



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**E2F7 proteinaren karakterizazioa
DNAren konponketa eta
ezegonkortasun genomikoaren
modulatzaile gisa**

*Jon Vallejo-Rodríguez,
Jone Mitxelena, Aintzane Apraiz,
Iraia García-Santisteban,
Asier Fullaondo, Monica Álvarez-
Fernández, Marcos Malumbres
eta Ana Zubiaga*

99-105 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.13>



E2F7 proteinaren karakterizazioa DNAREN konponketa eta ezegonkortasun genomikoaren modulatzailerako gisa

Vallejo-Rodríguez, Jon¹; Mitxelena, Jone¹; Apraiz, Aintzane²; García-Santisteban, Iraia¹;
Fullaondo, Asier¹; Álvarez-Fernández, Monica³; Malumbres, Marcos³ eta Zubiaga Ana¹

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila, UPV/EHU ²Biologia
zelularra eta Histologia saila, UPV/EHU ³Zatiketa zelularra eta Minbizi taldea,
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

jon.vallejo@ehu.eus

Laburpena

E2F7 proteinaren ekarpena tumoreen garapenean ez da oraindik guztiz zehaztua izan. Lan honetan E2F7k egonkortasun genomikoaren mantentzean parte hartzen duen gene multzo baten adierazpena erreprimitzen duela erakusten dugu erreplikazio urkilaren aurrerapena oztopatzen duten DNAREN kalteen aurrean. E2F7ren isilarazpenak 53BP1 fokoen eta aberrazio kromosomikoen murriztapena eragiten du *interstrand cross-link (ICL)* lesioen eragileak diren tratamenduen ostean. Azkenik, errekonbinazio-akastun zeluletan, E2F7ren azpiadierazpenak kimioterapiarekiko erresistentzia ematen duela iradokitzen duten frogak aurkezten ditugu. Hau guztia kontutan hartuz, gure datuek integritate genomikoaren mantenuan eta DNAREN konponketaren erregulazioan laguntzen duen E2F7ren menpeko programa transkripzional bat dagoela erakusten dute. Hitz gakoak: E2F7, DNAREN konponketa, egonkortasun genomikoa.

Abstract

The contribution of the atypical E2F7 to tumor development is still poorly defined. Here we show that E2F7 represses the expression of a set of genes involved in the maintenance of genomic stability, upon induction of DNA lesions that interfere with replication fork progression. Acute depletion of E2F7 leads to a reduction in 53BP1 and to fewer chromosomal aberrations following treatment with agents that cause interstrand cross-link (ICL) lesions but not upon ionizing radiation. Finally, we present evidence that downregulation of E2F7 confers an increased resistance to chemotherapy in recombination-deficient cells. Taken together, our results reveal an E2F7-dependent transcriptional program that contributes to the regulation of DNA repair and genomic integrity. Keywords: E2F7, DNA damage repair and genomic integrity.

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun herrialde garatuetan, minbizia da gaixotasunek sortutako heriotzen artean bigarren kausa. Minbizia oso erlazionatuta dago populazioak jasaten duen zahartze prozesuarekin eta urtero kasu gehiago diagnostikatzen dira. Minbizi ezberdinen ezaugarriak buruz gero eta gehiago dakigun arren, banakoen artean dauden ezberdintasunek zaila egiten dute gaixotasun honetarako tratamendu orokor bat garatzea. Horregatik, tratamendu egokiago bat lortzeko, funtsezkoa da tumorearen garapen eta mantentzean parte hartzen duten erregulatzailerako berrien identifikazioa.

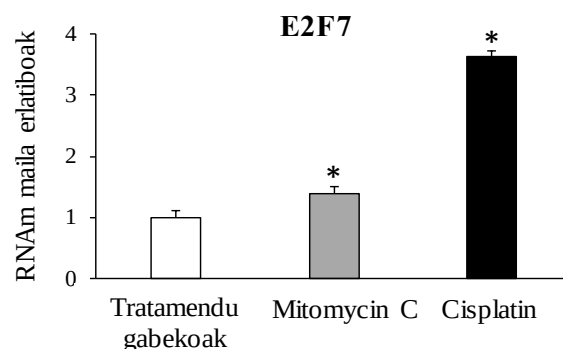
Ehun normal edo zelula talde normal batetik tumore kaltegarri bat garatzeko prozesu molekular ugari eman behar dira. Tumoreak oso heterogeneoak direla esan dugun arren, badira bere garapenean zehar lortzen dituzten ezaugarri komunak. Horiek Hanahan eta Weinberg-ek deskribatu zituzten 2000. urtean “Minbiziaren markak” bezala (“Hallmarks of Cancer”) definituz. 2011. urtean marka hauek berrikusiak izan ziren honako hauek definituz: mugagabeki erreplikatu, proliferazio seinaleak sustatu, inhibizio seinaleetatik ihes egin, heriotza zelularretik ihes egin, ehunen inbasioa eta metastasia, angiogenesisia indusitu, metabolismo energetikoa birprogramatu, immunitate sistemaren suntsipena ekidin, ezegonkortasun genomikoa eta mutazioak eta hantura sustatu. Marka hauen erregulazioaren ikerketa garrantzi handikoa izan da azken urteotan minbiziaren kontrako tratamenduak hobetzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1. E2F7ren erregulazioa tratamendu kimioterapikoen ostean

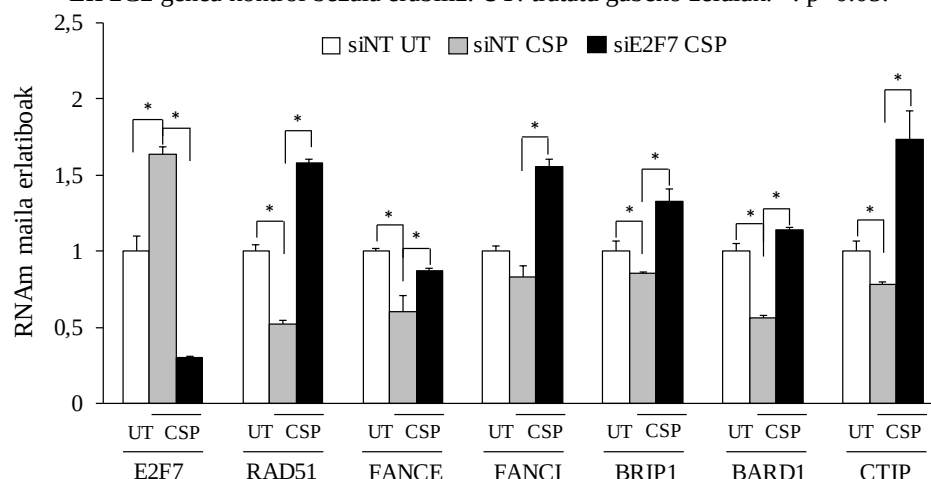
Tratamendu kimioterapikoen ostean E2F7ren funtzioa aztertzeko, lehenengo eta behin E2F7ren adierazpena aztertu genuen *Mitomycin C* (MMC) eta *Cisplatin* (CSP) konposatuekin trataturiko U2OS zeluletan. E2F7ren adierazpena areagotuta zegoen bai MMC, bai CSP tratamenduen ostean (2. irudia). Emaizta honek E2F7ren funtzio ezezagun bat iradoki zuen tratamendu hauek DNAn eragindako kaltearen aurrean.

2. irudia. E2F7ren gainadierazpena tratamendu kimioterapikoen aurrean. U2OS asinkronoak 250 Nm MMC eta 8 μ M CSPekin tratatuak izan ziren 24 orduz. Azkenik, E2F7ren adierazpena RT-qPCRren bidez neurtu zen EIF2C2 genea kontrol bezala erabiliz. *: $p < 0.05$.



E2F7ren funtzio hau hobeto deskribatzeko, analisi transkriptomikoan identifikatutako geneen adierazpena aztertu genuen CSP tratamenduarekin. Gene hauek DNAn konponketan parte hartzen duten proteinak kodetzen dituzte. Bereziki Fanconi anemiaren bidezidorraren geneak aztertu genituen (FANCE, FANCI eta BRIP1) baina baita beste konponketa geneak ere (RAD51, BARD1 eta CTIP). Gene multzo hauen adierazpena gutxিতuta zegoen tratamenduaren ostean siNT UT zelulak (tratatu eta isilarazi gabeak) eta siNT CSP zelulak (isilarazi gabeak baina tratatuak) konparatuz (3. irudia). Berriz, E2F7 isilaraztean tratatutako zeluletan (siE2F7 CSP), aztertutako gene guztien adierazpena areagotzen zen E2F7ren falta zela eta (3. irudia). Beraz, ondorioztatu genuen tratamendu kimioterapikoak E2F7ren igoera bat eragiten zuela eta igoera honek DNAn konponketan garrantzitsuak diren geneen adierazpena gutxitzen zuela, E2F7 gene hauen adierazpenaren errepresioegilea bezala identifikatuz.

3. irudia. E2F7k DNA konponketa geneen errepresioa burutzen du tratamendu kimioterapikoen aurrean. U2OS asinkronoak siNT eta siE2F7rekin transfektatuta izan ziren. Gero, 8 μ M CSPekin tratatuak izan ziren 24 orduz. Azkenik, aztertutako geneen adierazpena RT-qPCRren bidez neurtu zen EIF2C2 genea kontrol bezala erabiliz. UT: tratatu gabeko zelulak. *: $p < 0.05$.



3.2. E2F7ren funtzioa DNAREN konponketan tratamendu kimioterapikoen ostean

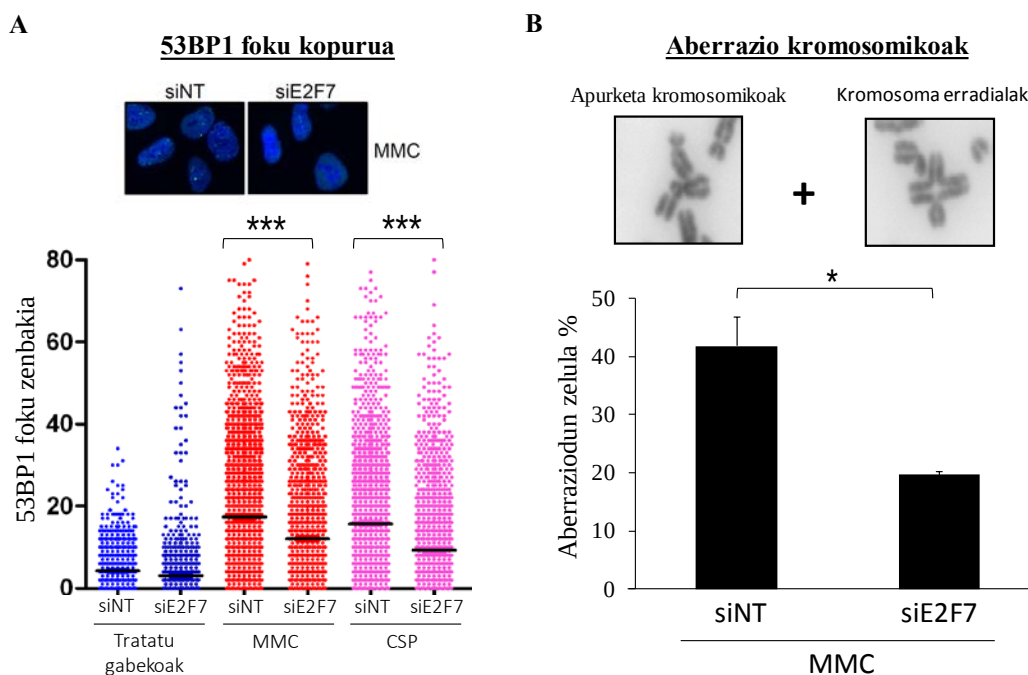
Ikusi dugu E2F7k DNAREN konponketa geneen adierazpena erregulatzen duela. Jarraian, E2F7k DNAREN konponketa prozesua bera erregulatzen duen ala ez jakin nahi izan genuen. Galdera hau erantzuteko, DNAREN konponketaren bi markatzaile analizatu genituen.

Alde batetik 53BP1 proteinaren fokuak aztertu genituen. 53BP1 proteina DNAREN konponketa prozesuan konponketa lekuetan lokalizatzen den proteina gako bat da. Ikusi genuen MMC eta CSP tratamenduan ostean, 53BP1 fokuen kopurua areagotu egiten zela (4A. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak foku hauen kopurua txikitzen zuen MMC eta CSPrekin tratatutako zeluletan (4A. irudia), konponketa handiago bat iradokiz. Bestalde, aberrazio kromosomikoak aztertu genituen; bai apurketa kromosomikoak, bai kromosoma erradialak (4B. irudia). Aberrazio kromosomiko hauek ohikoak dira ICL edo aduktuak sortzen dituzten tratamenduen ostean. Ikus dezakegu MMC tratamenduaren ostean zelulen %40ak mota bateko edo besteko aberrazio kromosomikoren bat aurkeztzen zutela (4B. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak, ehuneko hau erdira gutxitu egiten zuen (4B. irudia).

4. irudia. E2F7ren isilarazpenak foku kopurua eta aberrazio kromosomikoak murriztapen ditu.(A)

E2F7ren adierazpena isilarazita duten (siE2F7) eta isilarazi gabeko (siNT) U2OS zelulak CSP eta MMCekin tratatu ziren. 24 ordu eta gero, 53BP1en aurkako antigorputz espezifiko batekin tindatu ziren eta foku kopurua zenbatu zen. (B) E2F7ren adierazpena isilarazita duten eta isilarazi gabeko U2OS zelulak MMCekin tratatu ziren. 24 ordu eta gero “metaphase spread” protokoloa jarraitu zen aberrazio kromosomikoak mikroskopiaz aztertzeko.

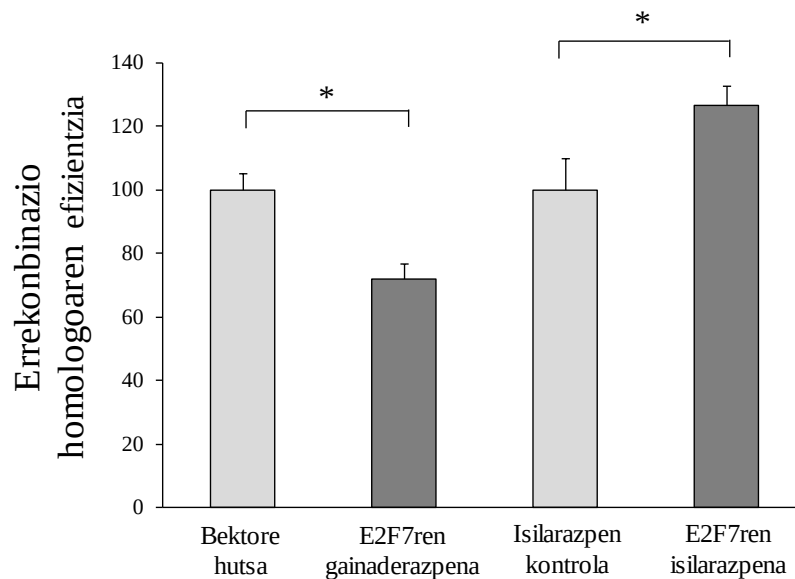
*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$



Bi emaitza hauek iradoki zuten E2F7ren isilarazpenak zelulen DNAREN konponketa gaitasuna areagotzen duela, beraz E2F7k konponketa hau erreprimitzen du. Gure hurrengo galdera E2F7k konponketa prozesuaren ze pausoa daukan efektua izan zen. Sarreran esan dugun bezala, ICL edo aduktu hauen konponketarako Fanconi Anemiaren bidezidorra erabiltzen da, eta bidezidor honen azken pausua, eta garrantzitsuenetarikoa, errekonbinazio homologoa (EH) burutzea da. Beraz, E2F7k errekonbinazio homologoa izan dezakeen efektua aztertzeko esperimentu bat proposatu genuen.

Errekonbinazio homologoa aztertzeko fluoreszentsian oinarritutako sistema bat erabili genuen, DR-GFP sistema. Sistema honekin, errekonbinazio homologoa zuzen burutu duen zelula bat, zelula fluoreszente bat bezala detekta dezakegu. DR-GFP sistema erabiltza ikusi genuen E2F7ren gainadierazpenak errekonbinazio homologoaren efizientzia jaisten zuela (5. irudia). Berriz, E2F7ren isilarazpenak, prozesu honen efizientzia areagotzen zuen. Emaitza hauekin ondorioztatu dezakegu E2F7k errekonbinazio homologoa erreprimitzen duela.

5. irudia. E2F7k errekonbinazio homologoa erreprimitzen du. DR-GFP sistema duten U2OS zelulak bektore hutsa eta E2F7ren gainadierazpenaren bektorearekin transsektatu ziren. Bestalde, beste zelula batzuk isilarazpen kontrolarekin eta E2F7ren isilarazpenarekin transfektatu ziren. GFP positiboak ziren zelulen kopurua fluxu zitometria z neurtu ziren errekonbinazio homologoaren efizientzia neurtuz. *: $p < 0.05$.



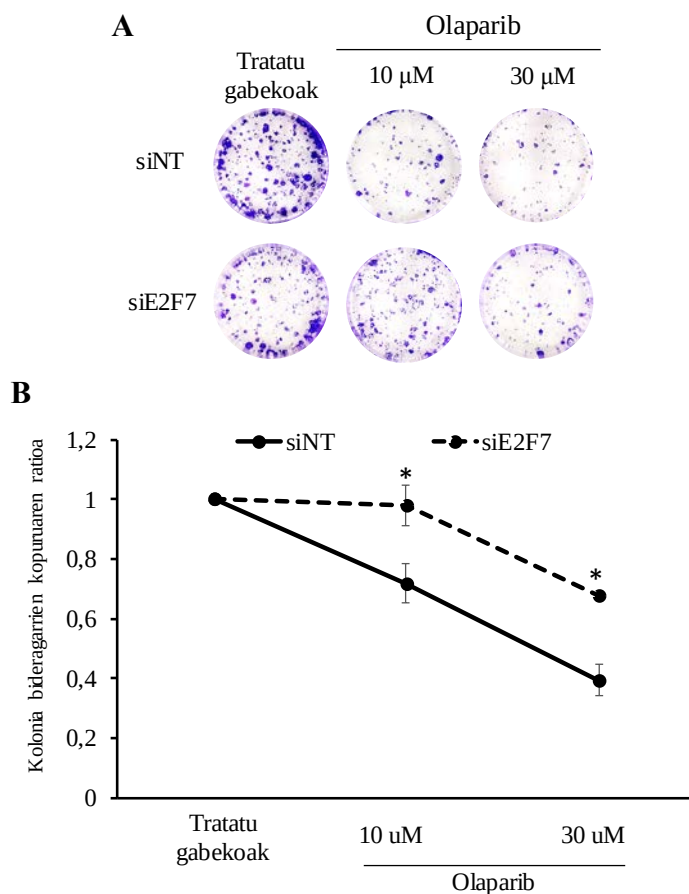
3.3. E2F7ren funtzioa egonkortasun genomikoan

Jakina da errekonbinazio homologoaren prozesuko akatsek ezegonkortasun genomikoa eragiten dutela, azken hau tumoreen garapenerako beharrezkoa den markatzaileetarikoa izanik. Egoera hau ohikoa da bularreko minbizi kasuen BRCA2 genearen mutazioak direla eta. Kasu hauetan, BRCA2 aktibo ez dagoenez, DNAREN kaltea PARP1 bidezidorraren bitartez konpontzen da. Beraz, BRCA2-defizienteak diren zelula hauek PARP1en inhibitzaileekiko oso sentikorrak dira (Lord & Ashworth, 2017).

E2F7k errekonbinazio homologoan eragiten duen errepresioa ikusita, BRCA2rako defizienteak diren zeluletan E2F7 isilaraziz gero, zelula hauek PARP1en inhibitzaileen aurrean erresistenteagoak diren jakin nahi izan genuen.

Capan-1 zelulak erabili genituen BRCA2ren defizientzia daramaten zelula modelo gisa (McCabe et al., 2005) eta ikusi genuen entsegu klonogeniko bat erabiliz, zelula hauek sentikorrak direla Olaparib (PARP1en inhibitzailea) kontzentrazio gorakorretara (6. irudia. Etenik gabeko marra). Berriz, E2F7ren isilarazpenak sentikortasun hau gutxitzen zuen kolonia tratamenduaren ostean kopurua areagotuz (6. irudia). Beraz, esan dezakegu, E2F7ren isilarazpenak zelula hauei PARP1en inhibizioaren aurrean erresistentzia ematen diela.

6. irudia. E2F7ren isilarazpenak egonkortasun genomikoa bermatzen du BRCA2-defizienteak diren zeluletan. Entsegu klonogenikoak burutu ziren siNT eta siE2F7rekin transkeftatutako Capan-1 zeluletan. Zelula hauek 10 μ M eta 30 μ M Olaparibaz tratatu ziren. *: $p<0.05$.



4. Ondorioak

E2F7k, DNAREN kaltearen ondoren, konponketa geneak erreprimitzen dituela ikusi dugu eta beraz, E2F7k DNAREN konponketa prozesua erreprimitzen duela ondoriozta dezakegu, zehazki, errekonbinazio homologoa. Gainera, E2F7ren ausentziak, errekonbinazio homologo ezegokia burutzen duten zeluletan, egonkortasun genomikoa ziurtatuko luke, kimioterapiaren aurreko erresistentzia areagotuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek E2F7ren funtzio berri bat erakusten du DNAREN konponketaren erregulatzailerik bezala tratamendu kimioterapikoen aurrean. Aurkikuntza berri honek zenbait erronka berri planteatzen ditu.

Alde batetik oso interesgarria izango litzateke, tratamendu hauen aurrean, E2F7ren lokalizazioa aztertzea. DNAREN konponketarako oso garrantzitsua da proteinen kokapen espaziala, beraz aztertzeke dago ea E2F7k konponketa proteina hauekin kolokalizatzen duen ala ez.

Beste aldetik oso interesgarria izango litzateke deskribatutako efektu hau ziklo zelularrean aztertzea.

6. Erreferentziak

- Alla, V., Engelmann, D., Niemetz, A., Pahnke, J., Schmidt, A., Kunz, M., ... Pützer, B. M. (2010). E2F1 in Melanoma Progression and Metastasis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 127–133.
- Ginsberg, D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Letters*, 529(1), 122–5.
- Johnson, D. G., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 3, d447-8.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152–1158.
- McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Martin, N. M. B., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2005). BRCA2-deficient CAPAN-1 cells are extremely sensitive to the inhibition of Poly (ADP-Ribose) polymerase: an issue of potency. *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 934–6.
- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., ... Taipale, J. (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nature Communications*, 6(1), 10050.
- Wang, L. C., & Gautier, J. (2010). The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(5), 424–39.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honen emaitzak Jon Vallejo-Rodríguez-en tesi doktoralaren ondorio dira. Jon Vallejo-Rodríguezek UPV/EHU-ko diru laguntza predoktorala jaso du (PIF 2014). Ana María Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2012-33551 and SAF2015-67562-R) eta UPV/EHU-ko (UFI11/20) diru laguntzak jaso ditu.