene* **8**, 3375-3383
- 121 Barrett, J. M., Puglia, M. A., Singh, G. and Tozer, R. G. (2002) Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **72**, 227-232

- 122 Naito, S., Shimizu, S., Maeda, S., Wang, J., Paul, R. and Fagin, J. A. (1998) Ets-1 is an early response
gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **274**, C472-480
- 123 Wang, D. Y., Yang, V. C. and Chen, J. K. (1997) Oxidized LDL inhibits vascular endothelial cell
morphogenesis in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **33**, 248-255
- 124 Chen, J. H., Jeha, S. and Oka, T. (1993) Negative regulatory elements in the human ETS1 gene
promoter. *Oncogene* **8**, 133-139
- 125 Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. and Bonavida, B. (2006) Transcription factor YY1: structure,
function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**, 1125-1142
- 126 Iotsova, V., Crepieux, P., Montpellier, C., Laudet, V. and Stehelin, D. (1996) TATA-less promoters of
some Ets-family genes are efficiently repressed by wild-type p53. *Oncogene* **13**, 2331-2337
- 127 Vary, C. P., Li, V., Raouf, A., Kitching, R., Kola, I., Franceschi, C., Venanzoni, M. and Seth, A. (2000)
Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix
mineralization. *Exp Cell Res* **257**, 213-222
- 128 Raouf, A. and Seth, A. (2000) Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene* **19**, 6455-
6463
- 129 Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S. and
Fujinaga, K. (1998) The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-
associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* **77**,
128-137
- 130 Ohnishi, Y., Lieger, O., Attygalla, M., Iizuka, T. and Kakudo, K. (2008) Effects of epidermal growth
factor on the invasion activity of the oral cancer cell lines HSC3 and SAS. *Oral Oncol*
- 131 Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M. and Sato, Y. (1996) Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the
expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration
of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **169**, 522-531
- 132 Gilles, F., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandenbunder, B. and Fafeur, V. (1996) The c-ets-1 proto-
oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in
human fibroblasts. *Exp Cell Res* **222**, 370-378
- 133 Zeng, L., Liu, Y. P., Tao, Y. G., Ai, M. D., Zhao, X. R. and Cao, Y. (2005) [Cross-talk between c-
Jun/Ets1 involved in EB virus-encoded latent membrane protein 1 regulates expression of matrix
metalloproteinase-9 in nasopharyngeal carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **27**, 204-208
- 134 Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X.
and Vandenbunder, B. (1997) The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-
mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK
epithelial cells. *Cell Growth Differ* **8**, 655-665
- 135 Tanaka, K., Abe, M. and Sato, Y. (1999) Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38
mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in
endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* **90**, 647-654
- 136 Watanabe, D., Takagi, H., Suzuma, K., Suzuma, I., Oh, H., Ohashi, H., Kemmochi, S., Uemura, A.,
Ojima, T., Suganami, E., Miyamoto, N., Sato, Y. and Honda, Y. (2004) Transcription factor Ets-1
mediates ischemia- and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization. *Am J
Pathol* **164**, 1827-1835
- 137 Naito, T., Tanihata, Y., Nishimura, H., Tanaka, T., Higuchi, C., Taguchi, T. and Sanaka, T. (2005)
Expression of matrix metalloproteinase-9 associated with ets-1 proto-oncogene in rat tubulointerstitial
cells. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 2333-2348
- 138 Goetze, S., Kintscher, U., Kaneshiro, K., Meehan, W. P., Collins, A., Fleck, E., Hsueh, W. A. and Law,
R. E. (2001) TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular
lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* **159**, 93-101
- 139 Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Mostarica-Stojkovic, M. and Andjelkovic, A. V. (2006) CCL2 regulates
angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J Immunol* **177**, 2651-2661
- 140 Naito, S., Shimizu, S., Matsuu, M., Nakashima, M., Nakayama, T., Yamashita, S. and Sekine, I. (2002)
Ets-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in
vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 130-138
- 141 Znoyko, I., Trojanowska, M. and Reuben, A. (2006) Collagen binding alpha2beta1 and alpha1beta1
integrins play contrasting roles in regulation of Ets-1 expression in human liver myofibroblasts. *Mol
Cell Biochem* **282**, 89-99
- 142 Lincoln, D. W., 2nd, Phillips, P. G. and Bove, K. (2003) Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary
formation in an in vitro tumor angiogenesis model. *Breast Cancer Res Treat* **78**, 167-178
- 143 Pearse, D. D., Tian, R. X., Nigro, J., Iorgulescu, J. B., Puzis, L. and Jaimes, E. A. (2008) Angiotensin II
increases the expression of the transcription factor ETS-1 in mesangial cells. *Am J Physiol Renal
Physiol* **294**, F1094-1100

- 144 Shimizu, S., Kageyama, M., Yasuda, M., Sasaki, D., Naito, S., Yamamoto, T. and Kiuchi, Y. (2004) Stimulation of in vitro angiogenesis by nitric oxide through the induction of transcription factor ETS-1. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 114-122
- 145 Ogawa, D., Nomiyama, T., Nakamachi, T., Heywood, E. B., Stone, J. F., Berger, J. P., Law, R. E. and Bruemmer, D. (2006) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **98**, e50-59
- 146 Goetze, S., Kintscher, U., Kim, S., Meehan, W. P., Kaneshiro, K., Collins, A. R., Fleck, E., Hsueh, W. A. and Law, R. E. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**, 909-921
- 147 Igarashi, T., Abe, M., Oikawa, M., Nukiwa, T. and Sato, Y. (2001) Retinoic acids repress the expression of ETS-1 in endothelial cells. *Tohoku J Exp Med* **194**, 35-43
- 148 Schroen, D. J. and Brinckerhoff, C. E. (1996) Inhibition of rabbit collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) transcription by retinoid receptors: evidence for binding of RARs/RXRs to the -77 AP-1 site through interactions with c-Jun. *J Cell Physiol* **169**, 320-332
- 149 Higuchi, T., Bartel, F. O., Masuya, M., Deguchi, T., Henderson, K. W., Li, R., Muise-Helmericks, R. C., Kern, M. J., Watson, D. K. and Spyropoulos, D. D. (2007) Thymomegaly, microsplenias, and defective homeostatic proliferation of peripheral lymphocytes in p51-Ets1 isoform-specific null mice. *Molecular and cellular biology* **27**, 3353-3366
- 150 Wai, P. Y., Mi, Z., Gao, C., Guo, H., Marroquin, C. and Kuo, P. C. (2006) Ets-1 and runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **281**, 18973-18982
- 151 Kitange, G., Kishikawa, M., Nakayama, T., Naito, S., Iseki, M. and Shibata, S. (1999) Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors. *Mod Pathol* **12**, 618-626
- 152 Redlich, K., Kiener, H. P., Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Selzer, E., Radda, I., Stummvoll, G. H., Steiner, C. W., Groger, M., Bitzan, P., Zenz, P., Smolen, J. S. and Steiner, G. (2001) Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis and rheumatism* **44**, 266-274
- 153 Lulli, V., Romania, P., Morsilli, O., Gabbianelli, M., Pagliuca, A., Mazzeo, S., Testa, U., Peschle, C. and Marziali, G. (2006) Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ* **13**, 1064-1074
- 154 Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D. (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-4628
- 155 Zhang, W. and Liu, H. T. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**, 9-18
- 156 Dalle, S., Martin-Denavit, T. and Thomas, L. (2006) [Genotypic hypervariability of melanoma: a therapeutic challenge]. *Med Sci (Paris)* **22**, 178-182
- 157 Yordy, J. S. and Muise-Helmericks, R. C. (2000) Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* **19**, 6503-6513
- 158 Galang, C. K., Der, C. J. and Hauser, C. A. (1994) Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* **9**, 2913-2921
- 159 Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-193
- 160 Bradford, A. P., Conrad, K. E., Tran, P. H., Ostrowski, M. C. and Gutierrez-Hartmann, A. (1996) GHF-1/Pit-1 functions as a cell-specific integrator of Ras signaling by targeting the Ras pathway to a composite Ets-1/GHF-1 response element. *J Biol Chem* **271**, 24639-24648
- 161 Bradford, A. P., Conrad, K. E., Wasylyk, C., Wasylyk, B. and Gutierrez-Hartmann, A. (1995) Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain. *Mol Cell Biol* **15**, 2849-2857
- 162 Foulds, C. E., Nelson, M. L., Blaszcak, A. G. and Graves, B. J. (2004) Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 Recruitment. *Molecular and cellular biology* **24**, 10954-10964
- 163 Jayaraman, G., Srinivas, R., Duggan, C., Ferreira, E., Swaminathan, S., Somasundaram, K., Williams, J., Hauser, C., Kurkinen, M., Dhar, R., Weitzman, S., Buttice, G. and Thimmapaya, B. (1999) p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J Biol Chem* **274**, 17342-17352
- 164 Carafoli, E. (2004) Calcium signaling: a historical account. *Biol Res* **37**, 497-505

- 165 Fink, C. C. and Meyer, T. (2002) Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 293-299
- 166 Bayer, K. U. and Schulman, H. (2001) Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 917-923
- 167 Valentine, M. A., Czernik, A. J., Rachie, N., Hidaka, H., Fisher, C. L., Cambier, J. C. and Bomsztyk, K. (1995) Anti-immunoglobulin M activates nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human B lymphocytes. *J Exp Med* **182**, 1943-1949
- 168 Dittmer, J. (2003) The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**, 29
- 169 Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R. and Grosschedl, R. (1995) Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* **9**, 995-1008
- 170 Eyquem, S., Chemin, K., Fasseu, M. and Bories, J. C. (2004) The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15712-15717
- 171 Tanaka, H., Terada, Y., Kobayashi, T., Okado, T., Inoshita, S., Kuwahara, M., Seth, A., Sato, Y. and Sasaki, S. (2004) Expression and function of Ets-1 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* **15**, 3083-3092
- 172 Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y. and Fukamizu, A. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* **19**, 519-527
- 173 Le Bras, A., Lionneton, F., Mattot, V., Lelievre, E., Caetano, B., Spruyt, N. and Soncin, F. (2007) HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene* **26**, 7480-7489
- 174 Schweppe, R. E. and Gutierrez-Hartmann, A. (2001) Pituitary Ets-1 and GABP bind to the growth factor regulatory sites of the rat prolactin promoter. *Nucleic Acids Res* **29**, 1251-1260
- 175 Bassuk, A. G. and Leiden, J. M. (1995) A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* **3**, 223-237
- 176 Westermarck, J., Seth, A. and Kahari, V. M. (1997) Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* **14**, 2651-2660
- 177 Logan, S. K., Garabedian, M. J., Campbell, C. E. and Werb, Z. (1996) Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J Biol Chem* **271**, 774-782
- 178 Maier, H., Colbert, J., Fitzsimmons, D., Clark, D. R. and Hagman, J. (2003) Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. *Mol Cell Biol* **23**, 1946-1960
- 179 Maier, H., Ostraat, R., Parenti, S., Fitzsimmons, D., Abraham, L. J., Garvie, C. W. and Hagman, J. (2003) Requirements for selective recruitment of Ets proteins and activation of mb-1/Ig-alpha gene transcription by Pax-5 (BSAP). *Nucleic Acids Res* **31**, 5483-5489
- 180 Bassuk, A. G., Anandappa, R. T. and Leiden, J. M. (1997) Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *Journal of virology* **71**, 3563-3573
- 181 McNagny, K. M., Sieweke, M. H., Doderlein, G., Graf, T. and Nerlov, C. (1998) Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *Embo J* **17**, 3669-3680
- 182 Dittmer, J., Gitlin, S. D., Reid, R. L. and Brady, J. N. (1993) Transactivation of the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein by human T-cell lymphotropic virus type I Tax1: evidence for the involvement of transcription factor Ets1. *J Virol* **67**, 6087-6095
- 183 Dittmer, J., Pise-Masison, C. A., Clemens, K. E., Choi, K. S. and Brady, J. N. (1997) Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHrP P2 promoter. *J Biol Chem* **272**, 4953-4958
- 184 Kavurma, M. M., Bobryshev, Y. and Khachigian, L. M. (2002) Ets-1 positively regulates Fas ligand transcription via cooperative interactions with Sp1. *J Biol Chem* **277**, 36244-36252
- 185 Dittmer, J., Gegonne, A., Gitlin, S. D., Ghysdael, J. and Brady, J. N. (1994) Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem* **269**, 21428-21434
- 186 Gegonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A. and Ghysdael, J. (1993) Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *Embo J* **12**, 1169-1178
- 187 Han, B., Liu, N., Yang, X., Sun, H. B. and Yang, Y. C. (2001) MRG1 expression in fibroblasts is regulated by Sp1/Sp3 and an Ets transcription factor. *J Biol Chem* **276**, 7937-7942

- 188 Tolon, R. M., Castillo, A. I., Jimenez-Lara, A. M. and Aranda, A. (2000) Association with Ets-1 causes ligand- and AF2-independent activation of nuclear receptors. *Molecular and cellular biology* **20**, 8793-8802
- 189 Massie, C. E., Adryan, B., Barbosa-Morais, N. L., Lynch, A. G., Tran, M. G., Neal, D. E. and Mills, I. G. (2007) New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO Rep* **8**, 871-878
- 190 Sampath, J., Sun, D., Kidd, V. J., Grenet, J., Gandhi, A., Shapiro, L. H., Wang, Q., Zambetti, G. P. and Schuetz, J. D. (2001) Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* **276**, 39359-39367
- 191 Kagoshima, H., Shigesada, K., Satake, M., Ito, Y., Miyoshi, H., Ohki, M., Pepling, M. and Gergen, P. (1993) The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* **9**, 338-341
- 192 Kappel, A., Schlaeger, T. M., Flamme, I., Orkin, S. H., Risau, W. and Breier, G. (2000) Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* **96**, 3078-3085
- 193 Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. and Flamme, I. (2003) Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* **278**, 7520-7530
- 194 Brar, A. K., Kessler, C. A. and Handwerger, S. (2002) An Ets motif in the proximal decidual prolactin promoter is essential for basal gene expression. *J Mol Endocrinol* **29**, 99-112
- 195 Tentler, J. J., Bradford, A. P., Schweppe, R. E. and Gutierrez-Hartmann, A. (2003) Selective repression of rat prolactin gene by stable expression of dominant-negative Ets in GH4 pituitary cells. *Endocrine* **20**, 3-12
- 196 Forough, R., Weylie, B., Collins, C., Parker, J. L., Zhu, J., Barhoumi, R. and Watson, D. K. (2006) Transcription Factor Ets-1 Regulates Fibroblast Growth Factor-1-Mediated Angiogenesis in vivo: Role of Ets-1 in the Regulation of the PI3K/AKT/MMP-1 Pathway. *J Vasc Res* **43**, 327-337
- 197 Oyama, T., Matsushita, K., Sakuta, T., Tokuda, M., Tatsuyama, S., Nagaoka, S. and Torii, M. (2007) Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression. *J Periodontal Res* **42**, 53-61
- 198 Rothhammer, T., Hahne, J. C., Florin, A., Poser, I., Soncin, F., Wernert, N. and Bosserhoff, A. K. (2004) The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* **61**, 118-128
- 199 Overall, C. M. (2002) Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* **22**, 51-86
- 200 Thomas, R. S., Tymms, M. J., McKinlay, L. H., Shannon, M. F., Seth, A. and Kola, I. (1997) ETS1, NFkappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene* **14**, 2845-2855
- 201 Holzmeister, J., Ludewig, B., Pauli, G. and Simon, D. (1993) Sequence specific binding of the transcription factor c-Ets1 to the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 1229-1233
- 202 Gitlin, S. D., Bosselut, R., Gegonne, A., Ghysdael, J. and Brady, J. N. (1991) Sequence-specific interaction of the Ets1 protein with the long terminal repeat of the human T-lymphotropic virus type I. *J Virol* **65**, 5513-5523
- 203 Miao, Z. H., Tang, T., Zhang, Y. X., Zhang, J. S. and Ding, J. (2003) Cytotoxicity, apoptosis induction and downregulation of MDR-1 expression by the anti-topoisomerase II agent, salicine, in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Cancer* **106**, 108-115
- 204 Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P. and Bours, V. (2003) NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* **22**, 90-97
- 205 Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Mignotte, V., Rahuel, C. and Romeo, P. H. (1993) GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol* **13**, 668-676
- 206 Deveaux, S., Filipe, A., Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Romeo, P. H. and Mignotte, V. (1996) Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood* **87**, 4678-4685
- 207 Simon, M. P., Tournaire, R. and Pouyssegur, J. (2008) The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol*

- 208 Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1997) ZEB, a vertebrate homolog of *Drosophila* Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *Embo J* **16**, 3935-3943
- 209 Postigo, A. A., Sheppard, A. M., Mucenski, M. L. and Dean, D. C. (1997) c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB. *Embo J* **16**, 3924-3934
- 210 Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D. and Shibuya, M. (1996) A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* **271**, 30823-30828
- 211 Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Takahashi, N., Uehara, Y. and Fukazawa, H. (2006) Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J Biol Chem* **281**, 28113-28121
- 212 Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J. and Graf, T. (1996) MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* **85**, 49-60
- 213 Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T. and Ito, Y. (1999) Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* **18**, 1609-1620
- 214 Pei, H., Yordy, J. S., Leng, Q., Zhao, Q., Watson, D. K. and Li, R. (2003) EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function. *Oncogene* **22**, 2699-2709
- 215 Zhao, J., Lu, B., Xu, H., Tong, X., Wu, G., Zhang, X., Liang, A., Cong, W., Dai, J., Wang, H., Wu, M. and Guo, Y. (2008) Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **48**, 265-275
- 216 Kim, E., Gunther, W., Yoshizato, K., Meissner, H., Zapf, S., Nusing, R. M., Yamamoto, H., Van-Meir, E. G., Deppert, W. and Giese, A. (2003) Tumor suppressor p53 inhibits transcriptional activation of invasion gene thromboxane synthase mediated by the proto-oncogenic factor ets-1. *Oncogene* **22**, 7716-7727
- 217 Wasyluk, C., Schlumberger, S. E., Criqui-Filipe, P. and Wasyluk, B. (2002) Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Molecular and cellular biology* **22**, 2687-2702
- 218 Yordy, J. S., Li, R., Sementchenko, V. I., Pei, H., Muise-Helmericks, R. C. and Watson, D. K. (2004) SP100 expression modulates ETS1 transcriptional activity and inhibits cell invasion. *Oncogene* **23**, 6654-6665
- 219 Valter, M. M., Hugel, A., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Wiestler, O. D., Pietsch, T. and Wernert, N. (1999) Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* **59**, 5608-5614
- 220 Marziali, G., Perrotti, E., Ilari, R., Lulli, V., Coccia, E. M., Moret, R., Kuhn, L. C., Testa, U. and Battistini, A. (2002) Role of Ets-1 in transcriptional regulation of transferrin receptor and erythroid differentiation. *Oncogene* **21**, 7933-7944
- 221 Janknecht, R. and Hunter, T. (1996) Versatile molecular glue. *Transcriptional control*. *Curr Biol* **6**, 951-954
- 222 Tsai, E. Y., Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V., Barczak, A. K., Reimold, A. M., Glimcher, L. H., Fenton, M. J., Gordon, D. C., Dunn, I. F. and Goldfeld, A. E. (2000) A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* **20**, 6084-6094
- 223 Zhang, C., Kavurma, M. M., Lai, A. and Khachigian, L. M. (2003) Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* **278**, 27903-27909
- 224 Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Iwasaka-Yagi, C., Takahashi, S., Yamada, S. and Sato, Y. (2001) Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **188**, 243-252
- 225 McCarthy, K. M., McDevit, D., Andreucci, A., Reeves, R. and Nikolajczyk, B. S. (2003) HMGA1 co-activates transcription in B cells through indirect association with DNA. *J Biol Chem* **278**, 42106-42114
- 226 Andreucci, A., Reeves, R., McCarthy, K. M. and Nikolajczyk, B. S. (2002) Dominant-negative HMGA1 blocks mu enhancer activation through a novel mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 427-433
- 227 Lewis, R. T., Andreucci, A. and Nikolajczyk, B. S. (2001) PU.1-mediated transcription is enhanced by HMG-I(Y)-dependent structural mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 9550-9557
- 228 Darnell, J. E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635

- 229 Rameil, P., Lecine, P., Ghysdael, J., Gouilleux, F., Kahn-Perles, B. and Imbert, J. (2000) IL-2 and long-term T cell activation induce physical and functional interaction between STAT5 and ETS transcription factors in human T cells. *Oncogene* **19**, 2086-2097
- 230 Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. and Seth, A. (1993) The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7588-7592
- 231 Maroulakou, I. G., Papas, T. S. and Green, J. E. (1994) Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* **9**, 1551-1565
- 232 Maroulakou, I. G. and Bowe, D. B. (2000) Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* **19**, 6432-6442
- 233 Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C. N., Walunas, T. L., Lanier, L. L. and Leiden, J. M. (1998) The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* **9**, 555-563
- 234 Muthusamy, N., Barton, K. and Leiden, J. M. (1995) Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* **377**, 639-642
- 235 Walunas, T. L., Wang, B., Wang, C. R. and Leiden, J. M. (2000) Cutting edge: the Ets1 transcription factor is required for the development of NK T cells in mice. *Journal of immunology Baltimore, Md.* **164**, 2857-2860
- 236 Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D. and Alt, F. W. (1995) Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* **377**, 635-638
- 237 Wang, D., John, S. A., Clements, J. L., Percy, D. H., Barton, K. P. and Garrett-Sinha, L. A. (2005) Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease. *Int Immunol* **17**, 1179-1191
- 238 John, S. A., Clements, J. L., Russell, L. M. and Garrett-Sinha, L. A. (2008) Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem* **283**, 951-962
- 239 Jabrane-Ferrat, N. and Peterlin, B. M. (1994) Ets-1 activates the DRA promoter in B cells. *Mol Cell Biol* **14**, 7314-7321
- 240 Clements, J. L., John, S. A. and Garrett-Sinha, L. A. (2006) Impaired generation of CD8+ thymocytes in Ets-1-deficient mice. *Journal of immunology Baltimore, Md.* **177**, 905-912
- 241 Ikonomi, P., Rivera, C. E., Riordan, M., Washington, G., Schechter, A. N. and Noguchi, C. T. (2000) Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol* **28**, 1423-1431
- 242 Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. and Philipsen, S. (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* **25**, 1215-1227
- 243 Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T. and Kuroiwa, Y. (1999) Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci* **64**, 249-258
- 244 Tomita, N., Morishita, R., Taniyama, Y., Koike, H., Aoki, M., Shimizu, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y. and Ogihara, T. (2003) Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1. *Circulation* **107**, 1411-1417
- 245 Pourtier-Manzanedo, A., Vercamer, C., Van-Belle, E., Mattot, V., Mouquet, F. and Vandebunder, B. (2003) Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene* **22**, 1795-1806
- 246 Hashiya, N., Jo, N., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Sato, Y., Ogata, N., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Morishita, R. (2004) In vivo evidence of angiogenesis induced by transcription factor Ets-1: Ets-1 is located upstream of angiogenesis cascade. *Circulation* **109**, 3035-3041
- 247 Lelievre, E., Lionneton, F., Soncin, F. and Vandebunder, B. (2001) The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 391-407
- 248 Chen, Z., Fisher, R. J., Riggs, C. W., Rhim, J. S. and Lautenberger, J. A. (1997) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res* **57**, 2013-2019
- 249 Oda, N., Abe, M. and Sato, Y. (1999) ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* **178**, 121-132
- 250 Santiago, F. S. and Khachigian, L. M. (2004) Ets-1 stimulates platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and vascular smooth muscle cell growth via cooperative interactions with Sp1. *Circ Res* **95**, 479-487

- 251 Bonello, M. R., Bobryshev, Y. V. and Khachigian, L. M. (2005) Peroxide-inducible Ets-1 mediates platelet-derived growth factor receptor-alpha gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* **167**, 1149-1159
- 252 Dandre, F. and Owens, G. K. (2004) Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H2042-2051
- 253 Sahin, A., Velten, M., Pietsch, T., Knuefermann, P., Okuducu, A. F., Hahne, J. C. and Wernert, N. (2005) Inactivation of Ets 1 transcription factor by a specific decoy strategy reduces rat C6 glioma cell proliferation and mmp-9 expression. *Int J Mol Med* **15**, 771-776
- 254 Taniguchi, H., Fujiwara, Y., Doki, Y., Sugita, Y., Sohma, I., Miyata, H., Takiguchi, S., Yasuda, T., Tomita, N., Morishita, R. and Monden, M. (2007) Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* **121**, 1609-1617
- 255 Roussel, M. F., Davis, J. N., Cleveland, J. L., Ghysdael, J. and Hiebert, S. W. (1994) Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene* **9**, 405-415
- 256 Lambert, P. F., Ludford-Menting, M. J., Deacon, N. J., Kola, I. and Doherty, R. R. (1997) The nfkb1 promoter is controlled by proteins of the Ets family. *Mol Biol Cell* **8**, 313-323
- 257 Seth, A., Giunta, S., Franceschil, C., Kola, I. and Venanzoni, M. C. (1999) Regulation of the human stress response gene GADD153 expression: role of ETS1 and FLI-1 gene products. *Cell Death Differ* **6**, 902-907
- 258 Bardeesy, N. and Sharpless, N. E. (2006) RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 451-453
- 259 Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G. and Hara, E. (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070
- 260 Yu, Z. and Shah, D. M. (2007) Curcumin down-regulates Ets-1 and Bcl-2 expression in human endometrial carcinoma HEC-1-A cells. *Gynecol Oncol* **106**, 541-548
- 261 Koskela, K. and Lassila, O. (2003) Single-cell analysis of Ets-1 transcription factor expression during lymphocyte activation and apoptosis. *Scand J Immunol* **57**, 56-61
- 262 Takanami, I., Takeuchi, K. and Karuke, M. (2001) Expression of ETS-1 is correlated with urokinase-type plasminogen activator and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Tumour Biol* **22**, 205-210
- 263 Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S. and Sekine, I. (2001) Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* **14**, 415-422
- 264 Davidson, B., Risberg, B., Goldberg, I., Nesland, J. M., Berner, A., Trope, C. G., Kristensen, G. B., Bryne, M. and Reich, R. (2001) Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome. *Am J Surg Pathol* **25**, 1493-1500
- 265 Fujimoto, J., Aoki, I., Toyoki, H., Khatun, S. and Tamaya, T. (2002) Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Ann Oncol* **13**, 1598-1604
- 266 Alipov, G., Nakayama, T., Ito, M., Kawai, K., Naito, S., Nakashima, M., Niino, D. and Sekine, I. (2005) Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology* **46**, 202-208
- 267 Keehn, C. A., Smoller, B. R. and Morgan, M. B. (2003) Expression of the ets-1 proto-oncogene in melanocytic lesions. *Mod Pathol* **16**, 772-777
- 268 Naito, T., Razzaque, M. S., Nazneen, A., Liu, D., Nihei, H., Koji, T. and Taguchi, T. (2000) Renal expression of the Ets-1 proto-oncogene during progression of rat crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2243-2255
- 269 de Nigris, F., Mega, T., Berger, N., Barone, M. V., Santoro, M., Viglietto, G., Verde, P. and Fusco, A. (2001) Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res* **61**, 2267-2275
- 270 Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J. and Sato, H. (2001) Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* **61**, 7985-7991
- 271 Lincoln, D. W., 2nd and Bove, K. (2005) The transcription factor Ets-1 in breast cancer. *Frontiers in bioscience a journal and virtual library* **10**, 506-511
- 272 Trojanowska, M. (2000) Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* **19**, 6464-6471
- 273 Behrens, P., Mathiak, M., Mangold, E., Kirdorf, S., Wellmann, A., Fogt, F., Rothe, M., Florin, A. and Wernert, N. (2003) Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* **107**, 183-188

- 274 Behrens, P., Rothe, M., Florin, A., Wellmann, A. and Wernert, N. (2001) Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression. *Int J Mol Med* **8**, 149-154
- 275 Behrens, P., Rothe, M., Wellmann, A., Krischler, J. and Wernert, N. (2001) The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* **194**, 43-50
- 276 Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B. and Stehelin, D. (1994) Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* **54**, 5683-5688
- 277 Ozaki, I., Mizuta, T., Zhao, G., Yotsumoto, H., Hara, T., Kajihara, S., Hisatomi, A., Sakai, T. and Yamamoto, K. (2000) Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **60**, 6519-6525
- 278 Nakada, M., Yamashita, J., Okada, Y. and Sato, H. (1999) Ets-1 positively regulates expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and invasiveness of astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 329-334
- 279 Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G. R. and Guise, T. A. (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* **103**, 197-206
- 280 Gilmore, J. L., Scott, J. A., Bouizar, Z., Robling, A., Pitfield, S. E., Riese, D. J., 2nd and Foley, J. (2008) Amphiregulin-EGFR signaling regulates PTHrP gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **110**, 493-505
- 281 Nishihara, M., Kanematsu, T., Taguchi, T. and Razzaque, M. S. (2007) PTHrP and tumorigenesis: is there a role in prognosis? *Ann N Y Acad Sci* **1117**, 385-392
- 282 Samejima, K., Svingen, P. A., Basi, G. S., Kottke, T., Mesner, P. W., Jr., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G. G., Alnemri, E. S., Champoux, J. J., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (1999) Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 4335-4340
- 283 Dennis, J. W., Granovsky, M. and Warren, C. E. (1999) Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 21-34
- 284 Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B. and Stehelin, D. (1992) c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* **140**, 119-127
- 285 Fujimoto, J., Aoki, I., Toyoki, H., Khatun, S., Sato, E., Sakaguchi, H. and Tamaya, T. (2004) Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers. *Oncology* **66**, 420-428
- 286 Fujimoto, J., Aoki, I., Toyoki, H., Khatun, S. and Tamaya, T. (2002) Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* **13**, 1605-1611
- 287 Tokuhara, K., Ogata, Y., Nakagawa, M. and Shirouzu, K. (2003) Ets-1 expression in vascular endothelial cells as an angiogenic and prognostic factor in colorectal carcinoma. *Int Surg* **88**, 25-33
- 288 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257
- 289 Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306
- 290 Ziegler, U. and Groscurth, P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* **19**, 124-128
- 291 Wyllie, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556
- 292 Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P. and Roos, D. (1995) Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* **85**, 532-540
- 293 Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-1556
- 294 Messmer, U. K. and Pfeilschifter, J. (2000) New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* **22**, 878-881
- 295 Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171
- 296 Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308

- 297 Kroemer, G. (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 433-435
- 298 Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* **256**, 42-49
- 299 Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512
- 300 Golstein, P. (1997) Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* **7**, R750-753
- 301 Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504
- 302 Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R. and Dixit, V. M. (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-818
- 303 Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827
- 304 Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* **16**, 2794-2804
- 305 Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-5588
- 306 Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-862
- 307 Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebbersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446
- 308 Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J. V. and Zervos, A. S. (2000) Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* **275**, 2581-2588
- 309 Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. and Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**, 90-94
- 310 Beere, H. M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* **115**, 2633-2639
- 311 Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413
- 312 Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489
- 313 Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 8359-8362
- 314 Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42
- 315 Boyce, M., Degtarev, A. and Yuan, J. (2004) Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ* **11**, 29-37
- 316 Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676
- 317 Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652
- 318 Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E. (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1150-1154
- 319 Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. and Vandenaabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**, 358-361
- 320 Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E. (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 722-726
- 321 Mikolajczyk, J., Scott, F. L., Krajewski, S., Sutherlin, D. P. and Salvesen, G. S. (2004) Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry* **43**, 10560-10569
- 322 Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**, 201-232

- 323 Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**, 155-156
- 324 Boatright, K. M. and Salvesen, G. S. (2003) Caspase activation. *Biochem Soc Symp*, 233-242
- 325 Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D. and et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352
- 326 Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A. and et al. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275
- 327 Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**, 2926-2930
- 328 Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. and Peter, M. E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**, 207-220
- 329 Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L. and Nunez, G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J* **18**, 3586-3595
- 330 Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-432
- 331 Sleath, P. R., Hendrickson, R. C., Kronheim, S. R., March, C. J. and Black, R. A. (1990) Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem* **265**, 14526-14528
- 332 Howard, A. D., Kostura, M. J., Thornberry, N., Ding, G. J., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J. P., Hogquist, K. A., Chaplin, D. D., Mumford, R. A. and et al. (1991) IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol* **147**, 2964-2969
- 333 Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-17911
- 334 Fischer, U., Janicke, R. U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**, 76-100
- 335 Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T. J., Dingwall, C., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2002) Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* **21**, 1967-1977
- 336 Schutte, B., Henfling, M., Kolgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M. P., Nap, M., Bjorklund, V., Bjorklund, P., Bjorklund, B., Lane, E. B., Omary, M. B., Jornvall, H. and Ramaekers, F. C. (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* **297**, 11-26
- 337 Brancolini, C., Sgorbissa, A. and Schneider, C. (1998) Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis. *Cell Death Differ* **5**, 1042-1050
- 338 Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**, 3976-3985
- 339 Flygare, J., Armstrong, R. C., Wennborg, A., Orsan, S. and Hellgren, D. (1998) Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett* **427**, 247-251
- 340 Jin, Y. H., Yoo, K. J., Lee, Y. H. and Lee, S. K. (2000) Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem* **275**, 30256-30263
- 341 Widmann, C., Gibson, S. and Johnson, G. L. (1998) Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* **273**, 7141-7147
- 342 Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S. and Hardwick, J. M. (2001) c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* **276**, 7602-7608
- 343 Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J. M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**, 1966-1968
- 344 Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R. and Raines, E. W. (1999) Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* **1**, 227-233
- 345 Sarrazin, S., Bonod-Bidaud, C., Remy, P., Mehlen, P. and Morle, F. (2002) Caspase cleavage of the transcription factor FLI-1 during preB leukemic cell death. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 123-127

- 346 Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-
 347 activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50
- 348 Mashima, T. and Tsuruo, T. (1997) [Involvement of ICE/CED 3 family proteases in antitumor agent-
 induced apoptosis]. *Gan To Kagaku Ryoho* **24**, 211-215
- 349 Villa, P. G., Henzel, W. J., Sensenbrenner, M., Henderson, C. E. and Pettmann, B. (1998) Calpain
 inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during
 apoptosis. *J Cell Sci* **111 (Pt 6)**, 713-722
- 350 Song, Q., Wei, T., Lees-Miller, S., Alnemri, E., Watters, D. and Lavin, M. F. (1997) Resistance of actin
 to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 157-162
- 351 Rice, R. L., Tang, D. G. and Taylor, J. D. (1998) Actin cleavage in various tumor cells is not a critical
 requirement for executing apoptosis. *Pathol Oncol Res* **4**, 135-145
- 352 Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D. and Raff, M. C.
 (1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* **133**, 1053-1059
- 353 Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R. and Reed, J. C.
 (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell
 death protease. *Cancer Res* **57**, 1605-1613
- 354 Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R. A., Zhu, R. L., Graham, S. H. and Simon, R. P. (1998)
 Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after
 transient cerebral ischemia. *J Neurosci* **18**, 4914-4928
- 355 Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T.
 W., Taki, S. and Taniguchi, T. (1995) An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis
 in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature* **376**, 596-599
- 356 Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. (1997) Target protease
 specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* **272**, 7797-7800
- 357 Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S.,
 Ghayur, T., Li, P. and et al. (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic
 protein p35. *Science* **269**, 1885-1888
- 358 Riedl, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J. and Salvesen, G. S. (2001) Mechanism-based inactivation of
 caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry* **40**, 13274-13280
- 359 Crook, N. E., Clem, R. J. and Miller, L. K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc
 finger-like motif. *J Virol* **67**, 2168-2174
- 360 Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C. (1997) The c-IAP-1 and c-
 IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-6925
- 361 Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Ashwell, J. D. (2000) Ubiquitin protein ligase
 activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**,
 874-877
- 362 Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-
 inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-
 inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-20640
- 363 Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Zhao, J. J., Howard, A. D., Griffin, P. R. and Chapman, K. T. (1994)
 Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry*
33, 3934-3940
- 364 Wei, Y., Fox, T., Chambers, S. P., Sintchak, J., Coll, J. T., Golec, J. M., Swenson, L., Wilson, K. P. and
 Charifson, P. S. (2000) The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and
 inhibitor selectivity. *Chem Biol* **7**, 423-432
- 365 Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1998)
 Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **273**,
 32608-32613
- 366 Cory, S. and Adams, J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat
 Rev Cancer* **2**, 647-656
- 367 Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M. A., White, E. and Saikumar, P.
 (2003) Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak
 reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* **278**, 5367-5376
- 368 Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. and Martinou, J. C. (2000) Bax oligomerization is
 required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from
 mitochondria. *Biochem J* **345 Pt 2**, 271-278
- 369 Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial
 damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501

- 369 Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E. and Gross, A. (2002) tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 12237-12245
- 370 Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136
- 371 Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132
- 372 Zuzarte-Luis, V. and Hurler, J. M. (2002) Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* **46**, 871-876
- 373 Meier, P., Finch, A. and Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801
- 374 Nishikawa, A. and Hayashi, H. (1995) Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. *Differentiation* **59**, 207-214
- 375 Weil, M., Raff, M. C. and Braga, V. M. (1999) Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* **9**, 361-364
- 376 Follezu, J. Y., Emerit, J. and Bricaire, F. (1999) [Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis]. *Presse Med* **28**, 1661-1666
- 377 Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631-639
- 378 Sathasivam, S., Ince, P. G. and Shaw, P. J. (2001) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**, 257-274
- 379 Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**, S61-70; discussion S70-62
- 380 Roshal, M., Zhu, Y. and Planelles, V. (2001) Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* **6**, 103-116
- 381 Reed, J. C. (1999) Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* **11**, 68-75
- 382 Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**, 277-288
- 383 Anderson, C. W. (1993) DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* **18**, 433-437
- 384 DiBiase, S. J., Zeng, Z. C., Chen, R., Hyslop, T., Curran, W. J., Jr. and Iliakis, G. (2000) DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res* **60**, 1245-1253
- 385 Kashishian, A., Douangpanya, H., Clark, D., Schlachter, S. T., Eary, C. T., Schiro, J. G., Huang, H., Burgess, L. E., Kesicki, E. A. and Halbrook, J. (2003) DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* **2**, 1257-1264
- 386 Gullo, C., Au, M., Feng, G. and Teoh, G. (2006) The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1765**, 223-234
- 387 Smith, G. C. and Jackson, S. P. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13**, 916-934
- 388 Giffin, W., Torrance, H., Rodda, D. J., Prefontaine, G. G., Pope, L. and Hache, R. J. (1996) Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. *Nature* **380**, 265-268
- 389 Schild-Poulter, C., Pope, L., Giffin, W., Kochan, J. C., Ngsee, J. K., Traykova-Andonova, M. and Hache, R. J. (2001) The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**, 16848-16856
- 390 Ko, L. and Chin, W. W. (2003) Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **278**, 11471-11479
- 391 Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E. and Kastan, M. B. (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* **274**, 37538-37543
- 392 Schaffer, A., Kim, E. C., Wu, X., Zan, H., Testoni, L., Salamon, S., Cerutti, A. and Casali, P. (2003) Selective inhibition of class switching to IgG and IgE by recruitment of the HoxC4 and Oct-1 homeodomain proteins and Ku70/Ku86 to newly identified ATTT cis-elements. *J Biol Chem* **278**, 23141-23150
- 393 Chang, J., Wei, L., Otani, T., Youker, K. A., Entman, M. L. and Schwartz, R. J. (2003) Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation* **108**, 407-413
- 394 Okamoto, S., Li, Z., Ju, C., Scholzke, M. N., Mathews, E., Cui, J., Salvesen, G. S., Bossy-Wetzell, E. and Lipton, S. A. (2002) Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3974-3979

RESUME

Ets-1 est un facteur de transcription, membre de la famille Ets, possédant un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé permettant de reconnaître un cœur consensus, GGAA/T, présente dans le promoteur des gènes cibles. Ce facteur régule des gènes impliqués dans divers processus physiologiques et pathologiques, tels que le développement, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, l'apoptose, ou l'invasion tumorale. A l'heure actuelle, trois isoformes d'Ets-1 sont décrites chez l'homme : l'isoforme majoritaire de pleine longueur Ets-1 p51 et les isoformes Ets-1 p42 et Ets-1 p27, issues, respectivement, d'épissage alternatif de l'exon VII et des exons III à VI du gène.

Les protéines Ets-1 n'agissent pas seules au niveau de leurs promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de partenaires protéiques. De plus, elles sont des cibles nucléaires de nombreuses voies de transduction du signal. L'identification de nouvelles protéines interagissant avec les isoformes d'Ets-1 devrait donc nous permettre de mieux appréhender certaines de leurs fonctions intrinsèques. Dans ce but, nous avons, tout d'abord, mis au point un système procaryote de production des isoformes d'Ets-1 biotinylées qui conservent les propriétés fonctionnelles de la protéine Ets-1 native. Ces protéines nous ont par la suite permis de mettre au point une stratégie de purification par affinité des partenaires protéiques d'Ets-1 grâce à la réaction streptavidine-biotine. Nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires protéiques potentiels. Parmi ceux-ci, nous avons pu confirmer comme partenaires d'interaction des isoformes d'Ets-1, les trois protéines du complexe DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) : Ku70, Ku86 et DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit). Outre son rôle dans la réparation des cassures de l'ADN, la DNA-PK est connue pour être impliquée dans la régulation transcriptionnelle et la phosphorylation d'un certain nombre de facteurs de transcription. Ainsi, nous avons montré que les isoformes d'Ets-1 représentent des substrats de phosphorylation par la DNA-PK. De plus, la surexpression de la protéine Ku86 diminue l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 p51. Ces résultats ont permis de définir un nouveau lien entre les protéines de réparation de l'ADN et Ets-1, ainsi qu'une nouvelle régulation de son activité qui pourrait fournir de nouveaux indices pour comprendre les diverses fonctions des Ets-1.

Dans une autre étude, nous avons démontré qu'Ets-1 p51 est un nouveau substrat de la caspase-3, protéase effectrice de la machinerie apoptotique. En effet, Ets-1 p51, mais pas le variant d'épissage Ets-1 p42, est clivé *in vitro* et dans des cellules apoptotiques par la caspase-3. Ce clivage génère trois fragments C-terminaux : Cp20, Cp17 et Cp14 et un fragment N-terminal Np36. Ces fragments sont issus de clivages au niveau de trois sites de coupure par la caspase-3 présents dans la région codée par l'exon VII du gène. Le clivage d'Ets-1 p51 produit des fragments C-terminaux contenant le domaine de liaison à l'ADN mais pas le domaine de transactivation. Ainsi, le fragment Cp17, le principal produit de clivage généré durant l'apoptose, est capable de bloquer l'activation des promoteurs cibles induites par Ets-1 p51, démontrant ainsi ses propriétés de dominant négatif naturel. Ces données suggèrent un nouveau mécanisme de régulation d'Ets-1 p51 *via* son clivage par la caspase-3 en générant un fragment dominant négatif qui peut jouer un rôle actif durant l'apoptose.