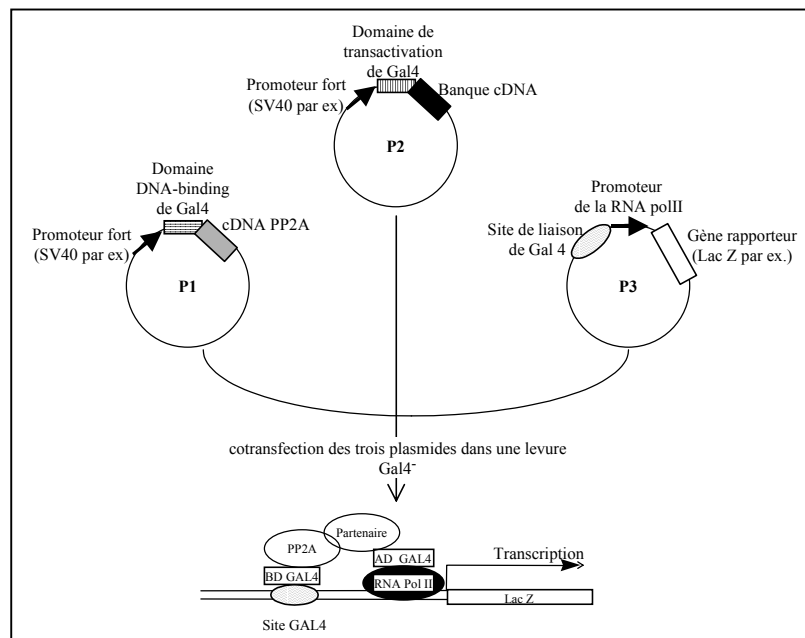


3L5BMCM - Examen de Biotechnologie Moléculaire
Février 2004 - Durée 2h30

La protéine phosphatase humaine PP2A (48kDa) est une enzyme intervenant dans de nombreux systèmes de régulation cellulaire. Certains partenaires de cette enzyme ont déjà été clonés et sont référencés dans des banques de données, mais différents résultats expérimentaux suggèrent qu'il existe d'autres protéines capables d'interagir avec PP2A. La stratégie développée dans ce problème a pour objectif de rechercher ces nouveaux partenaires.

1- On dispose du cDNA de PP2A et la technique du Double Hybride a été retenue pour la recherche de ces partenaires.

A l'aide d'un schéma vous exposerez le principe du Double Hybride utilisé ici. (3pts)



2- Vous venez de terminer votre criblage et vous avez choisi 10 clones, parmi les clones positifs. Pour éliminer les clones déjà référencés comme partenaires de la PP2A, vous faites une analyse *in silico* (par informatique).

Décrire les principales étapes de cette stratégie d'analyse? (1 pt)

Les cDNA des clones sont séquencés (Méthode de Sanger).

On recherche ensuite les ORF de chaque cDNA à l'aide d'un logiciel ad hoc (Traduction multiple sur Infobiogen par ex)

Les séquences protéiques obtenues sont comparées à celles présentes dans les banques protéiques généralistes (Prog. BLAST).

Les résultats obtenus permettent d'exclure les partenaires déjà connus et clonés.

3- Quatre clones pouvant correspondre à de nouveaux partenaires protéiques pour PP2A sont retenus pour la suite des travaux. Pour vérifier qu'il ne s'agit pas de faux positifs on décide de tester l'interaction de chacune de ces protéines avec PP2A, en utilisant une autre stratégie que le double hybride.

Décrire une autre méthode qui permettrait de vérifier cette interaction ? (2pts)

On peut reprendre l'expérience décrite en question 5. Sous cloner ces partenaires dans des vecteurs d'expression avec un Tag His et faire un pull down avec de la PP2A recombinante suivi d'un SDS PAGE.

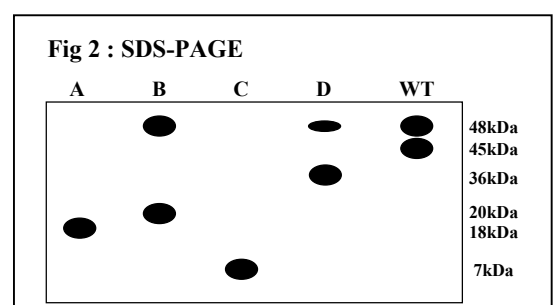
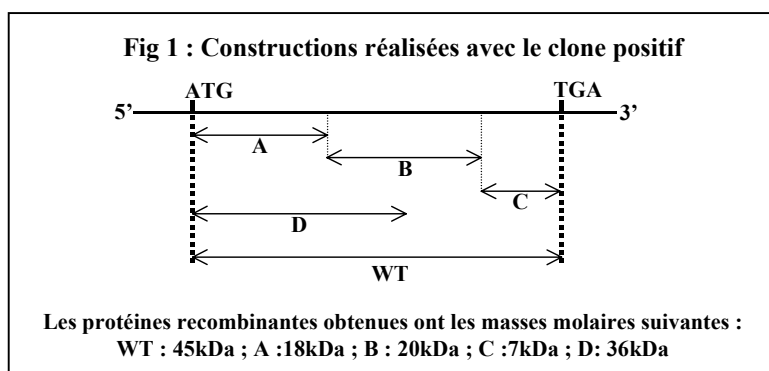
D'une manière générale, tout expérience utilisant ces partenaires comme cibles (après les avoir produits et purifiés) et qui met en évidence une interaction avec PP2A permettra d'exclure les faux positifs.

4- Votre criblage vous révèle que trois protéines sur les quatre correspondent en fait à des faux positifs.

Proposez deux hypothèses permettant d'expliquer l'obtention de faux positifs sélectionnés par la technique du double hybride. (2pts)

- **Le partenaire se lie directement à l'ADN et active la transcription**
- **Le partenaire se lie à l'ADN par l'intermédiaire d'une protéine de la levure et active la transcription**
- **Le partenaire interagit avec PP2A par l'intermédiaire d'une protéine de la levure**
- **Le partenaire se fixe directement sur le site de fixation de Gal 4**
- **PP2A active directement la transcription (peu probable car tous les clones seraient positifs)**
- **PP2A fixe une protéine de la levure qui active la transcription (peu probable car tous les clones seraient positifs)**

5- Le clone positif restant est analysé. On réalise des sous-clonages de différentes parties de ce clone (fig. 1). Ces sous-clonages sont réalisés dans un vecteur d'expression procaryote permettant d'ajouter un Tag Histidine à la protéine. Chaque protéine recombinante produite est testée dans une expérience de Pull Down avec PP2A purifiée. Un témoin positif d'interaction est réalisé avec la protéine complète -WT. Les résultats des différents Pull Down sont analysés sur SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie (fig. 2).



Interprétez cette expérience ? (4pts)

On teste dans cette expérience de Pull Down la capacité de différentes parties de partenaire d'interagir avec PP2A. Par rapport au témoin (WT) la construction B est celle contenant le domaine d'interaction avec PP2A. La construction D n'en contient qu'une partie et présente une affinité plus faible que B vis à vis de PP2A.

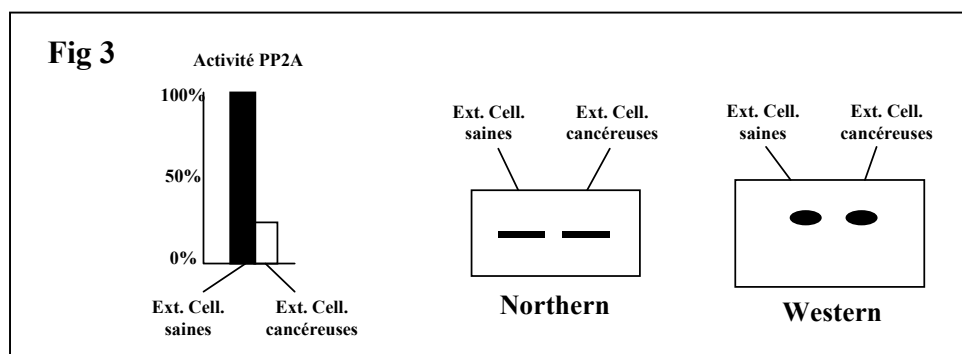
Hypothèses :

- délétion d'une partie du domaine d'interaction avec PP2A

- la partie manquante stabilise PP2A

Les autres domaines du partenaires n'interviennent pas dans cette reconnaissance.

6- Dans des cellules cancéreuses colorectales, on a trouvé un défaut de déphosphorylation de différentes protéines. On analyse donc la présence mais aussi l'activité de la PP2A dans ces cellules saines et cancéreuses (fig. 3).



Interprétez ces expériences. (4pts)

L'ARNm de PP2A est accumulé de manière identique dans les cellules saines et cancéreuses et aucune variation de taille n'est détectable.

En Western on ne met pas non plus de différence en évidence sur la taille et la quantité de la protéine PP2A.

Par contre, l'activité de PP2A est clairement plus faible dans les cellules cancéreuses.

Ces deux premières expériences permettent d'exclure une régulation post-transcriptionnelle ou traductionnelle de PP2A.

L'énoncé suggère un éventuel défaut de déphosphorylation dans les cellules cancéreuses. Celui ci ne serait pas détectable en western, mais pourrait expliquer les résultats obtenus pour l'activité de cette enzyme.

7- L'analyse de la masse molaire de la PP2A par spectroscopie de masse (MALDI-TOF) ne permet pas de détecter de modifications de cette protéine, quel que soit le type cellulaire analysé. On décide donc

d'analyser le partenaire protéique précédemment isolé (question 5). La technique choisie pour cela est la RT-PCR (fig. 4). Les amorces choisies pour réaliser cette RT-PCR encadrent l'ORF du partenaire, la matrice est une solution d'ARN de cellules cancéreuses et saines.

Interprétez ces données. (2pts)

L'expérience de MALDI-TOF permet d'exclure une modification post-traductionnelle même minime de PP2A (phosphorylation par ex). On s'intéresse donc au partenaire pour trouver l'origine de cette différence d'activité de PP2A entre les deux types cellulaires.

En RT-PCR, avec des amorces encadrant l'ORF, on a une nette

différence de taille de l'ARNm entre les deux types cellulaires. Il manque donc une partie de l'ORF du partenaire de PP2A dans les cellules cancéreuses. Cette délétion entraîne un raccourcissement de la protéine partenaire soit sans modification du cadre de lecture, soit en modifiant ce dernier (introduction d'un codon stop).

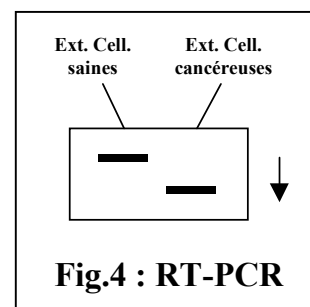


Fig.4 : RT-PCR

En vous appuyant sur les résultats de la question 5, proposez des hypothèses permettant d'expliquer la différence d'activité de la PP2A dans les cellules cancéreuses. (1pt)

Puisque dans les cellules cancéreuses il reste environ 25% de l'activité de PP2A (fig 6), il semble que le partenaire non modifié joue un rôle activateur sur l'activité phosphatase de PP2A dans les cellules saines. Les données de la question 5 permettent de formuler une hypothèse simple pour expliquer cette différence d'activité : la délétion de la protéine partenaire entraîne une perte partielle du site d'interaction du partenaire avec PP2A. L'affinité résiduelle de cette protéine mutée correspondrait à ce que l'on observe avec le sous clone D (fig 1 et 2). Cette perte partielle d'affinité ne permettrait alors que de conserver 25% de l'activité de PP2A. Cette modification du partenaire donc donc se faire sans changement du cadre de lecture.

Quelles expériences complémentaires permettraient de valider ces hypothèses ? (1pt)

L'expérience la plus simple consisterait à cloner le fragment amplifié obtenu dans les cellules cancéreuses et à le séquencer. On obtiendrait ainsi la séquence de la région délétée qui doit correspondre à l'extrémité 3' du sous clone B.

On pourrait vérifier fonctionnellement cette hypothèse en réalisant une expérience de déphosphorylation *in vitro* après avoir produit les protéines recombinantes correspondant aux partenaires sauvage et délété. Il suffirait de comparer l'activité de PP2A seul ou en présence de chacune des deux formes du partenaire.