

Université de Montréal

**Étude du mécanisme de régulation de la sénescence et de
p53 par la protéine SOCS1**

par

Viviane Calabrese

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

Janvier, 2012

© Viviane Calabrese, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude du mécanisme de régulation de la sénescence et de p53 par la protéine SOCS1

Présentée par :
Viviane Calabrese

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Bouvier, président-rapporteur
Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche
Éric Cohen, membre du jury
Jacques Côté, examinateur externe
Elliot Drobetsky, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les mécanismes cellulaires anti-prolifératifs, lesquels comprennent l'apoptose, aussi appelée la mort cellulaire programmée, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et la sénescence, permettent à la cellule de prévenir, en réponse à différents stress, l'accumulation de mutations pouvant conduire à une prolifération incontrôlée et, éventuellement, au développement d'une tumeur. La régulation de ces différents mécanismes requiert l'activation de protéines appelées des suppresseurs de tumeur, dont le principal est p53. p53 est un facteur de transcription dont la stabilisation et l'activation conduit à une hausse de l'expression de gènes directement impliqués dans l'arrêt de la prolifération. Au cours des dernières années, l'ensemble des travaux sur p53 ont permis de mettre en évidence la complexité de sa fonction, de même que la multitude de voies de signalisation et de protéines avec lesquelles il coopère pour maintenir l'intégrité du génome. De ce fait, l'étude des mécanismes d'activation de p53 est de mise pour la compréhension de sa régulation et, éventuellement, pour la prévention et l'élaboration de nouvelles stratégies de traitement contre le cancer.

L'objet de cette thèse est la mise en évidence d'un mécanisme d'activation de p53 et de la sénescence par la protéine SOCS1, un suppresseur de la signalisation par les cytokines. Ce mécanisme implique une interaction directe entre les deux protéines, plus précisément entre le domaine SH2 de SOCS1 et le domaine de transactivation de p53. SOCS1 interagit également, au niveau de son SOCS Box, avec les kinases ATM et ATR de la voie du dommage à l'ADN de façon à faciliter la phosphorylation de p53 en sérine 15. Ainsi, en interagissant à la fois avec p53 et ATM/ATR, SOCS1 contribue à la stabilisation et à l'activation de p53. En accord avec ce modèle, l'inhibition de SOCS1 dans des fibroblastes humains normaux tend à diminuer le nombre de cellules sénescents suite à l'expression de l'oncogène ca-STAT5A et à réduire l'accumulation nucléaire de p53 dans ces cellules. De la même façon, les lymphocytes T provenant de souris *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* sont moins susceptibles d'entrer en apoptose que les lymphocytes provenant de souris

Socs1^{+/+}*Ifnγ*^{+/+}, suite à une exposition à des radiations. Dans les deux contextes, on observe une baisse de l'expression des gènes cibles de p53, ce qui démontre que SOCS1 est impliquée dans l'activation de p53 *in vivo*.

Cette thèse a également pour but de mettre en évidence l'implication de SOCS1 dans l'activation d'autres facteurs de transcription et, par le fait même, de démontrer qu'elle peut agir comme un régulateur plus général de la transcription. Une étude approfondie de l'interaction entre SOCS1 et p53 a permis de démontrer que le domaine de transactivation II de p53 (acides aminés 36-67) est suffisant pour l'interaction. Plus précisément, il semble que le tryptophane 53 (W53) et la phénylalanine 54 (F54) sont les principaux résidus impliqués. Une analyse structurale de ce domaine de p53 a conduit à l'identification d'un motif conservé dans plusieurs autres facteurs de transcription pourvus d'un domaine de transactivation acide, dont p63, p73 et E2F1. En accord avec ces résultats, SOCS1 est en mesure d'interagir avec chacune des deux protéines. Ainsi, la capacité de SOCS1 d'interagir et de réguler l'activité de p53 peut s'étendre à d'autres facteurs de transcription.

En terminant, le mécanisme présenté dans cette thèse contribue à la compréhension de la régulation de p53, le principal suppresseur de tumeur de la cellule. De plus, il met en évidence une nouvelle fonction de SOCS1, laquelle était jusqu'alors essentiellement connue pour inhiber la voie de signalisation JAK/STAT. Ce nouveau rôle pour SOCS1 permet d'expliquer de quelle manière une activation aberrante de la signalisation par les cytokines peut déclencher la sénescence ou l'apoptose. Enfin, le fait que SOCS1 puisse réguler différents facteurs de transcription permet de la qualifier de régulateur général des facteurs de transcription composés d'un domaine de transactivation acide.

Mots-clés : p53, SOCS1, sénescence cellulaire, cancer, ATM, ATR, réponse au dommage à l'ADN, voie de signalisation JAK/STAT, STAT5A, interaction protéine-protéine

Abstract

In response to different stress, three anti-proliferative mechanisms, namely apoptosis, also called programmed cell death, transient growth arrest and senescence, prevent the cells from cumulating mutations that can lead to uncontrolled proliferation and, eventually, to tumor development. Regulation of these mechanisms requires the activation of proteins called tumor suppressors. One of them, p53, is a transcription factor whose stabilization and activation lead to an increase in expression of genes directly implicated in cell cycle arrest. In the past years, studies about p53 showed how much its function is complex and with how many signaling pathways and proteins it cooperates to maintain genome integrity. Thus, studying the activation mechanisms of p53 is essential to understand its regulation and, thereby, to prevent tumor development and to elaborate new strategies for cancer treatment.

The first aim of this thesis is to show a new activation mechanism of p53 and of senescence by the protein SOCS1, a suppressor of cytokine signaling. This mechanism implies a direct interaction between the two proteins, specifically between the SH2 domain of SOCS1 and the N-terminal transactivation domain of p53. SOCS1 also interacts with the DNA damage-regulated kinases ATM and ATR via its C-terminal domain, which contains a SOCS Box, to facilitate the phosphorylation of p53 on its serine 15. Thus, by interacting at the same time with p53 and ATM, SOCS1 contributes to stabilization and activation of p53. In accordance with this model, SOCS1 inhibition in human normal fibroblasts decreases the number of senescent cells in which the activated oncogene STAT5A is expressed and reduces p53 nuclear accumulation in these cells. In the same way, T cells from *Socs1*^{-/-}*Ifn*γ^{-/-} mice are less likely to undergo apoptosis than T cells from *Socs1*^{+/+}*Ifn*γ^{+/+} mice, after exposure to γ radiation. In both contexts, the expression of p53 target genes is decreased, which indicates that SOCS1 is implicated in p53 activation *in vivo*.

This thesis also aims to show the role of SOCS1 in the activation of other transcription factors and, thereby, to show that it can act as a more general regulator of transcription. A detailed study of the interaction between SOCS1 and p53 showed that the transactivation domain II of p53 (amino acids 36-67) is sufficient for the interaction. Specifically, it seems that tryptophan 53 (W53) and phenylalanine 54 (F54) are essential for the interaction. A structural analysis of this p53 region highlights an acid transactivation domain actually conserved in many others transcription factors, such as p63, p73 and E2F1. In accordance with this observation, SOCS1 is able to interact with both proteins. Thus, the capacity of SOCS1 to interact with p53 and to regulate its activity may extend to other transcription factors.

The mechanism showed in this thesis contributes to the understanding of p53 regulation and highlights a new function for the SOCS1 protein. Indeed, until now, SOCS1 was mostly known to be a negative regulator of the JAK/STAT pathway. Moreover, this new role for SOCS1 explains how an aberrant cytokine signaling can trigger senescence or apoptosis. Finally, the fact that SOCS1 can regulate different transcription factors allows us to consider it as a general regulator of transcription factors containing an acid transactivation domain.

Keywords : p53, SOCS1, cellular senescence, cancer, ATM, ATR, DNA damage response, JAK/STAT pathway, STAT5A, protein-protein interaction

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements	xviii
1 Introduction	1
1.1 Avant-propos	2
1.2 La transformation maligne et le cancer	2
1.2.1 La transformation maligne.....	3
1.2.2 Les caractéristiques des cellules tumorales	4
1.3 Le suppresseur de tumeur p53	6
1.3.1 Les domaines protéiques caractéristiques de p53	6
1.3.2 L'activité transcriptionnelle de p53.....	10
1.3.3 Les modifications post-traductionnelles de p53.....	13
1.3.4 MDM2 et MDM4, les principaux régulateurs négatifs de p53	18
1.3.5 Les autres membres de la famille de p53, p63 et p73, et les isoformes de p53	21
1.4 La sénescence cellulaire	23
1.4.1 Qu'est-ce que la sénescence cellulaire?.....	24
1.4.2 Les caractéristiques des cellules sénescents.....	25
1.4.3 L'implication de la réponse au dommage à l'ADN dans la sénescence.....	28
1.4.3.1 La voie du dommage à l'ADN	28
1.4.3.2 L'importance de la voie du dommage à l'ADN dans la sénescence	36
1.4.4 Le rôle des suppresseurs de tumeur p53 et Rb dans la sénescence	38
1.4.4.1 La voie de p53 dans la sénescence	38

1.4.4.2	La voie de p16/Rb dans la sénescence	40
1.4.5	L'importance de la sénescence <i>in vivo</i>	42
1.4.6	Le caractère sécrétoire des cellules sénescents ou le SASP	43
1.4.6.1	Les effets bénéfiques du SASP	44
1.4.6.2	Les effets délétères du SASP	45
1.4.6.2.1	Le SASP et les maladies chroniques associées au vieillissement.....	45
1.4.6.2.2	Le SASP et la transformation maligne.....	46
1.4.7	Résumé du concept de la sénescence cellulaire	47
1.5	Les cytokines et la voie de signalisation JAK/STAT.....	48
1.5.1	La voie de signalisation JAK/STAT.....	48
1.5.2	La régulation négative de la voie JAK/STAT.....	50
1.5.3	La famille des SOCS	51
1.5.3.1	La protéine SOCS1	52
1.5.3.2	L'activité ubiquitine ligase de SOCS1.....	54
1.5.3.3	La régulation de l'expression de SOCS1	56
1.5.3.4	L'inhibition de SOCS1 par miR155	57
1.5.3.5	L'activité anti-tumorale de SOCS1	58
1.5.3.6	SOCS1 et la signalisation par l'interféron- γ	60
1.5.3.7	La localisation nucléaire de SOCS1	61
1.5.4	ca-STAT5A, une forme oncogénique de la protéine STAT5A	62
1.6	Les objectifs de la thèse.....	63
2	La protéine SOCS1 permet de relier la signalisation par les cytokines au	
	suppresseur de tumeur p53 et à la sénescence	65
2.1	Présentation de l'article 1	66
2.2	Article 1	67
2.2.1	Abstract.....	68
2.2.2	Introduction.....	69
2.2.3	Results.....	70

2.2.4	Discussion	79
2.2.5	Concluding remarks.....	81
2.2.6	Materials and Methods	82
2.2.7	Acknowledgements	84
2.2.8	References.....	85
2.2.9	Legends.....	92
2.2.10	Figures	96
2.2.11	Supplementary Data	103
2.2.11.1	Supplementary Material and Methods.....	103
2.2.11.2	Supplementary References.....	110
2.2.11.3	Supplementary Legends.....	112
2.2.11.4	Supplementary Figures and Tables.....	115
3	SOCS1, un régulateur commun aux facteurs de transcription composés d'un domaine de transactivation acide.....	125
3.1	Présentation de l'article 2.....	126
3.2	Article 2.....	127
3.2.1	Introduction.....	128
3.2.2	Results.....	129
3.2.3	Discussion.....	131
3.2.4	Materials and Methods	132
3.2.5	References.....	135
3.2.6	Legends.....	139
3.2.7	Figures	141
4	Discussion.....	147
4.1	Résumé des résultats décrits aux chapitres 3 et 4	148
4.2	SOCS1, un nouveau régulateur de p53	149
4.3	SOCS1 agit comme un interrupteur moléculaire.....	150

4.4	Le complexe p53/SOCS1/ATM : cytoplasmique ou nucléaire ?.....	153
4.5	SOCS1 comme activateur de p53 : un rôle indépendant ou complémentaire de sa fonction de rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT ?	154
4.6	Le SOCS box : un domaine à plusieurs fonctions	155
4.7	L'implication de SOCS1 dans la voie du dommage à l'ADN.....	155
4.8	SOCS1, un régulateur commun à plusieurs facteurs de transcription.....	157
4.9	SOCS1 est impliquée dans le développement de maladies chroniques associées au vieillissement.....	160
4.10	Conclusion générale	162
Bibliographie.....		i

Liste des tableaux

Chapitre 1 Introduction

Tableau 1.1 Répertoire des modifications post-traductionnelles de p53 humain. 15

Tableau 1.2 Liste des principaux facteurs du SASP..... 44

Chapitre 2 Article 1

Supplementary Table 2.1 Genes found deregulated during STAT5-induced senescence*.
..... 123

Chapitre 3 Article 2

Table 3.1 Identification of transcription factors which could potentially interact with
SOCS1..... 144

Chapitre 4 Discussion

Tableau 4.1 Identification, par spectrométrie de masse, de nouveaux partenaires
d'interaction de SOCS1*..... 157

Liste des figures

Chapitre 1 Introduction

Figure 1.1 Représentation schématique des différents domaines protéiques de p53 humain.	8
Figure 1.2 Représentation tridimensionnelle de la structure du domaine de tétramérisation (TD) de p53 humain.	10
Figure 1.3 Représentation schématique des principaux domaines protéiques de MDM2 et MDM4 humains.	20
Figure 1.4 Représentation schématique du gène p53 humain.	23
Figure 1.5 Schéma général des différentes classes de protéines impliquées dans la réponse au dommage à l'ADN.	30
Figure 1.6 Représentation schématique des différents domaines protéiques des kinases ATM et ATR.	32
Figure 1.7 L'activation du point de contrôle G1/S par les kinases ATM et ATR.	34
Figure 1.8 Schéma représentatif du mécanisme d'activation d'ATM.	35
Figure 1.9 Le cycle cellulaire.	39
Figure 1.10 Représentation schématique du locus INK4b-ARF-INK4a.	41
Figure 1.11 Les voies de p53 et p16/Rb dans la sénescence.	42
Figure 1.12 La voie de signalisation JAK/STAT.	49
Figure 1.13 Représentation schématique des différents domaines protéiques de SOCS1.	53
Figure 1.14 Le complexe d'ubiquitination formé par SOCS1.	54

Chapitre 2 Article 1

Figure 2.1 SOCS1 in STAT5-induced senescence.	96
Figure 2.2 <i>Socs1</i> null mice have defects in p53 pathways.	97
Figure 2.3 SOCS1 induces cellular senescence.	98
Figure 2.4 SOCS1 stimulates the transcriptional activity of p53.	99

Figure 2.5 SOCS1 directly interacts with p53.....	100
Figure 2.6 SOCS1 interacts with ATM and ATR.	101
Figure 2.7 Cellular localization of SOCS1.....	102
Supplementary Figure 2.1 The suppressor of cytokine family in STAT5-induced senescence.	115
Supplementary Figure 2.2 SOCS1 inhibits cell proliferation and activates p53 in U2OS cells.	116
Supplementary Figure 2.3 Senescence markers in SOCS1-induced senescence.	117
Supplementary Figure 2.4 SOCS1 activates p53 in reporter assays.....	118
Supplementary Figure 2.5 Interaction of SOCS1 and p53.....	119
Supplementary Figure 2.6 Phosphotyrosine-binding independent functions of SOCS1.	120
Supplementary Figure 2.7 Interaction of SOCS1 and phosphoATM ^{Ser1981}	121
Supplementary Figure 2.8 <i>Socs1</i> null CD8 SP cells have a dramatic defect in the p53-dependent cell death response.	122

Chapitre 3 Article 2

Figure 3.1 SOCS1 interacts with the TAD-II of p53.....	141
Figure 3.2 Tryptophan 53 and phenylalanine 54 of p53 are important for its interaction with SOCS1.....	142
Figure 3.3 SOCS1 interacts with transcription factors p63, p73 and E2F1.....	143
Supplementary Figure 3.1 ΔNp53 overexpression in U2OS cells.....	145
Supplementary Figure 3.2 The interaction between SOCS1 and p53 does not depend of the residues that are important for its interaction with JAK2.....	146

Chapitre 4 Discussion

Figure 4.1 Modèle décrivant les différentes fonctions de SOCS1 selon le contexte cellulaire.....	165
---	-----

Liste des abréviations

ABL1 (v-Abl)	<i>c-Abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
ARF	<i>Alternative reading frame</i>
ASB	<i>Ankyrin repeat and SOCS box containing</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BBC3 (PUMA)	<i>BCL2 binding component 3</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
CARM1	<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
ca-STAT5A	<i>Constitutively activated-STAT5A</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CDC6	<i>Cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)</i>
CDC25	<i>Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CDKN1A (p21, CIP1)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A (p16)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B (p15)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CDL	<i>Cullin-dependent ubiquitin ligase</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CISH (CIS)	<i>Cytokine inducible SH2-containing protein</i>
CREBBP (CBP)	<i>CREB binding protein</i>
CTD	<i>C-terminal domain</i>
CSF1	<i>Colony stimulating factor 1</i>

CSF1R (FMS)	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CUL	<i>Cullin</i>
CXCL1 (GRO α)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DAPI	<i>4'-6'-diamidino-2-phenylindole</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DSB	<i>Double-strand break</i>
ECS	<i>Elongin B/C—CUL2—SOCS-box protein complex</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eIF4EBP	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i>
EP300 (p300)	<i>E1A binding protein p300</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
FAT	<i>FRAP, ATM, TRRAP</i>
FATC	<i>FRAP, ATM, TRRAP C-terminal</i>
FLT3	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i>
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GADD45 α	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFI-1B	<i>Growth factor independent 1B transcription repressor</i>
GLB1	<i>Galactosidase, beta 1</i>
GTF2A (TFIIA)	<i>General transcription factor IIA</i>
GTF2D (TFIID)	<i>General transcription factor IID</i>
GTF2H (TFIIH)	<i>General transcription factor IIH</i>
H2A.Z	<i>H2A histone family, member Z</i>
H2A.X	<i>H2A histone family, member X</i>
HAT	<i>Histone acetyl-transférase</i>
HDAC1	<i>Histone deacetylase 1</i>
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>

HTLV-1	<i>Human T cell leukemia virus type 1</i>
IFN α	<i>Interferon alpha</i>
IFN γ	<i>Interferon gamma</i>
IFNGR	<i>Interferon gamma receptor</i>
IGFBP7	<i>Insulin-like growth factor binding protein 7</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JAB	<i>JAK-binding protein</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KAT2A (GCN5)	<i>K(lysine) acetyltransferase 2A</i>
KAT2B (PCAF)	<i>K(lysine) acetyltransferase 2B</i>
KAT5 (TIP60)	<i>K(lysine) acetyltransferase 5</i>
KAT8 (hMOF)	<i>K(lysine) acetyltransferase 8</i>
KIR	<i>Kinase inhibitory region</i>
KIT (c-Kit)	<i>v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRAB	<i>Kruppel-associated box</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK8 (JNK1)	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MAPK14 (p38)	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA-damage checkpoint 1</i>
MDM2	<i>Transformed 3T3 cell double minute 2</i>
MDM4 (MDMX)	<i>Transformed 3T3 cell double minute 4</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
miARN	<i>MicroARN</i>
miR155	<i>MicroARN 155</i>
MOS	<i>Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
MRE11	<i>Meiotic recombination 11 homolog (S. cerevisiae)</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>

NF κ B	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
OIS	<i>Oncogene-induced senescence</i>
PAI1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PIC	<i>Pre-initiation complex</i>
PKB (AKT)	<i>Protein kinase B</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
PPM1D (WIP1)	<i>Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D</i>
PPP1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PPP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PRKA (AMPK)	<i>Protein kinase, AMP-activated</i>
PRKD (DNA-PK)	<i>Protein kinase, DNA-activated</i>
PRMT1	<i>Protein arginine methyltransferase 1</i>
PTB	<i>Protein tyrosine binding</i>
RB1 (Rb)	<i>Retinoblastoma 1</i>
RBX	<i>RING finger-containing protein</i>
RNAPII	<i>RNA polymerase II</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
SA- β -gal	<i>Senescence-associated-β-galactosidase activity</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>

SCF	<i>SKP1—CUL1—F-box protein</i>
SDF	<i>Senescence-associated DNA-damage foci</i>
SH2	<i>Src homology 2 domain</i>
SHC	<i>(Src homology 2 domain containing) transforming protein</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SSB	<i>SPRY domain-containing proteins with a SOCS box</i>
SSI	<i>STAT-induced STAT inhibitor</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAD	<i>Transactivation domain</i>
TADA2B	<i>Transcriptional adaptor 2B</i>
TAF1	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor 1</i>
TAF9	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor 9</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TD	<i>Tetramerization domain</i>
TOPBP1	<i>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>
TP53 (p53)	<i>Tumor protein p53</i>
TP53BP1 (53BP1)	<i>Tumor protein p53 binding protein 1</i>
TP63	<i>Tumor protein 63</i>
TP73	<i>Tumor protein 73</i>
T _{reg}	<i>Lymphocytes T régulateurs</i>
TRIM8	<i>Tripartite motif containing 8</i>
TRIM28 (KAP1)	<i>Tripartite motif containing 28</i>
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
USP7 (HAUSP)	<i>Ubiquitin specific peptidase 7</i>
VAV1	<i>Vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>
WSB	<i>WD-40-repeat-containing proteins with a SOCS box</i>

*À Charles, Martin et Junior(e) #2, les trois
amours de ma vie...*

Remerciements

Au cours de mes années passées au doctorat, j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer plusieurs personnes sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Aussi, dans les paragraphes qui suivent, je tiens à les remercier.

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, Gerardo Ferbeyre, qui m'a généreusement accueillie dans son laboratoire. Gerardo, merci pour votre confiance, votre ouverture d'esprit et votre humanité. Sans votre persévérance, je ne serais probablement pas auteure d'un *Molecular Cell*. Votre passion pour la science fait de vous un scientifique de haut niveau, et je vous souhaite tout le succès que vous méritez. Enfin, merci pour votre patience au cours de la dernière année. Je sais que j'ai n'ai pas toujours été facile à suivre...

Je remercie également Frédérick-Antoine Mallette, mon mentor, celui qui m'a formée sur le terrain. Fred, merci pour l'excellente formation que tu m'as donnée; j'en bénéficie encore. Merci pour ta confiance et, surtout, pour avoir cru en moi dès mes débuts. Je n'oublierai jamais l'été de mon stage où j'ai eu un plaisir fou à travailler avec toi. Et, même si on s'est un peu perdu de vue (que veux-tu, la vie est ainsi faite...), je garde de merveilleux souvenirs de nos soupers entre amis.

Bien-sûr, je remercie aussi l'ensemble du laboratoire Ferbeyre. Geneviève, Xavier, Véronique, Mathieu, Emmanuelle, Marie-France et Olga, merci pour votre présence quotidienne. Avec le temps, vous êtes devenus une deuxième famille et ne plus vous voir va faire un grand vide. Gen, merci pour ton amitié. Tu es une personne attachante, authentique et vraie. Je vais m'ennuyer de notre placotage dans le bureau et de nos petites promenades vers le guichet automatique ou la plateforme de séquençage de l'IRIC. J'espère qu'on ne se perdra pas de vue et que nos (futurs) enfants pourront jouer ensemble encore longtemps... Et, bien-sûr, merci aussi à Jordan. Des soupers avec vous deux, j'en veux encore plein!!! Xavier, merci pour ton écoute, pour ton aide sur le papier, pour ton humanité. Travailler avec toi a été un réel plaisir et, surtout, fais attention à toi!!! Véro,

merci pour ta gentillesse et ta générosité. Merci également pour ton aide et tes suggestions toujours pertinentes pour l'avancée du projet. Je te considère comme une excellente scientifique et je te souhaite d'aller au bout de tes ambitions. Mathieu, merci pour ton énergie et ton enthousiasme. Je vais m'ennuyer de ta bonne humeur et de ton optimisme. Emmanuelle, merci de ta venue et de ton aide sur le projet. Je suis contente de voir que ma démotivation durant ta première année ne t'a pas découragée d'entreprendre un doctorat. Bonne chance dans tes études et, surtout, garde ta motivation. Marie-France, même si nos rapports n'ont pas toujours été des plus harmonieux, je garde le souvenir d'une femme forte et pleine de vie. Prends bien soin de toi et continue d'être à l'écoute de tes rêves. Olga, merci pour tes suggestions et tes conseils pour le papier. Tu es une travailleuse acharnée et, j'en suis sûre, tu iras loin.

Je remercie également les anciens du laboratoire que j'ai surtout côtoyés pendant mes premières années de doctorat. Merci à Vincent, Laurent, Adrian, Vickram, Catherine et Frédérique, de même qu'à tous les autres étudiants qui ont été de passage. Vincent, travailler avec toi aura été unique. Même dans mes journées les plus noires, tu as toujours réussi à me faire rire. Tu formes avec Annie-Claude et vos deux petits poux une famille adorable et j'espère continuer de vous voir pendant encore longtemps.

Je tiens aussi à remercier ma famille, sans qui je ne serais pas qui je suis. Merci à vous trois, Maman, Marie et Papa. Maman, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu fais pour moi. Merci pour ton écoute, ta générosité et ton soutien constant. Je ne sais combien de fois je t'ai appelée pour te dire à quel point j'étais tannée et découragée de ce doctorat et, à chaque fois, tu as su me reconforter et me resaisir. Marie, merci pour toutes ces conservations sur le sens de la vie, tes conseils et ton écoute. Tu es et resteras «Marie ma grande sœur» pour toujours. Papa, merci de m'avoir convaincue de ne pas abandonner le doctorat. Merci aussi pour toutes ces discussions autour d'un bon repas. Enfin, merci à Robert-Pierre et Micheline, à qui je tiens énormément.

En terminant, merci aux trois amours de ma vie, Martin, Charles et Junior(e) #2. Martin, tu sais à quel point je t'aime et je tiens à toi. Si tu n'avais pas été là, je doute que j'aurais terminé ces études. Jusqu'à la fin, tu m'as aidée, soutenue, encouragée. Tu n'as jamais cessé de croire en moi et tu m'a poussée à aller au bout de moi-même. Même si nous n'avons jamais travaillé ensemble, je te considère comme un véritable collègue. Tu as toujours été le premier au courant de mes derniers résultats. Tu es aussi parmi les scientifiques que j'estime le plus et tes conseils m'ont toujours servi. Enfin, c'est avec toi que je suis devenue maman, le rôle le plus important et le plus beau de toute ma vie. Merci de fonder une famille avec moi. Tu es un papa extraordinaire et je suis fière d'élever notre (bientôt nos...) enfant avec toi. Nous partageons une complicité unique dont j'ai toujours rêvé. Je t'aime... Charles, mon petit loup adoré. Si tu savais combien ta venue m'a changée à jamais. Tu es la plus belle chose (avec la rencontre de Papa, bien-sûr) qui me sois jamais arrivée. Tu as apporté beaucoup de bonheur pendant ces dernières années de doctorat et je t'en remercie. Grosses bises partout, partout!!! Et puis, en terminant, merci à Junior(e) #2, dont la naissance est prévue dans quelques mois. Te savoir dans mon bedon m'a motivée pour la rédaction de cette thèse, malgré les nausées et la fatigue extrême. J'ai tellement hâte de te voir... Gros bisous!!!

1 Introduction

1.1 Avant-propos

La transformation maligne, laquelle est à l'origine du développement d'une tumeur et, éventuellement, d'un cancer, touche des milliers d'individus chaque année. Afin de mieux comprendre les bases moléculaires du développement des cancers et dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies pour le traitement de cette maladie, beaucoup d'efforts sont consacrés à la compréhension des mécanismes cellulaires anti-tumoraux. Ces mécanismes sont les outils dont se sert la cellule pour prévenir et éviter une transformation maligne potentielle. Ils sont activés en réponse à différents stress, tels des dommages à l'ADN, le stress oxydatif ou, encore, l'activation d'oncogènes, et ont pour but d'interrompre la prolifération cellulaire afin d'assurer le maintien de l'intégrité du génome. Il existe différents mécanismes anti-tumoraux au sein de la cellule, lesquels sont l'apoptose, aussi appelé la mort cellulaire programmée, l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation de points de contrôle et la sénescence cellulaire. La régulation de ces différents mécanismes repose en grande partie sur l'activation de protéines appelées suppresseurs de tumeur, dont le principal est la protéine p53.

L'objet de cette thèse est la mise en évidence d'un mécanisme d'activation de p53 et de la sénescence par la protéine SOCS1, un suppresseur de la signalisation par les cytokines. Afin de faciliter la compréhension des résultats qui y sont présentés et leur impact, ce premier chapitre se consacre à la description des principaux éléments qui constituent cette thèse. Ainsi, on y retrouve une description détaillée du suppresseur de tumeur p53, de la sénescence cellulaire et de la protéine SOCS1.

1.2 La transformation maligne et le cancer

Lorsqu'une cellule est soumise à certains stress (raccourcissement des télomères, dommages à l'ADN, stress oxydatif, activation d'oncogènes), des mécanismes de défense sont mis en place afin d'éviter qu'elle n'accumule des mutations pouvant conduire à la transformation maligne ^[1]. Ces mécanismes ont pour but d'interrompre la prolifération

cellulaire afin d'assurer le maintien de l'intégrité du génome d'une génération à l'autre ^[1, 2]. Cependant, certaines cellules, en réponse aux mêmes stress, continuent de proliférer. Ces cellules, dites transformées, sont devenues insensibles à toute forme de stress susceptible de compromettre leur matériel génétique et, à mesure qu'elles se divisent, accumulent des mutations qui favorisent leur potentiel prolifératif ^[1]. À un certain point, cette prolifération cellulaire incontrôlée mène à la formation d'un amas de cellules au sein d'un tissu donné; on parle alors de la formation d'une tumeur et, éventuellement, du développement d'un cancer.

1.2.1 La transformation maligne

Le passage d'une cellule de l'état normal à l'état transformé, ou tumoral, résulte essentiellement d'une combinaison d'événements génétiques ^[1, 2]. Plus précisément, la transformation maligne découle d'une accumulation de mutations aléatoires et spontanées dans différents gènes (généralement au-delà de dix) au sein d'une même lignée cellulaire. Ces mutations confèrent à la cellule et à sa descendance un avantage sélectif par rapport aux cellules environnantes et, par le fait même, un avantage prolifératif.

Il est important de souligner que la transformation maligne est à l'origine d'une unique cellule anormale et que la mutation initiale acquise par cette cellule n'est pas suffisante pour mener au développement d'une tumeur. Seule l'accumulation d'autres mutations au sein de la même lignée cellulaire donne à celle-ci le potentiel de devenir cancéreuse ^[1, 2].

Précisons également que toutes les mutations qui se produisent chez un organisme n'ont pas un potentiel tumoral. En effet, au nombre de mutations qui se produisent à chaque cycle de réplication, nous ne serions pas viables si elles avaient toutes un pouvoir transformant ^[1]. Seules certaines d'entre elles présentent un réel avantage sélectif et c'est précisément ce genre de mutations qui sont à l'origine du développement d'un cancer.

Ainsi, la transformation maligne se définit comme l'aboutissement d'une combinaison unique de perturbations génétiques indépendantes et rares qui se produisent à travers une longue série de cycles de réplication et au sein d'une même lignée cellulaire.

1.2.2 Les caractéristiques des cellules tumorales

Les cellules tumorales à l'origine d'un cancer se caractérisent par deux propriétés génétiquement transmissibles ^[1]. La première est qu'elles ne répondent plus aux règles restrictives normales de la division cellulaire, c'est-à-dire qu'elles prolifèrent de façon anarchique. La deuxième est qu'elles ont le pouvoir d'envahir et de coloniser des régions de l'organisme normalement réservées à d'autres cellules. Ainsi, elles prolifèrent au détriment des cellules spécialisées d'un tissu donné et, par conséquent, elles compromettent le bon fonctionnement.

Outre ces deux propriétés générales, les cellules tumorales partagent plusieurs caractéristiques qui expliquent leur comportement. Tout d'abord, elles sont génétiquement instables, c'est-à-dire qu'elles accumulent des mutations à une vitesse beaucoup plus rapide que les cellules normales ^[3]. Cette mutagenèse accélérée s'explique principalement du fait que, chez les cellules transformées, les voies de signalisation qui assurent normalement le maintien de l'intégrité du génome (principalement les mécanismes de réparation de l'ADN) sont altérées. Aussi, les cellules tumorales sont plus susceptibles de subir des translocations chromosomiques pouvant mener à une désorganisation de leur caryotype ^[1]. Cependant, il est important de comprendre qu'une trop grande instabilité génétique ne permettrait pas à ces cellules de survivre ^[1]. Seule la combinaison de cette instabilité génétique avec des mutations conférant un avantage sélectif et prolifératif permet le maintien du statut tumoral de ces cellules.

L'avantage prolifératif des cellules tumorales est à l'origine d'une autre de leur caractéristique. Il s'agit de l'anomalie fréquente qu'elles présentent au niveau de leurs mécanismes de contrôle de la mort et de la différenciation cellulaire ^[1]. Dans un tissu adulte

normal, les cellules peuvent proliférer continuellement sans que leur nombre change parce que la prolifération cellulaire est contrebalancée par la perte cellulaire. L'apoptose, laquelle correspond à une mort cellulaire programmée, joue un rôle essentiel dans le maintien de cet équilibre. Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales sont relativement résistantes à l'apoptose, ce qui engendre une accumulation du nombre de cellules dans la population ^[1]. De la même façon, les cellules tumorales possèdent des mutations qui les empêchent de se différencier ^[1]. Par conséquent, elles prennent l'allure de cellules atypiques capables de se diviser indéfiniment (généralement, les cellules différenciées cessent de proliférer jusqu'à leur mort).

Enfin, les cellules tumorales ont la capacité de métastaser, c'est-à-dire de quitter le tissu d'origine au sein duquel elles se sont développées pour envahir et coloniser d'autres tissus de l'organisme ^[1]. Afin d'y parvenir, elles doivent se détacher de la tumeur primaire dont elles proviennent, pénétrer un vaisseau sanguin ou lymphatique afin d'atteindre la circulation systémique pour finalement s'implanter au sein d'un nouveau tissu. Cette capacité des cellules tumorales de métastaser repose, encore une fois, sur l'ensemble des anomalies prolifératives et de survie qu'elles possèdent.

En résumé, les mutations accumulées au sein d'une cellule tumorale lui permettent d'échapper aux règles restrictives de prolifération, de survivre plus facilement et de métastaser. La capacité des cellules tumorales à former des métastases est probablement ce qui contribue le plus à compliquer le contrôle et l'éradication des cancers. Aussi, l'accumulation de mutations toujours nouvelles au sein d'une lignée tumorale rend difficile son ciblage précis et la compréhension des mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine. On comprend alors pourquoi tant d'efforts sont consacrés à la recherche sur le cancer, d'autant plus que cette maladie touche des milliers d'individus chaque année.

1.3 Le suppresseur de tumeur p53

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, la cellule est dotée de mécanismes anti-prolifératifs qui ont pour but de prévenir la transformation maligne. Ces mécanismes dépendent de l'action des suppresseurs de tumeur, lesquels sont en mesure de freiner la prolifération cellulaire. La protéine p53, le suppresseur de tumeur le plus étudié, est un facteur de transcription considéré comme le gardien du génome ^[4]. En effet, en réponse à différents stress (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, hypoxie), p53 est stabilisée, le plus souvent par modifications post-traductionnelles, et peut alors activer la transcription de ses gènes cibles, lesquels permettent d'enclencher différentes réponses anti-prolifératives, tels l'apoptose, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et la sénescence ^[2]. Le fait que p53 soit mutée et inactivée dans près de 50% des tumeurs contribue à la considérer comme un joueur essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome ^[5]. Dans cette section, une description détaillée de la structure et de la fonction de p53 est présentée de façon à comprendre comment elle agit en tant que suppresseur tumoral.

1.3.1 Les domaines protéiques caractéristiques de p53

p53 est une protéine de 53 kDa (393 acides aminés) qui comporte six principaux domaines (Figure 1.1). Le premier, situé en N-terminal de la protéine (acides aminés 1-67), correspond au domaine de transactivation de p53 et est responsable de son activité transcriptionnelle ^[6, 7]. Il comprend plusieurs résidus sérine et thréonine susceptibles d'être phosphorylés, notamment les résidus S15, T18 et S46 ^[8]. Au cours des dernières années, plusieurs études ont mis en évidence la présence de deux régions distinctes dans le domaine de transactivation (TAD, en anglais, pour *transactivation domain*), le domaine de transactivation I (TAD-I, acides aminés 1-35) et le domaine de transactivation II (TAD-II, acides aminés 36-67), selon la nature des régulateurs transcriptionnels qu'elles recrutent et les cibles transcriptionnelles qui en découlent ^[6, 7, 9]. Par exemple, il a été démontré que le TAD-I est essentiel pour induire un arrêt du cycle cellulaire, mais pas pour déclencher

l'apoptose. En effet, l'expression, dans des cellules humaines en culture, de p53 mutée au niveau de sa lysine 22 et de son tryptophane 23 (p53-L22Q;W23S, lequel engendre une perte de fonction du TAD-I) est en mesure d'induire l'apoptose, mais pas un arrêt du cycle cellulaire ^[10]. À l'inverse, l'expression, dans des cellules humaines en culture, de p53 mutée au niveau de son tryptophane 53 et de sa phénylalanine 54 (p53-W53Q;F54S, lequel engendre une perte de fonction du TAD-II) n'est plus en mesure d'induire l'apoptose, mais peut enclencher un arrêt du cycle cellulaire ^[11]. En accord avec ces résultats, une autre étude a démontré que le TAD-I, mais pas le TAD-II, est essentiel pour l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs, en anglais, pour *mouse embryonic fibroblasts*) provenant de souris knockin p53-L25Q;W26S et p53-W53Q;F54S et exposés à des rayons gamma ^[12]. Cependant, dans cette même étude, il est également démontré que l'entrée en apoptose des MEFs p53-L25Q;W26S et p53-W53Q;F54S provenant d'un autre modèle murin requiert un TAD-I fonctionnel et que l'implication du TAD-II dans ce processus est minime. Ces résultats suggèrent alors que la capacité de p53 à transactiver ses gènes cibles en réponse à des dommages à l'ADN dépend davantage de la fonctionnalité du TAD-I que de celle du TAD-II. Enfin, toujours dans la même étude, les auteurs montrent que des MEFs p53-L25Q;W26S et p53-W53Q;F54S qui expriment l'oncogène H-RAS V12 sont en mesure d'entrée en sénescence, ce qui suggère que chacun des deux domaines de transactivation de p53 est suffisant pour enclencher ce mécanisme. Ainsi, il semble que, selon la nature du stress auquel une cellule est soumise (dans ce cas-ci, des dommages à l'ADN ou l'expression d'un oncogène), l'implication du TAD-I et du TAD-II de p53 varie.

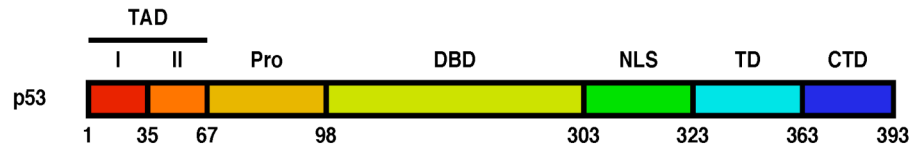


Figure 1.1 Représentation schématique des différents domaines protéiques de p53 humain.

Les chiffres indiqués au bas de la figure font référence aux acides aminés qui délimitent chaque domaine. **TAD-I** et **TAD-II**: domaines de transactivation I et II. **Pro**: domaine riche en proline. **DBD**: domaine de liaison à l'ADN. **NLS**: signal de localisation nucléaire. **TD**: domaine de tétramérisation. **CTD**: domaine C-terminal.

Bien que le TAD-I et le TAD-II puissent activer la transcription de manière indépendante, ils peuvent agir de concert. Par exemple, les deux domaines coopèrent pour recruter des sous-unités spécifiques du complexe activateur de la transcription STAGA, tels GCN5 (aussi appelée KAT2A pour, en anglais, *K(lysine) acetyltransferase 2A*), TAF9 (en anglais, *TATA box binding protein (TBP)-associated factor 9*) et TADA2B (en anglais, *transcriptional adaptor 2B*), afin d'activer la transcription de certains gènes cibles, comme p21 (aussi appelé Cdkn1a pour, en anglais, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), Puma (aussi appelé Bbc3 pour, en anglais, *BCL2 binding component 3*) et Gadd45 α (en anglais, *growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*)^[13]. Aussi, il a été démontré qu'ils sont tous deux requis pour la répression transcriptionnelle qu'exerce p53 lorsque la cellule est dans un état d'hypoxie^[14].

Le deuxième domaine caractéristique de p53 est le domaine riche en proline (acides aminés 68-98). Comme son nom l'indique, on y retrouve une proportion importante de résidus proline (environ 30% du domaine). Jusqu'à récemment, on ne lui connaissait pas de fonction précise. Cependant, on sait aujourd'hui qu'il contribue à l'activité transcriptionnelle de p53, notamment en coopérant avec le TAD-II^[9].

Le troisième domaine de p53, situé au centre de la protéine (acides aminés 99-303), correspond à sa région de liaison à l'ADN (DBD, en anglais, pour *DNA-binding domain*)^[7, 9]. C'est un domaine fortement étudié puisqu'on y retrouve le plus grand nombre de mutations associées à des cancers^[15]. La structure du DBD de p53 correspond à un sandwich β , lequel sert d'armature à deux larges boucles, appelées L2 et L3, et à un motif boucle-feuillet-hélice^[16]. Les boucles L2 et L3 sont stabilisées grâce à un atome de zinc en coordination tétraédrique avec le résidu histidine H179 et les résidus cystéine C176, C238 et C242. Pour ce qui est du motif boucle-feuillet-hélice, il forme la région qui en contact direct avec le squelette sucre-phosphate de l'ADN^[7, 9, 16]. L'arginine R273, l'alanine A276 et l'arginine R283 correspondent aux principaux résidus impliqués dans cette interaction^[9].

Dans la région C-terminale de la protéine, trois petits domaines se font suite. On retrouve d'abord, entre les acides aminés 303 et 323, le signal de localisation nucléaire (NLS, en anglais, pour *nuclear localization signal*) de p53^[9]. Ensuite, entre les acides aminés 324 et 363, se situe son domaine de tétramérisation (TD, en anglais, pour *tetramerization domain*), lequel est essentiel au bon fonctionnement de la protéine^[9, 17]. En effet, p53 doit être sous forme tétramérique pour que sa liaison à l'ADN soit optimale et, par le fait même, pour être en mesure de réguler la transcription de ses gènes cibles. Le TD de p53 est composé d'un feuillet β (acides aminés 324 à 333) relié à une hélice α (acides aminés 335-363) par un seul résidu, la glycine G334^[9, 17]. La formation du tétramère s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, il y a formation d'un dimère suite à l'association anti-parallèle des feuillets β et des hélices α du TD de deux monomères. Par la suite, l'interaction parallèle entre les hélices de deux dimères conduit à la formation du tétramère (Figure 1.2). Le tétramère est stabilisé grâce aux forces hydrophobes générées par l'interaction des hélices^[9, 17]. Plusieurs résidus sont essentiels à ces interactions, telle la leucine L344, dont la mutation en alanine suffit à provoquer la dissociation des dimères^[17].

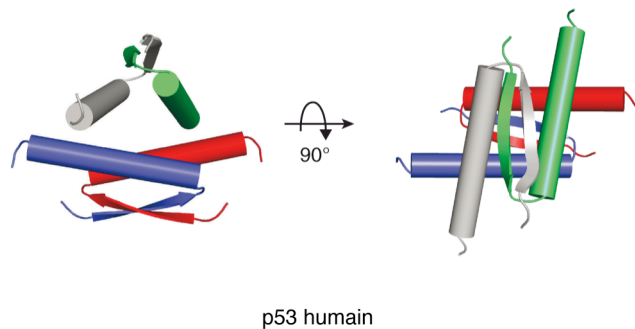


Figure 1.2 Représentation tridimensionnelle de la structure du domaine de tétramérisation (TD) de p53 humain.

Dans un premier temps, il y a association entre les TDs de deux monomères de façon à former deux dimères. Par la suite, l'interaction entre les deux dimères conduit à la formation du tétramère. Le TD de chaque monomère apparaît dans une couleur distincte. La structure du TD de p53 est montrée selon deux angles différents. Schéma tiré de Joerger, 2010 ^[7].

Enfin, entre les acides aminés 364 et 393, on retrouve le domaine C-terminal (CTD, en anglais, pour *C-terminal domain*), une région fortement basique sujette à plusieurs types de modifications post-traductionnelles, telles la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la neddylation et la sumoylation ^[9]. Il a été démontré que, selon la nature des modifications post-traductionnelles qu'il subit, le CTD peut réguler p53 de façon positive ou négative ^[9]. Ainsi, le CTD apparaît comme une région régulatrice essentielle à l'activité de p53.

1.3.2 L'activité transcriptionnelle de p53

Comme il l'a déjà été mentionné, p53 est un facteur de transcription lequel, en réponse à différents stress, est activé de façon à induire une réponse cellulaire anti-proliférative. Plus précisément, suite à un stress, p53 est stabilisée et dirigée au noyau où, sous forme d'un tétramère ^[18, 19], elle est en mesure de lier, de manière spécifique, le

promoteur de ses gènes cibles et, par conséquent, d'en activer la transcription ^[20]. La séquence consensus de l'élément de réponse reconnu par p53 est composée d'une répétition de deux palindromes de dix paires de base chacun (RRRCWWGYYY, où R est une purine, Y est une pyrimidine, et W est un A ou un T), séparés par quelques nucléotides (0-13) ^[21, 22]. En fait, chaque palindrome est lié par un dimère du tétramère ^[7]. Comparativement à l'élément de réponse de la majorité des facteurs de transcription, celui de p53 est relativement long. Il en résulte que le nombre de séquences promotrices pouvant être liées par cette dernière est très élevé. De ce fait, p53 peut réguler un nombre considérable de gènes et, par conséquent, engendrer de multiples réponses cellulaires ^[23].

Il est bien établi que la liaison de p53 à ses éléments de réponse est maximale et optimale suite à sa stabilisation. Cependant, au cours des dernières années, différents groupes ont observé la présence d'une quantité significative de p53 à certains promoteurs dans des conditions normales, c'est-à-dire en absence de stress ^[24, 25]. Cette observation peut s'expliquer par la mise en évidence de l'implication du domaine CTD de p53 dans sa reconnaissance et sa liaison à des séquences promotrices. En fait, il semble que la liaison de p53 à ses éléments de réponse fait intervenir à la fois son DBD, lequel reconnaît de manière spécifique la séquence promotrice, et son CTD, lequel, contrairement au DBD, s'associe de façon non spécifique à l'ADN ^[20]. Ainsi, le CTD pourrait faciliter le recrutement de p53 à ses éléments de réponse par sa capacité à lier l'ADN de façon non spécifique et en absence de stress. Aussi, des études *in vitro* ont démontré que le CTD contribue à des changements allostériques dans p53 de façon à faciliter la liaison de son DBD à l'ADN ^[26, 27]. Enfin, il semble que l'acétylation du CTD facilite la liaison de p53 à ses éléments de réponse. En effet, il a été observé que des modifications au niveau du CTD affectent l'activité transcriptionnelle de p53 et qu'un mutant de p53 auquel on a supprimé le CTD perd sa capacité de lier certains de ses éléments de réponse ^[28].

La majorité des gènes régulés par p53 sont transcrits par l'ARN polymérase II (RNAPII, en anglais, pour *RNA polymerase II*) ^[20]. Aussi, p53 régule généralement la

transcription de ses gènes cibles à l'étape de l'initiation, notamment en recrutant des protéines capables de modifier les histones. Bien qu'elle soit en mesure de recruter des histones méthyltransférases, comme PRMT1 (en anglais, *protein arginine methyltransferase 1*) et CARM1 (en anglais, *coactivator-associated arginine methyltransferase 1*)^[29], ou, encore, le variant d'histone H2A.Z (en anglais, *H2A histone family, member Z*)^[30], p53 active principalement l'expression de ses gènes cibles en recrutant des histones acétyltransférases (HATs), comme p300/CBP (aussi appelées EP300 pour, en anglais, *E1A binding protein p300* et CREBBP pour *CREB binding protein*)^[31-34], PCAF (aussi appelée KAT2B pour, en anglais, *K(lysine) acetyltransferase 2B*)^[34, 35], GNC5^[36] et TIP60 (aussi appelée KAT5 pour, en anglais, *K(lysine) acetyltransferase 5*)^[30]. Ainsi, après avoir lié son élément de réponse, p53 s'associe à des protéines HATs, lesquelles, par l'acétylation des histones, permettent l'ouverture de la chromatine et, par le fait même, rendent le promoteur accessible à la machinerie transcriptionnelle de base. Il est important de souligner que p300/CBP acétyle, en plus des histones, p53 elle-même, ce qui tend à augmenter la transactivation de ses gènes cibles^[32-34].

En plus de recruter différentes protéines qui modifient les histones, p53 recrute également certaines composantes du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC, en anglais, pour *pre-initiation complex*). En effet, elle facilite le recrutement de TBP (en anglais, *TATA box binding protein*) et des facteurs qui y sont associés^[37-41], TFIIA (aussi appelée GTF2A pour, en anglais, *general transcription factor IIA*)^[42], TFIIF (aussi appelée GTF2H pour, en anglais, *general transcription factor IIF*)^[43], de même que la sous-unité TAF1 (en anglais, *TATA box binding protein (TBP)-associated factor 1*) de TFIID (aussi appelée GTF2D pour, en anglais, *general transcription factor IID*), dont le recrutement à certains promoteurs dépend de l'acétylation de p53^[44].

Comme il l'a déjà été mentionné, p53, en réponse à certains stress (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, hypoxie), régule l'expression d'un très grand nombre de gènes et, de ce fait, engendre diverses réponses cellulaires, lesquelles ont pour but de

freiner la prolifération. Ainsi, p53 activée peut conduire à l'apoptose, à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire ou à la sénescence. Le choix de la réponse engendrée par p53 dépend de plusieurs facteurs. En effet, il peut varier en fonction du type cellulaire, de même que de la nature et de la durée du stress ^[20, 23]. Par exemple, l'exposition aux rayons ultraviolets d'un lymphocyte T provoque son entrée en apoptose ^[45], alors qu'un fibroblaste soumis au même stress entre en sénescence ^[46]. Aussi, une même cellule soumise à deux stress différents peut répondre par deux mécanismes distincts. Cette caractéristique de p53 soulève une grande question laquelle, encore aujourd'hui, demeure non résolue: comment p53 est-elle en mesure de choisir une cible transcriptionnelle précise, parmi la multitude de gènes qu'elle régule, en réponse à un stress spécifique?

À ce jour, aucune théorie n'est encore en mesure d'expliquer à elle seule ce phénomène. Plusieurs modèles ont été proposés, mais aucun d'entre eux ne fait l'unanimité. Néanmoins, il est possible de dresser un portrait dans lequel p53 agit en fonction de plusieurs facteurs physiques et environnementaux lesquels, une fois combinés, déterminent de quelle façon ce dernier se comportera et, par conséquent, quelle réponse cellulaire spécifique sera engendrée. Parmi ces facteurs, on compte le degré d'affinité entre p53 et la séquence promotrice qu'elle lie, la topologie de cette même région promotrice, les modifications post-traductionnelles que subit p53, la présence ou non de co-facteurs spécifiques, certains facteurs épigénétiques, sans oublier la nature du stimulus activateur et le type cellulaire ^[20, 23].

1.3.3 Les modifications post-traductionnelles de p53

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'activation de p53 en tant que facteur de transcription s'effectue en trois grandes étapes: la stabilisation de p53, le recrutement et la liaison de p53 à des séquences d'ADN spécifiques et, enfin, l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de p53. Chacune de ses étapes est grandement influencée par les modifications post-traductionnelles auxquelles p53 est sujette, telles la

phosphorylation, l'acétylation, la mono et di-méthylation, la glycosylation, l'ubiquitination, la neddylation, la sumoylation et la poly-ribosylation ^[8]. À ce jour, cinquante modifications post-traductionnelles de p53 ont été identifiées (Tableau 1.1). Cependant, toutes n'ont pas encore été associées à une fonction précise de la protéine ^[8].

La phosphorylation et l'acétylation ont été les premières modifications post-traductionnelles de p53 à avoir été identifiées et, par le fait même, elles ont été, dans les dernières décennies, les plus étudiées et les mieux comprises. Comme il l'a déjà été mentionné, la phosphorylation de p53 a lieu principalement au niveau des résidus sérine et thréonine de son domaine de transactivation et est assurée par différentes kinases, en réponse à différents stress ^[8]. Parmi elles, on compte les kinases de la voie du dommage à l'ADN, ATM (en anglais, *ataxia telangiectasia mutated*) ^[47, 48] et ATR (en anglais, *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) ^[49, 50], sur lesquelles nous reviendrons plus loin, DNA-PK (aussi appelée PRKD pour, en anglais, *protein kinase, DNA-activated*) ^[51, 52] et AMPK (aussi appelée PRKA pour, en anglais, *protein kinase, AMP-activated*) ^[53]. La phosphorylation du domaine de transactivation a pour principal effet la stabilisation de p53, puisqu'elle vient déranger l'interaction entre p53 et MDM2 (en anglais, *transformed 3T3 cell double minute 2*), son principal régulateur négatif ^[54]. En absence de stress, MDM2, une protéine à activité ubiquitine ligase de type E3, maintient p53 à de faibles niveaux protéiques en promouvant sa poly-ubiquitination, principalement aux résidus lysine K370, K372, K373, K381, K382 et K386 du CTD ^[55], et sa dégradation par la voie du protéasome 26S ^[56]. Puisque MDM2 interagit avec le TAD-I de p53 (résidus 18-26 chez l'humain) ^[57], la phosphorylation de cette même région vient perturber l'interaction entre les deux protéines et, par le fait même, libère p53 de l'action inhibitrice de MDM2.

Tableau 1.1 Répertoire des modifications post-traductionnelles de p53 humain.

Tableau adapté de Meek, 2009 [8].

Modification post-traductionnelle	Type de modification	Enzyme(s) responsable(s) de la modification	Domaine de p53 dans lequel se trouve le résidu modifié
Sérine 6 (S6)	Phosphorylation	JNK1, JNK2, CK1δ/ε	TAD-I
Sérine 9 (S9)	Phosphorylation	CK1δ/ε	TAD-I
Sérine 15 (S15)	Phosphorylation	DNA-PK, ATR, ATM, mTOR, AMPK, RSK2, CDK5	TAD-I
Thréonine 18 (T18)	Phosphorylation	VRK1, CHK2, TTK	TAD-I
Sérine 20 (S20)	Phosphorylation	CHK2, PLK3	TAD-I
Sérine 33 (S33)	Phosphorylation	p38K, GSK3β, CAK/CDK7, CDK5, CDK9	TAD-I
Sérine 37 (S37)	Phosphorylation	ATR, PRAK	TAD-I
Sérine 46 (S46)	Phosphorylation	DYRK2, PKCδ, p38K, HIPK2, AMPKα, CDK5	TAD-II
Thréonine 55 (T55)	Phosphorylation	TAF1, ERK2	TAD-II
Thréonine 81 (T81)	Phosphorylation	JNK2	Pro
Lysine 101 (K101)	Ubiquitination	MDM2	DBD
Lysine 120 (K120)	Acétylation	Tip60 (KAT5)	DBD
Lysine 120 (K120)	Ubiquitination	-	DBD
Lysine 132 (K132)	Ubiquitination	-	DBD
Lysine 139 (K139)	Ubiquitination	-	DBD
Sérine 149 (S149)	Glycosylation	-	DBD
Thréonine 155 (T155)	Phosphorylation	CSN	DBD
Lysine 164 (K164)	Ubiquitination	-	DBD
Lysine 164 (K164)	Acétylation	p300 (KAT3B)	DBD
Sérine 215 (S215)	Phosphorylation	STK15	DBD
Acide glutamique 225 (E225)	Poly-ribosylation	PARP-1	DBD
Acide glutamique 258 (E258)	Poly-ribosylation	PARP-1	DBD
Acide glutamique 259 (E259)	Poly-ribosylation	PARP-1	DBD
Lysine 291 (K291)	Ubiquitination	MKRN1	DBD
Lysine 292 (K292)	Ubiquitination	MKRN1	DBD
Lysine 305 (K305)	Acétylation	p300 (KAT3B)	DBD
Sérine 313 (S313)	Phosphorylation	CHK1, CHK2	NLS
Sérine 314 (S314)	Phosphorylation	CHK1, CHK2	NLS
Sérine 315 (S315)	Phosphorylation	CDK2, CDK9, STK15	NLS
Lysine 320 (K320)	Acétylation	PCAF (KAT2B)	NLS
Lysine 320 (K320)	Ubiquitination	E4F1	NLS
Lysine 320 (K320)	Neddylation	N8 (FBXO11)	NLS
Lysine 321 (K321)	Neddylation	N8 (FBXO11)	NLS
Arginine 333 (R333)	Di-méthylation	PRMT5	TD
Arginine 335 (R335)	Di-méthylation	PRMT5	TD
Sérine 336 (S336)	Phosphorylation	CHK2, IκBK2	TD
Arginine 337 (R337)	Di-méthylation	PRMT5	TD
Lysine 370 (K370)	Mono- et di-méthylation	SMYD2	CTD
Lysine 370 (K370)	Acétylation	p300 (KAT3B)	CTD
Lysine 370 (K370)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Lysine 372 (K372)	Mono-méthylation	SET7/9	CTD
Lysine 372 (K372)	Acétylation	p300 (KAT3B)	CTD
Lysine 372 (K372)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Lysine 373 (K373)	Acétylation	p300 (KAT3B)	CTD
Lysine 373 (K373)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Sérine 376 (S376)	Phosphorylation	PKC, GSK-3β	CTD
Thréonine 377 (T377)	Phosphorylation	CHK1, CHK2	CTD
Sérine 378 (S378)	Phosphorylation	CHK1, CHK2, PKC	CTD
Lysine 381 (K381)	Acétylation	p300 (KAT3B)	CTD
Lysine 381 (K381)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Lysine 382 (K382)	Acétylation	p300 (KAT3B)	CTD
Lysine 382 (K382)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Lysine 382 (K382)	Di-méthylation	SET8	CTD
Lysine 386 (K386)	Ubiquitination	MDM2	CTD
Thréonine 387 (T387)	Phosphorylation	CHK1	CTD
Sérine 392 (S392)	Phosphorylation	CDK9, PKR, FACT	CTD

Nous avons vu plus tôt que les protéines p300/CBP contribuent à l'activation de p53, notamment par l'acétylation de son CTD. Cependant, il a été démontré que p300/CBP peut également s'associer à MDM2 de façon à former un complexe ternaire avec p53 et à favoriser sa dégradation ^[58, 59]. Ainsi, p300/CBP exerce à la fois une action activatrice et inhibitrice sur p53. Le signal permettant à p300/CBP de passer d'un mode «inhibiteur» à un mode «activateur» semble reposer sur l'état de phosphorylation du TAD-I de p53. En effet, la phosphorylation de ce domaine, notamment en S15, T18 et S20 ^[60-62], perturbe, d'une part, l'interaction de p53 avec MDM2 et, d'autre part, elle crée un site d'interaction additionnel avec p300/CBP, favorisant ce dernier à acétyler le CTD aux mêmes résidus qui sont ubiquitinés en présence de MDM2. Ainsi, en absence de stress, le TAD-I de p53 n'est pas phosphorylé, ce qui favorise la formation d'un complexe ternaire inhibiteur avec MDM2 et p300/CBP. Cependant, en réponse à un stress, le TAD-I devient phosphorylé, ce qui, d'une part, libère p53 de MDM2 et, d'autre part, renforce l'interaction entre p53 et p300/CBP de façon à faciliter l'acétylation du CTD par la HAT.

La phosphorylation de p53 en sérine 15, laquelle est assurée principalement par les kinases ATM et ATR ^[8], est considérée comme un événement clé pour sa stabilisation et son activation. En effet, il semble que cette modification est importante pour déclencher d'autres modifications de p53 ^[63-66]. Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibition d'ATM empêche la phosphorylation efficace des résidus S9, S15, S20 et S46 ^[65]. De plus, comme il l'a été expliqué plus haut, la phosphorylation de p53 en S15 favorise son association avec p300/CBP ^[60-62, 67-71]. Cependant, d'autres modifications de p53 contribuent à renforcer l'interaction de p53 avec ces HATs, telle la phosphorylation des résidus T18 et S20. La phosphorylation de ces deux résidus permet également de bloquer l'interaction avec MDM2 et, par le fait même, contribue à la stabilisation de p53. Ainsi, il semble que la combinaison de différentes modifications post-traductionnelles de p53 au niveau de son TAD-I favorise son association complète avec p300/CBP, au détriment de la formation du complexe ternaire p300/CBP-p53-MDM2.

Plusieurs modifications effectuées dans le TAD-II de p53 contribuent également au recrutement de p300/CBP, mais de façon moins importante [69, 71]. Cependant, ces modifications semblent jouer un rôle considérable pour ce qui est de la transactivation par p53. En effet, la phosphorylation en sérine 46 et en thréonine 55 renforce l'interaction du TAD-II avec le domaine PH (en anglais, *pleckstrin homology*) de la sous-unité p62 de TFIIH et, par le fait même, favorise l'activation de la transcription par p53 [72].

Les résidus lysine de p53 sont sujets à différentes modifications, telles l'ubiquitination et l'acétylation, mais aussi la neddylation et la méthylation (Tableau 1.1). Chacune de ces modifications est mutuellement exclusive et influence la réponse cellulaire engendrée par p53 [8]. Sept résidus lysine situés dans le CTD (K305, K370, K372, K373, K381, K382, K386), de même qu'un résidu lysine situé dans le DBD (K164), sont acétylés par p300/CBP [33, 63, 73-75], alors que la lysine 320 est acétylée par PCAF [63, 73]. Une autre lysine située dans le DBD, la lysine 120, est acétylée par Tip60/hMOF (aussi appelée KAT8 pour, en anglais, *K(lysine) acetyltransferase 8*), un membre de la famille MYST, laquelle regroupe des HATs non apparentées à p300/CBP et PCAF [76-78]. Cette lysine fait partie des résidus en contact direct avec l'ADN et est souvent mutée au cours de la transformation maligne [8]. De plus, il semble que l'acétylation de cette lysine, laquelle se fait en réponse à des dommages à l'ADN, favorise la localisation de p53 au promoteur de gènes proapoptotiques, tels Bax (en anglais, *BCL2-associated X protein*) et Puma, plutôt qu'à celui des gènes impliqués dans l'arrêt de la prolifération [77, 78]. Ainsi, il semble que cette modification contribue au choix de la réponse cellulaire engendrée par p53.

Il est fort probable que toutes les modifications post-traductionnelles de p53 soient réversibles. De ce fait, dans les dernières années, plusieurs phosphatases, déacétylases et enzymes de déubiquitination ont été identifiées, *in vitro* et dans des cellules en culture, comme étant capables d'agir sur p53 [8]. Parmi elles, on compte les phosphatases PPP1 (en anglais, *protein phosphatase 1*) [8], PPP2A (en anglais, *protein phosphatase 2A*) [8] et PPM1D (en anglais, *protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D*, aussi connue sous le

nom de WIP1)^[79], les déacétylases HDAC1 (en anglais, *histone deacetylase 1*)^[80] et SIRT1 (en anglais, *Sirtuin 1*)^[81], de même que l'enzyme de déubiquitination HAUSP (aussi appelée USP7 pour, en anglais, *ubiquitin specific peptidase 7*)^[8]. Plusieurs de ces enzymes sont surexprimées dans certains types de cancer (PPM1D, par exemple, est surexprimée dans environ 15% des cancers du sein)^[79] et, par le fait même, agissent comme des oncogènes. L'idée de contrôler leur activité se présente alors comme une nouvelle avenue thérapeutique pour le traitement de cette maladie.

1.3.4 MDM2 et MDM4, les principaux régulateurs négatifs de p53

Bien que p53 soit considérée comme le gardien du génome et que son activation soit indispensable à la cellule pour se défendre contre la majorité des stress auxquels elle est soumise, son activation permanente n'est pas souhaitable^[82]. En effet, l'accumulation de p53 et son activation prolongée conduisent à la mort cellulaire^[83, 84]. Par conséquent, plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation négative de p53. Parmi elles, on compte MDM2, le principal régulateur négatif de p53 dont nous avons déjà brièvement parlé, et MDM4 (en anglais, *transformed 3T3 cell double minute 4*) aussi appelée MDMX, une protéine fortement homologue à MDM2 mais qui n'appartient pas à la même famille^[85].

La principale fonction de MDM2 et MDM4 est de maintenir p53 inactive en absence de stress ou de mettre fin à son activation, suite à un stress, après qu'une réponse cellulaire adéquate ait été enclenchée. Puisque MDM2 et MDM4 sont des régulateurs négatifs de p53, il n'est pas surprenant qu'elles soient oncogéniques^[82, 86, 87]. D'ailleurs, leur surexpression est observée dans près de 10% des tumeurs chez l'humain^[88]. Néanmoins, il demeure que MDM2 et MDM4 sont essentielles pour contrôler l'activité de p53, particulièrement durant le développement^[89-92].

Comme il l'a été mentionné plus haut, MDM2 et MDM4 sont fortement homologues. Elles partagent plusieurs domaines structuraux (Figure 1.3), notamment un

domaine de liaison à p53 et un domaine «RING finger», lequel leur permet de former un hétérodimère ^[82, 93]. En ce qui a trait à leur fonction, elles sont toutes deux en mesure d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 ^[82]. En fait, il est possible de détecter MDM2 et MDM4 en liaison avec p53 au niveau du promoteur de ses gènes cibles et, de cette façon, elles peuvent influencer le choix de la réponse engendrée par p53 ^[75]. Cependant, seule MDM2 possède une activité ubiquitine ligase de type E3 et, par conséquent, seule MDM2 participe à la dégradation de p53 ^[94]. Soulignons également que MDM2 et MDM4 agissent en synergie pour inactiver p53 et que certaines de leurs fonctions semblent être non redondantes puisque la délétion de *Mdm2*, chez la souris, n'engendre pas les mêmes effets que ceux observés suite à la délétion de *Mdm4* ^[95].

En plus de ne pas avoir tout à fait la même fonction, MDM2 et MDM4 diffèrent au niveau de leur régulation génique ^[82]. En effet, alors que le promoteur du gène *Mdm2* contient un élément de réponse à p53 (élément situé dans l'intron 2, en amont du site d'initiation de la traduction) ^[96-98], le promoteur du gène *Mdm4* en est dépourvu ^[85]. Par conséquent, MDM2, mais pas MDM4, est induite par p53 et, par le fait même, participe à sa rétro-inhibition.

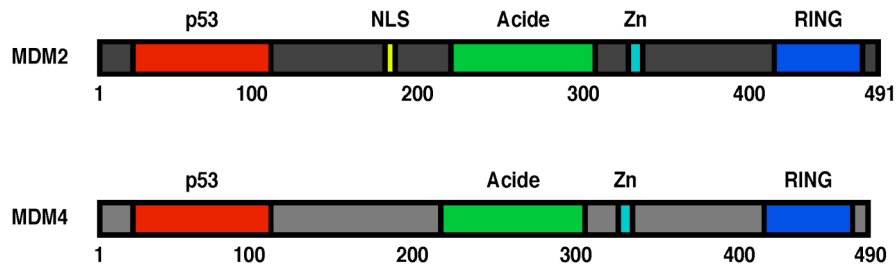


Figure 1.3 Représentation schématique des principaux domaines protéiques de MDM2 et MDM4 humains.

Les chiffres indiqués au bas de la figure font référence aux acides aminés qui délimitent chaque domaine. **p53**: domaine de liaison à p53. **NLS**: signal de localisation nucléaire (il est important de souligner que seule MDM2 contient un NLS). **Acide**: région centrale acide qui permet à MDM2, mais pas à MDM4, de lier des protéines ribosomales. **Zn**: motif à doigt de zinc. **RING**: domaine RING-finger qui permet aux deux protéines de former un hétérodimère. Schéma adapté de Perry, 2010 ^[82].

En plus d'ubiquitiner p53, MDM2 cible plusieurs autres protéines, notamment des régulateurs de p53 et certaines de ses cibles transcriptionnelles, MDM4 et elle-même ^[82, 99]. L'ubiquitination de MDM4 par MDM2 conduit à son accumulation dans le noyau et à sa dégradation ^[100]. L'interaction de MDM4 avec le domaine «RING finger» de MDM2 lui permet de moduler l'activité de cette dernière ^[101, 102]. En fait, selon le contexte cellulaire, MDM4 peut stimuler ou, au contraire, inhiber l'activité ubiquitine ligase de MDM2 ^[102-104].

MDM2 et MDM4 sont elles-mêmes régulées par différentes protéines. Par exemple, la kinase ATM phosphoryle MDM2 et MDM4 au niveau de leur C-terminal (sérine 395 de MDM2 et sérines 342, 367 et 403 de MDM4) de façon à favoriser leur ubiquitination et leur dégradation ^[105, 106]. La kinase c-ABL (aussi appelée ABL1 pour, en anglais, *c-abl oncogene 1*), laquelle est activée par ATM, phosphoryle également MDM2 en tyrosine 394 ^[107] et MDM4 en tyrosine 99 ^[108]. D'autres kinases de la réponse au dommage à l'ADN, telles ATR, CHK1 (en anglais, *checkpoint kinase 1*) et CHK2 (en anglais, *checkpoint*

kinase 2), phosphorylent elles aussi MDM2 et MDM4 ^[100, 109, 110]. La réactivation de MDM2 est assurée par la phosphatase PPM1D, laquelle déphosphoryle MDM2 en sérine 395 de façon à faciliter son interaction avec p53 et à supprimer son auto-ubiquitination ^[111].

Une autre protéine importante pour l'inactivation de MDM2 est le suppresseur de tumeur ARF (en anglais, *alternative reading frame*). ARF, sur laquelle nous reviendrons plus en détail, est en mesure d'interagir avec MDM2 de façon à inhiber son activité ubiquitine ligase et à empêcher son interaction avec p53 ^[112, 113]. Il est également important de souligner la découverte, il y a quelques années, d'un composé chimique capable d'inhiber l'interaction entre MDM2 et p53, la nutlin-3 ^[114]. Cet inhibiteur est maintenant couramment utilisé dans plusieurs études sur la transformation maligne et est prometteur pour la mise au point de nouvelles stratégies pour le traitement du cancer.

1.3.5 Les autres membres de la famille de p53, p63 et p73, et les isoformes de p53

p53 est fortement apparenté à deux autres gènes, *p63* et *p73*, lesquels ont été identifiés en 1998, plusieurs années après *p53* ^[115, 116]. Tous trois partagent d'importantes homologies structurales et fonctionnelles, particulièrement au niveau de leur DBD ^[117]. De ce fait, ils sont considérés comme les membres d'une même famille. *p63* et *p73* sont en mesure d'activer la transcription des gènes cibles de *p53* et, par le fait même, d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et de déclencher une réponse apoptotique ^[117]. Bien que *p53*, *p63* et *p73* jouent des rôles semblables, leur fonction n'est pas totalement redondante. En effet, les souris knockout pour chacun de ces gènes présentent des phénotypes distincts, ce qui tend à démontrer que chaque membre est en mesure d'exercer sa propre fonction ^[118].

Chaque membre de la famille de *p53* exprime plusieurs isoformes ^[117]. Le gène *p63* exprime trois isoformes (α, β, γ) alors que le gène *p73* en exprime sept ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$). Tous ces variants résultent de l'épissage alternatif au niveau de leur région C-terminale. En plus

d'exprimer ces différentes isoformes, *p63* et *p73* utilisent deux promoteurs pour initier la transcription. Le premier, dit distal, est situé dans la région promotrice, alors que le deuxième, lequel correspond au promoteur alternatif, est situé dans l'intron 3. De ce fait, les gènes transcrits à partir de ce promoteur interne sont dépourvus d'une partie de la région N-terminale. On parle alors de TAp63 et TAp73 pour les gènes transcrits à partir du promoteur distal et de Δ Np63 et Δ Np73 pour ceux transcrits à partir du promoteur alternatif. Au total, *p63* exprime six variants d'ARNm, lesquels permettent d'obtenir six isoformes distinctes de la protéine, alors que *p73* exprime 35 variants d'ARNm lesquels, une fois traduits, donnent 28 isoformes différentes de la protéine.

Les isoformes TAp63 et TAp73 sont en mesure de lier les éléments de réponse de *p53* et, par le fait même, elles peuvent activer l'expression des gènes cibles de *p53* ^[117]. Pour ce qui est des isoformes Δ Np63 et Δ Np73, elles lient aussi spécifiquement les éléments de réponse de *p53* et, de ce fait, elles sont en mesure d'activer directement l'expression de gènes cibles spécifiques ^[119-121]. Cependant, les isoformes Δ Np63 et Δ Np73 peuvent également agir comme des dominants négatifs de *p53* et des isoformes TAp63 et TAp73 ^[122, 123] et, de ce fait, contribuer à la transformation maligne en bloquant l'apoptose.

Comme les gènes *p63* et *p73*, le gène *p53* possède un promoteur alternatif situé au niveau de l'intron 4 ^[117], lequel permet d'obtenir des transcrits auxquels manquent les 133 premiers acides aminés (*p53* Δ 133) (Figure 1.4). De plus, l'intron 9 peut être épissé de trois manières différentes, ce qui engendre l'expression de protéines avec des CTDs distincts (*p53*, *p53* β , *p53* γ) ^[117]. Enfin, différentes isoformes de la protéine *p53* sont également traduites à partir d'un site alternatif d'initiation du transcrit ^[117]. Par conséquent, ces isoformes sont dépourvues des 40 premiers acides aminés de *p53* (*p53* Δ 40, aussi appelée Δ Np53 ou *p53*/47) ^[124, 125]. Au total, le gène *p53* est en mesure d'exprimer neuf différentes isoformes de la protéine (*p53*, *p53* β , *p53* γ , Δ 133*p53*, Δ 133*p53* β , Δ 133*p53* γ , Δ 40*p53*, Δ 40*p53* β et Δ 40*p53* γ).

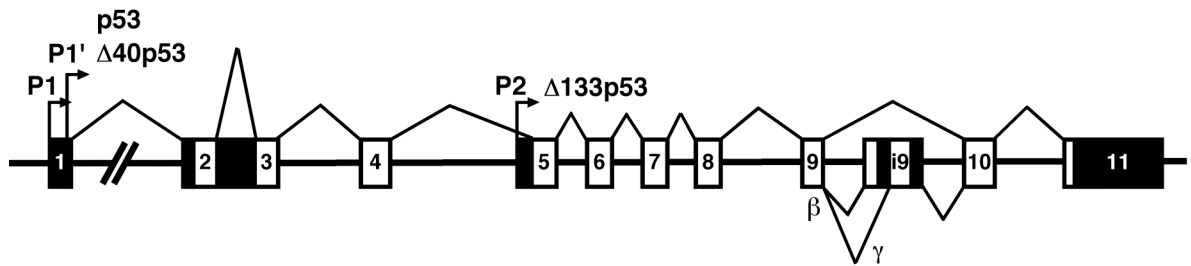


Figure 1.4 Représentation schématique du gène p53 humain.

Schéma adapté de Khoury, 2010 ^[117].

Dans les dernières années, deux études se sont intéressées à la fonction de l'isoforme $\Delta Np53$ ^[124, 125]. Cependant, les deux groupes n'observent pas tout à fait les mêmes résultats. Dans leur étude, Yin et al. montrent que la traduction de p53 et de $\Delta Np53$ dépend de l'interaction de MDM2 avec p53 ^[124]. Cependant, comme $\Delta Np53$, contrairement à p53, est dépourvue du site d'interaction avec MDM2, elle n'est pas dégradée. Par conséquent, l'association de p53 avec $\Delta Np53$ permet d'augmenter la stabilité du tétramère en diminuant les risques de dégradation. Aussi, les auteurs montrent que la surexpression de $\Delta Np53$, en excès par rapport à p53, est en mesure d'activer la transcription du gène pro-apoptotique Bax, mais pas celle de p21, ce qui suggère qu'une forte proportion de $\Delta Np53$ dans la cellule favorise, en réponse à un stress, une entrée en apoptose plutôt qu'un arrêt de la prolifération. À l'inverse, Courtois et al. ont démontré, dans leur étude, que $\Delta Np53$, lorsque surexprimée en excès par rapport à p53, agit comme un dominant négatif en inhibant l'activité transcriptionnelle et les fonctions anti-prolifératives de p53 ^[125]. Ainsi, la fonction de $\Delta Np53$ semble encore mal comprise.

1.4 La sénescence cellulaire

Comme il l'a déjà été mentionné, la cellule, en réponse à différents stress, est en mesure d'activer des mécanismes anti-prolifératif afin d'empêcher une transformation

maligne potentielle. Ces mécanismes sont l'apoptose, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire par l'activation de points de contrôle et la sénescence cellulaire. Le suppresseur de tumeur p53, lequel a été décrit dans la première partie de ce chapitre, joue un rôle essentiel dans la mise en place de ces différents mécanismes. Puisque la sénescence cellulaire correspond au mécanisme anti-tumoral étudié dans cette thèse, elle seule, dans les paragraphes qui suivent, est décrite.

1.4.1 Qu'est-ce que la sénescence cellulaire?

La sénescence cellulaire se définit comme un arrêt permanent de la cellule en phase G1 du cycle cellulaire ^[126]. Elle a été décrite pour la première fois dans les années soixante, lorsque Hayflick a observé que des fibroblastes humains normaux en culture avaient un nombre limité de cycles de division ^[127]. On sait aujourd'hui que ce nombre défini de cycles de réplication résulte du raccourcissement des télomères, lequel a lieu après chaque ronde de division ^[128]. En effet, le mécanisme de réplication des eucaryotes ne permet pas de répliquer les extrémités des chromosomes ce qui, par conséquent, entraîne leur érosion progressive ^[128]. Ainsi, après un certain nombre de cycles de division (environ cinquante pour les fibroblastes humains normaux en culture), la cellule atteint une limite, appelée la limite de Hayflick, où elle cesse de se diviser ^[127]. Plus précisément, la cellule s'arrête, de façon irréversible, en phase G1 du cycle cellulaire. Cet état de la cellule est appelé sénescence «réplicative», du fait qu'elle résulte d'une série de cycles de réplication ^[126].

Outre le raccourcissement des télomères, plusieurs autres stress sont en mesure de provoquer l'entrée de la cellule en sénescence, tels le stress oxydatif ou les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, en anglais, pour *reactive oxygen species*), des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur ^[126]. On parle alors de sénescence «prématurée» puisqu'elle survient avant que la cellule n'ait atteint une sénescence réplicative. Depuis quelques années, le terme de «sénescence induite par les oncogènes» (OIS, en anglais, pour *oncogene-induced senescence*) est également utilisé

pour faire référence à la sénescence engendrée spécifiquement par l'activation d'un oncogène ou par l'inactivation de suppresseurs de tumeur ^[126].

Dans tous les cas, la mise en place de la sénescence requiert l'activation de différentes voies de signalisation et effecteurs dans la cellule, dont les principaux sont la voie du dommage à l'ADN et les suppresseurs de tumeur p53 et Rb. Aussi, au cours des dernières années, plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'influence qu'ont les cellules sénescents sur leur environnement, principalement par la sécrétion d'une multitude de facteurs pro-inflammatoires. Dans les prochains paragraphes, les différents éléments impliqués dans l'établissement de la sénescence, de même que les effets engendrés par les cellules sénescents sur les cellules avoisinantes, sont expliqués. Cependant, préalablement, une brève description des cellules sénescents est présentée.

1.4.2 Les caractéristiques des cellules sénescents

Comme il l'a déjà été mentionné, les cellules sénescents sont arrêtées, de façon permanente, en phase G1 du cycle cellulaire. Il est important de ne pas confondre la sénescence avec la quiescence cellulaire. En effet, ces deux processus, bien qu'en apparence similaires, se distinguent sur plusieurs points. Tout d'abord, les cellules sénescents sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire contrairement aux cellules quiescentes, lesquelles sont en retrait du cycle cellulaire, plus précisément en phase G0 ^[126]. Ensuite, les cellules sénescents sont arrêtées de façon permanente, alors que les cellules quiescentes sont en mesure de réintégrer, en réponse à des signaux physiologiques, le cycle cellulaire ^[126]. Enfin, les cellules sénescents sont métaboliquement actives ^[126], alors que les cellules quiescentes sont dans un état de latence. Les cellules sénescents présentent également un patron d'expression génique qui leur est propre ^[126]. Plus précisément, on note, dans ces cellules, des changements dans l'expression des régulateurs du cycle cellulaire ^[129-134]. Ainsi, il y a une augmentation de l'expression de gènes qui ont pour fonction d'inhiber la progression du cycle cellulaire comme, par exemple, les inhibiteurs de

CDKs (CDKIs, en anglais, pour *cyclin-dependent kinase inhibitors*) p21 et p16 (aussi appelée CDKN2A pour, en anglais, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) [135, 136]. À l'inverse, l'expression de plusieurs activateurs du cycle cellulaire, tels PCNA (en anglais, *proliferating cell nuclear antigen*) et les cyclines A et B, est inhibée [137-139]. Aussi, les cellules sénescents se caractérisent par la sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires, sur lesquels nous reviendrons plus loin.

Les cellules sénescents se caractérisent par une morphologie allongée et aplatie et peuvent être mises en évidence par différents marqueurs, bien qu'aucun d'entre eux ne soit exclusif à l'état de sénescence. Par exemple, les cellules sénescents sont facilement distinguables par leur mise en présence avec du X-galactose, suite à laquelle elles apparaissent bleues. En effet, il y a une augmentation de l'activité de la β -galactosidase dans les lysosomes des cellules sénescents, ce qui entraîne, en présence de X-galactose et à un pH acide (pH 6,0), la formation d'un précipité bleu [140]. Le terme «activité β -galactosidase associée à la sénescence» (SA- β -gal, en anglais, pour *senescence-associated- β -galactosidase activity*) est d'ailleurs utilisé pour faire référence à cette propriété de ces cellules. La cause de l'augmentation de l'activité de la β -galactosidase, spécifiquement dans les cellules sénescents, est nébuleuse. Néanmoins, on sait qu'elle résulte d'une augmentation de l'expression du gène GLB1 (en anglais, *galactosidase, beta 1*), lequel code pour la β -D-galactosidase [141]. Cependant, il a été démontré que la SA- β -gal n'est pas requise pour l'établissement de la sénescence [141] ce qui a contribué, au cours des dernières années, à rendre plusieurs sceptiques quant à l'importance de cette caractéristique des cellules sénescents. Il demeure que la mesure de la SA- β -gal est une façon facile et rapide de marquer les cellules sénescents et qui reflète une réelle propriété de ces cellules.

Les cellules sénescents se caractérisent également par une accumulation de foci de dommages à l'ADN associés à la sénescence (SDFs, en anglais, pour *senescence-associated DNA-damage foci*) [142-145], lesquels regroupent plusieurs protéines de la réponse au dommage à l'ADN, tels la kinase ATM phosphorylée en sérine 1981, le variant

d'histone H2AX (en anglais, *H2A histone family, member X*) phosphorylé (γ -H2AX) et la protéine 1 de liaison à p53 (53BP1, en anglais, pour *p53-binding protein-1*) ^[126]. Comme nous le verrons plus loin, ces foci témoignent de l'importance de l'activation de la voie du dommage à l'ADN pour l'établissement et le maintien de la sénescence.

Les cellules sénescents peuvent aussi se distinguer, mais pas toujours, par leur capacité à former des foci d'hétérochromatine associées à la sénescence (SAHFs, en anglais, pour *senescence-associated heterochromatin foci*) ^[137], lesquels résultent du recrutement de protéines associées à l'hétérochromatine, telle la protéine de l'hétérochromatine 1 (HP1, en anglais, pour *heterochromatin protein 1*), et de modifications d'histones associées à l'hétérochromatine, comme la méthylation en lysine 9 de H3 ^[126]. Les SAHFs se forment au niveau du promoteur de gènes pro-prolifératifs comme, par exemple, les gènes régulés par les facteurs de transcription E2Fs. En effet, il y a quelques années, Narita et al. ont démontré que la formation de SAHFs coïncide avec le recrutement de protéines associées à l'hétérochromatine et de la protéine Rb (aussi appelée RB1 pour, en anglais, *retinoblastoma 1*) aux promoteurs des gènes cibles des E2Fs, de façon à inhiber leur activité ^[137] (nous reviendrons plus en détail sur la régulation des E2Fs par Rb). Plus récemment, une autre étude a démontré que la formation des SAHFs, laquelle s'effectue en plusieurs étapes, est initiée par le recrutement des E2Fs liés au promoteur de leurs gènes cibles et de Rb aux corps nucléaires PML ^[146], lesquels sont enrichis en protéines associées à la chromatine. PML (en anglais, *promyelocytic leukemia protein*) est une protéine importante pour l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène H-RAS V12 et elle est elle-même en mesure d'induire la sénescence dans des cellules humaines normales ^[147]. Elle constitue la composante principale des corps PML, lesquels s'accumulent dans les cellules sénescents. Ainsi, il semble que les composantes qui constituent les SAHFs sont d'abord recrutées aux corps PML afin de réprimer l'expression de gènes spécifiques. Les SAHFs sont facilement détectables grâce au 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ^[126]. Ils peuvent également être mis en évidence par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps spécifiques à des modifications

d'histones associées à l'hétérochromatine (méthylation en lysine 9 de H3) ou à des protéines associées à l'hétérochromatine (HP1, par exemple) ^[126].

Enfin, on observe, chez la plupart des cellules sénescents, une augmentation de l'expression de p16, un important régulateur de la sénescence ^[148], de même que l'activation de p53 et l'accumulation de Rb hypophosphorylé, sur lesquels nous reviendrons plus loin.

1.4.3 L'implication de la réponse au dommage à l'ADN dans la sénescence

La sénescence est caractérisée par l'activation de la voie du dommage à l'ADN. Plus précisément, la sénescence s'établit suite à l'activation de la réponse au dommage à l'ADN (DDR, en anglais, pour *DNA damage response*) et, en ce sens, en est une conséquence ^[149]. Afin de bien comprendre l'implication et l'importance de la voie du dommage à l'ADN dans l'établissement et le maintien de la sénescence, une brève description de la DDR est d'abord présentée.

1.4.3.1 La voie du dommage à l'ADN

Plusieurs protéines sont impliquées dans la voie du dommage à l'ADN. De façon générale, elles peuvent être réparties en quatre classes, selon le rôle qu'elles jouent dans l'activation de la DDR (Figure 1.5) ^[150]. La première classe compte les senseurs du dommage à l'ADN, lesquelles détectent une anomalie dans la chromatine et initient le signal. Les principaux senseurs du dommage à l'ADN sont RAD9, RAD1, HUS1 et RAD17 ^[151]. RAD9, RAD1 et HUS1 forment un complexe hétérotrimérique appelé le complexe 9-1-1, lequel, sous le contrôle de RAD17, est recruté aux sites d'ADN endommagé ^[152, 153]. La deuxième classe regroupe les médiateurs, lesquels, une fois recrutés aux sites de dommages, facilitent la signalisation par ATM, notamment en consolidant l'interaction entre les protéines des différentes classes ^[150]. Les médiateurs du

dommage à l'ADN sont 53BP1 ^[154-157], MDC1 (en anglais, *mediator of DNA-damage checkpoint 1*) ^[158-160], TOPBP1 (en anglais, *topoisomerase DNA (II) binding protein 1*) ^[161] et BRCA1 (en anglais, *breast cancer 1*) ^[162]. La troisième classe correspond aux transducteurs du signal, lesquels sont en mesure d'amplifier et de relayer le signal jusqu'aux effecteurs, lesquels forment la quatrième classe. Les kinases ATM et ATR constituent, avec CHK2 et CHK1, les principaux transducteurs de la voie du dommage à l'ADN ^[150] et nous y reviendrons en détail dans les prochains paragraphes. Pour leur part, les effecteurs correspondent aux protéines capables d'induire une réponse cellulaire adéquate en réponse à un dommage à l'ADN, tels l'arrêt de la prolifération et la réparation de l'ADN. Les principaux effecteurs de la DDR comprennent p53 et les phosphatases de la famille CDC25 (en anglais, *cell division cycle 25*) ^[150]. En fait, les membres de la famille CDC25 sont dégradés suite à leur phosphorylation par les transducteurs de la DDR ce qui, par le fait même, empêche l'activation de certaines kinases essentielles à la progression du cycle cellulaire ^[150] (nous reviendrons en détail sur le cycle cellulaire plus loin dans ce chapitre).

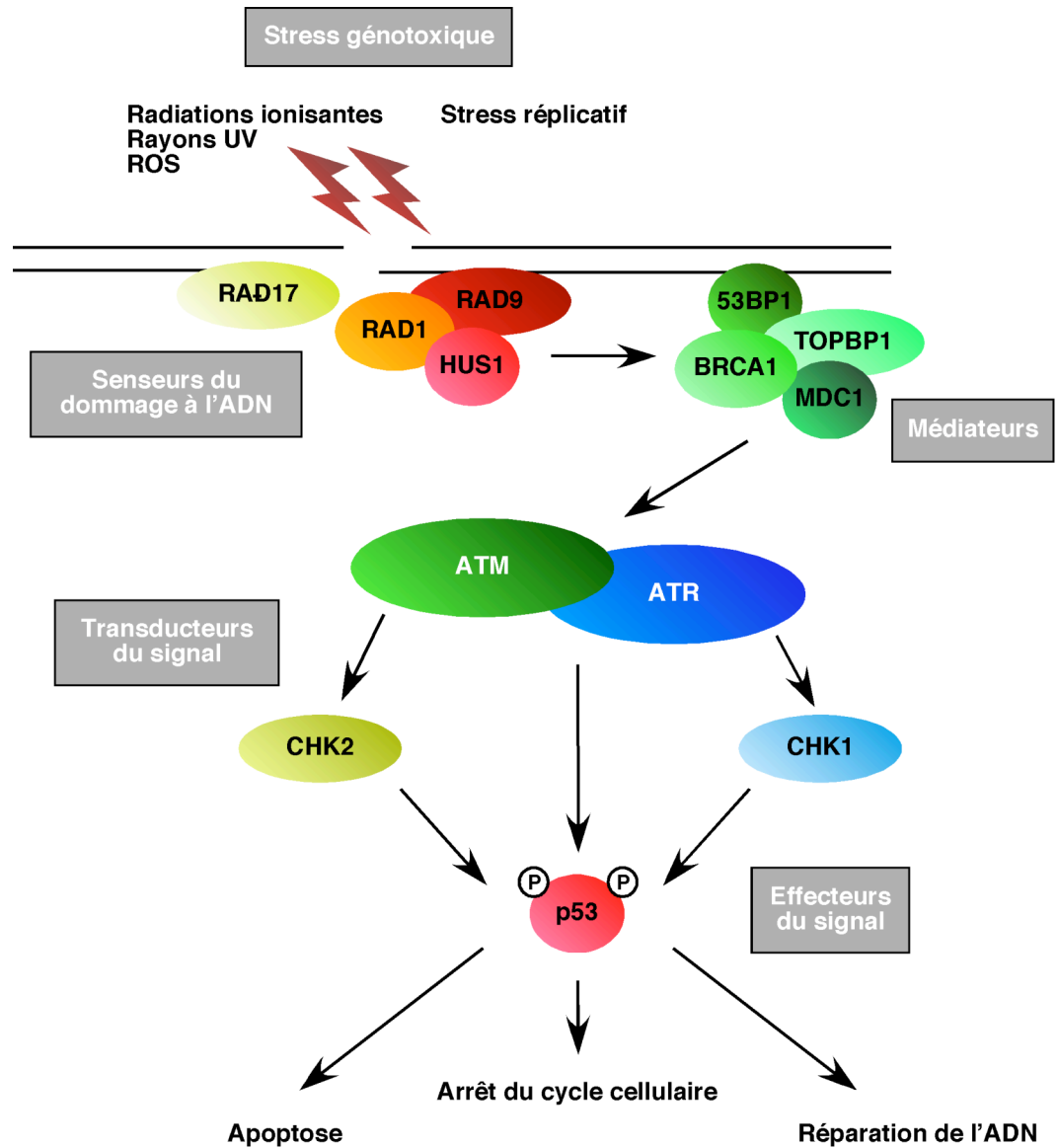


Figure 1.5 Schéma général des différentes classes de protéines impliquées dans la réponse au dommage à l'ADN.

Schéma adapté de Abraham, 2001 ^[163].

Comme nous venons de le voir, les principaux transducteurs de la DDR sont les protéines ATM et ATR, des sérine-thréonine kinases qui appartiennent à la famille des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K) et dont nous avons déjà brièvement parlé. Chez l'humain, des mutations dans le gène codant pour ATM sont associées au syndrome d'ataxie telangiectasie, une rare maladie autosomale récessive et neuro-dégénérative qui prédispose les personnes atteintes à développer des cancers ^[164].

ATM et ATR présentent une forte homologie au niveau de leur structure (Figure 1.6) ^[165]. En fait, elles partagent les mêmes domaines caractéristiques. Ainsi, ATM est une protéine de 3055 acides aminés composée d'une longue séquence en N-terminal et de trois domaines caractéristiques en C-terminal ^[163, 166]. Entre les acides aminés 2097 et 2489, on retrouve le domaine FAT (FAT pour FRAP, ATM, TRRAP), suivi, entre les acides aminés 2683 et 2962, du domaine catalytique PI3K. Enfin, entre les acides aminés 3026 et 3055, on retrouve le domaine FATC (FATC pour FRAP, ATM, TRRAP C-terminal). Pour ce qui est d'ATR, elle correspond à une protéine de 2644 acides aminés composée, en C-terminal, des trois mêmes domaines qu'ATM. Ainsi, on retrouve, entre les acides aminés 1771 et 2092, le domaine FAT, suivi, entre les acides aminés 2293 et 2567, du domaine PI3K. Enfin, entre les acides aminés 2612 et 2644, on retrouve le domaine FATC.

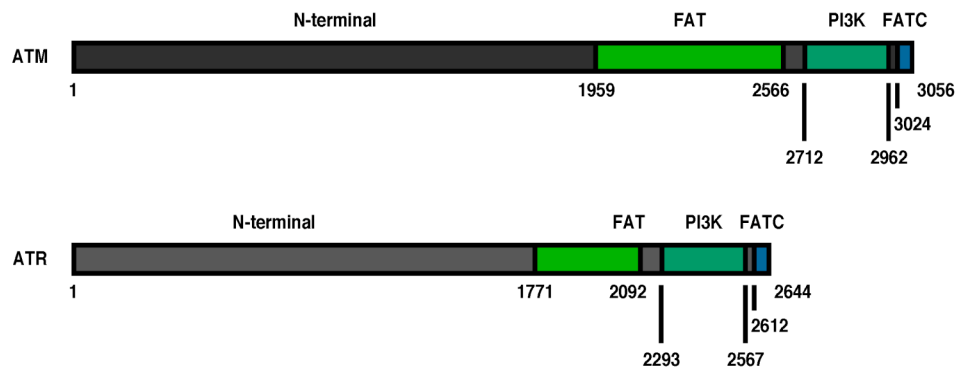


Figure 1.6 Représentation schématique des différents domaines protéiques des kinases ATM et ATR.

Les chiffres indiqués au bas de la figure font référence aux acides qui délimitent chaque domaine. **FAT**: domaine FRAP, ATM, TRRAP. **PI3K**: domaine catalytique des phosphotidyl-inositol-3 kinases. **FATC**: domaine FRAP, ATM, TRRAP C-terminal. Schéma adapté de Abraham, 2001 ^[163].

Bien qu'elles présentent d'importantes homologies au niveau de leur structure, ATM et ATR ne sont pas activées en réponse au même type de dommage à l'ADN. En effet, alors qu'ATM est principalement activée suite à des bris double-brin (DSBs, en anglais, pour *double-strand breaks*) provoqués par des radiations ionisantes ^[167, 168], ATR est, le plus souvent, activée par des agents qui bloquent la synthèse des précurseurs des nucléotides, tels les rayons ultraviolets et l'hydroxyurée, et, par conséquent, qui inhibent la réplication de l'ADN ^[169, 170]. Aussi, les réponses cellulaires engendrées suite à l'activation d'ATM et d'ATR ne sont pas les mêmes. Alors qu'ATM, en réponse à des DSBs, provoque l'arrêt du cycle cellulaire et initie la réparation de l'ADN, ATR, laquelle est principalement activée par des intermédiaires de la réplication de l'ADN, contrôle la progression des fourches de réplication ^[171]. Enfin, ATM et ATR diffèrent au niveau génétique. En effet, alors que les souris et les cellules humaines $ATM^{-/-}$ sont viables, les souris et les cellules

humaines ATR^{-/-} ne le sont pas ^[172]. De ce fait, ATR, mais pas ATM, est essentielle pour la viabilité de ces cellules ^[173].

Une fois activées, ATM et ATR sont en mesure de phosphoryler une multitude de cibles protéiques dont l'activation, ou l'inhibition, a pour but de conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, par l'activation des points de contrôle de la phase G1, de la phase S ou des phases G2/M, en vue de la réparation du dommage, et au contrôle de la réplication ^[150]. Puisque cette thèse s'intéresse principalement à la sénescence cellulaire, laquelle correspond à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, seule la régulation du point de contrôle de la phase G1 par les deux kinases est présentée.

L'activation du point de contrôle de la phase G1, suite à un dommage à l'ADN, mène ultimement à la stabilisation et à l'activation de p53 (Figure 1.7). Plus précisément, ATM activée est en mesure de phosphoryler directement p53 en S15, ce qui, comme il l'a déjà été mentionné, conduit à sa stabilisation ^[47, 48]. ATM activée contribue également à la stabilisation de p53 de façon indirecte, notamment en phosphorylant MDM2 ^[54, 105]. En effet, comme il l'a été mentionné plus tôt, la phosphorylation de MDM2 entraîne son ubiquitination et, par le fait même, sa dégradation par la voie du protéasome 26S. ATM activée phosphoryle aussi la kinase CHK2 laquelle, une fois activée, phosphoryle directement p53 en S15 ^[174]. Ainsi, l'activation du point de contrôle G1/S requiert l'activation d'ATM, laquelle est alors en mesure de stabiliser, de façon directe et indirecte, p53. La contribution d'ATR au point de contrôle G1/S est moins importante puisqu'elle est davantage impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADN et, donc, dans la régulation du point de contrôle S ^[175]. Cependant, il semble qu'ATR, une fois activée, est en mesure, comme ATM, de phosphoryler p53 en sérine 15 ^[49, 50].

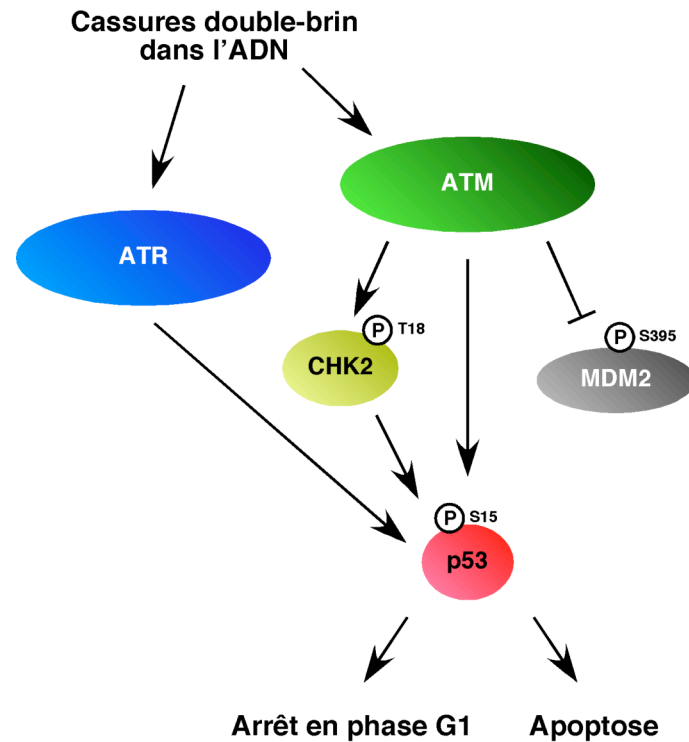


Figure 1.7 L'activation du point de contrôle G1/S par les kinases ATM et ATR.

Schéma adapté de Abraham, 2001 ^[163].

En absence de dommage à l'ADN, ATM se trouve dans un état inactif sous la forme d'un homodimère ^[150, 176]. Plus précisément, le domaine catalytique PI3K de chaque molécule interagit avec la région interne contenant la sérine 1981 de l'autre molécule. Cependant, suite à un DSB, l'altération de l'organisation structurale de la chromatine qui en découle déclenche l'autophosphorylation d'ATM en sérine 1981, ce qui conduit à la dissociation de l'homodimère et à la génération de deux molécules actives (Figure 1.8). ATM activée est alors en mesure de phosphoryler d'autres protéines afin d'induire un arrêt de la prolifération et de recruter la machinerie de réparation de l'ADN. Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont démontré l'importance du complexe protéique MRN dans l'activation d'ATM. Plus précisément, ce complexe, composé des protéines

MRE11 (en anglais, *meiotic recombination 11*), RAD50 et NBS1 (en anglais, *Nijmegen breakage syndrome 1*), faciliterait le recrutement d'ATM aux sites de dommage et, par le fait même, son autophosphorylation ^[177].

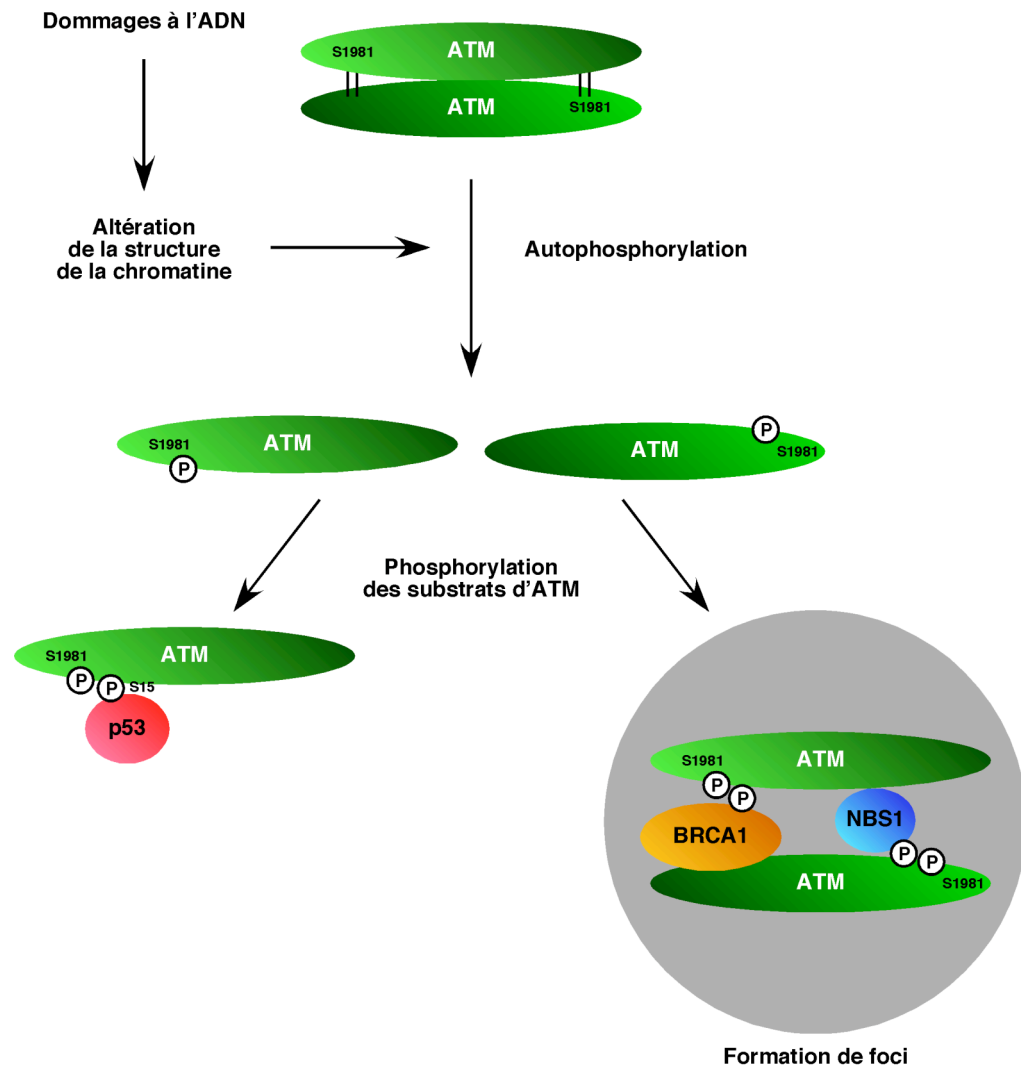


Figure 1.8 Schéma représentatif du mécanisme d'activation d'ATM.

Schéma adapté de Bakkenist, 2003 ^[176].

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, ATM et ATR sont activées en réponse à différents stimuli. Cependant, dans les dernières années, différents groupes ont démontré qu'ATR peut également être activée en réponse à des DSBs ^[178-181]. En fait, il semble qu'ATM, en réponse à des DSBs, initie la génération de régions locales d'ADN simple brin associé à la protéine de réplication A (RPA, en anglais, pour *replication protein A*), ce qui permet le recrutement d'ATR et, par la suite, son activation. Ainsi, les voies d'ATM et ATR ne sont pas complètement indépendantes, ce qui permet de relier les mécanismes de la réponse au dommage à l'ADN à ceux du contrôle de la réplication de l'ADN.

1.4.3.2 L'importance de la voie du dommage à l'ADN dans la sénescence

Comme il l'a déjà été mentionné, la sénescence répllicative résulte du raccourcissement des télomères, lequel s'effectue progressivement après chaque cycle de réplication de la cellule. Les télomères sont de longues séquences répétitives (5'-TTAGGG-3' chez les vertébrés) situées à l'extrémité des chromosomes linéaires ^[126]. Ils ont pour but de protéger ces extrémités de la dégradation et, ainsi, agissent comme une couche protectrice ^[182]. Cependant, au cours des cycles de division, les télomères s'érodent petit à petit, jusqu'à atteindre une taille limite, taille à laquelle ils ne sont plus fonctionnels. À ce stade, les télomères sont considérés comme de l'ADN endommagé par les senseurs des dommages à l'ADN. Il y a alors activation de la DDR et, par la suite, une entrée en sénescence de la cellule ^[142, 183-185]. Ainsi, la sénescence répllicative apparaît comme une conséquence de l'activation de la voie du dommage à l'ADN.

En plus d'être impliquée dans la mise en place de la sénescence répllicative, la DDR est essentielle pour l'établissement de la sénescence prématurée. En effet, il y a quelques années, trois groupes ont simultanément mis en évidence l'importance de la DDR dans l'établissement et le maintien de la OIS induite par différents oncogènes, tels H-RAS V12, MOS (en anglais, *Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog*), CDC6 (en anglais,

cell division cycle 6), la cycline E, E2F1 et ca-STAT5A (en anglais, *constitutively activated-STAT5A*)^[143-145]. Chacune de ces études tend à démontrer que la OIS est caractérisée par l'activation de la DDR et que son inactivation, principalement par l'expression de petits ARNs en forme d'épingle à cheveux (shRNA, en anglais, pour *small hairpin RNA*) dirigés contre ATM ou CHK2, est suffisante pour empêcher la mise en place de la OIS ou pour mettre fin à une OIS déjà établie. De plus, chacun des groupes montre que les cellules OIS accumulent des SDFs, lesquels ne colocalisent pas avec les SDFs associés aux télomères, ce qui suggère que la OIS ne dépend pas du raccourcissement des télomères et qu'elle est indépendante de la sénescence répllicative. Aussi, Di Micco et al. et Bartkova et al. montrent que la OIS est précédée d'une période d'hyper-prolifération, laquelle est requise pour déclencher la DDR. Ainsi, il semble que le stress réplcatif engendré par l'activation d'oncogènes mène à des altérations au niveau de la chromatine, lesquelles permettent d'activer la DDR et, par la suite, de mettre en place la OIS. En terminant, il est important de comprendre que la OIS requiert l'activation de la DDR non seulement pour être déclenchée, mais également pour être maintenue. De ce fait, elle est accompagnée d'une activation permanente de la DDR.

Comme nous venons de le voir, la DDR est une voie de signalisation qui permet à la cellule de percevoir un dommage à l'ADN et d'y remédier en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre que le dommage soit réparé par la machinerie de réparation de l'ADN. L'arrêt du cycle cellulaire déclenché par l'activation de la DDR peut être transitoire ou permanent, comme dans le cas de la sénescence. Encore aujourd'hui, on ne comprend pas très bien comment la cellule détermine si elle entre en arrêt de prolifération transitoire ou irréversible. Cependant, la sévérité du dommage qu'elle a subi semble être un facteur important^[126]. Ainsi, de façon générale, il semble qu'un dommage léger et réparable pousse la cellule à arrêter sa prolifération momentanément, alors qu'un dommage important, voire irréparable, la conduit vers un arrêt permanent de son cycle cellulaire.

1.4.4 Le rôle des suppresseurs de tumeur p53 et Rb dans la sénescence

La mise en place et le maintien de la sénescence sont assurés principalement par les voies de p53 et de p16/Rb ^[126]. Bien que les deux voies puissent s'entrecroiser, elles sont chacune en mesure d'inhiber la progression du cycle cellulaire de manière indépendante ^[126]. Aussi, selon plusieurs facteurs, tels l'espèce, la nature du stress ou le type cellulaire, l'implication de chacune des voies peut varier. Par exemple, chez la souris, la sénescence induite par l'oncogène H-RAS V12 requiert l'activation des deux voies, alors que chez l'humain, l'activation d'une seule des deux voies est suffisante ^[186]. Aussi, la sénescence induite par la protéine PML dépend essentiellement de la voie de Rb, mais pas de celle de p53 ^[187]. Dans les prochains paragraphes, une description de chacune des deux voies et de leur implication dans la sénescence est présentée.

1.4.4.1 La voie de p53 dans la sénescence

Comme il l'a déjà été mentionné, p53, en réponse à différents stress, est activée afin de déclencher diverses réponses cellulaires, lesquelles ont pour but de freiner la prolifération. La contribution de p53 dans la sénescence est majeure puisqu'elle régule l'expression de gènes directement impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Par exemple, p53 active directement l'expression du gène p21, lequel code pour une CDKI ^[188].

Les cyclines sont une famille de protéines dont l'expression et l'activité fluctuent périodiquement en phase avec le cycle cellulaire ^[189]. Elles sont essentielles pour l'activation des CDKs, des kinases dépendantes de cyclines (CDKs, en anglais, pour *cyclin-dependent kinases*). Ainsi, les CDKs, lesquelles ont une activité sérine/thréonine kinase, doivent être obligatoirement associées à une cycline pour pouvoir phosphoryler leurs cibles ^[189]. Il existe différents complexes cycline/CDK, lesquels varient selon l'étape à laquelle se trouve le cycle cellulaire (Figure 1.9). Par exemple, le complexe cyclineD1/CDK4,6 se forme durant la phase G1, alors que la formation du complexe cyclineA/CDK2 a lieu durant la phase S ^[189].

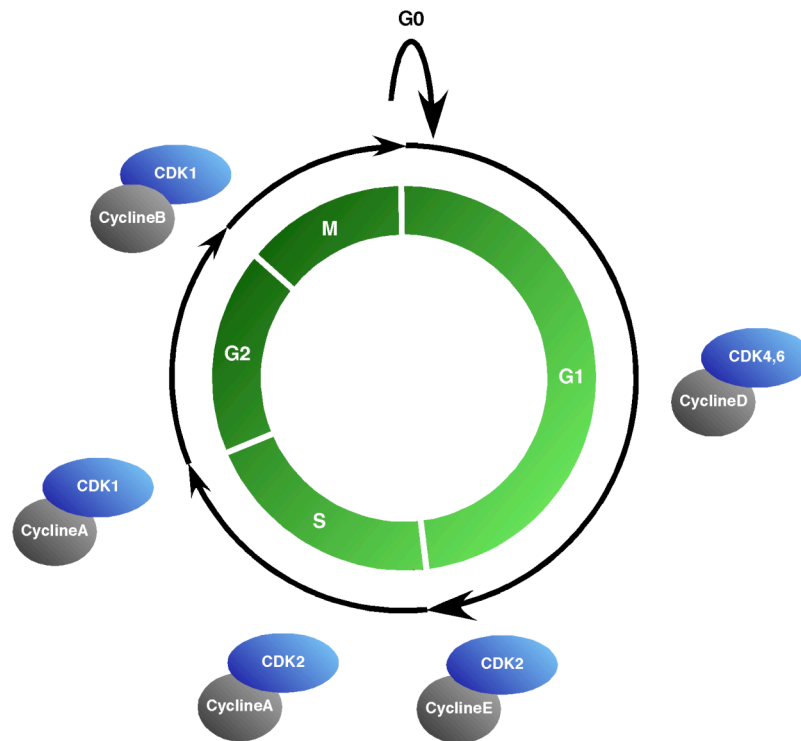


Figure 1.9 Le cycle cellulaire.

Les différents complexes Cycline/CDK formés au cours de chaque phase sont indiqués.

Ainsi, p21 bloque la transition G1/S du cycle cellulaire en inhibant spécifiquement les complexes cyclineD/CDK4 (phase G1) et cyclinesA,E/CDK2 (phase S) ^[189]. D'autres cibles transcriptionnelles de p53 sont également impliquées dans l'établissement de la sénescence. Par exemple, il a été démontré que GADD45 α contribue à l'établissement de la sénescence induite par l'expression de H-RAS V12, notamment par l'activation des kinases JNK (aussi appelée MAPK8 pour, en anglais, *mitogen-activated protein kinase 8*) et p38 (aussi appelée MAPK14 pour, en anglais, *mitogen-activated protein kinase 14*) ^[190]. Il a également été démontré que PML ^[191] stimule l'activité transcriptionnelle de p53 pour

l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène H-RAS V12^[147]. Enfin, il a été démontré que PAI1 (en anglais, *plasminogen activator inhibitor 1*) est requise et suffisante pour la mise en place de la sénescence répllicative^[192].

1.4.4.2 La voie de p16/Rb dans la sénescence

La protéine Rb constitue, avec p53, l'un des principaux suppresseurs de tumeur de la cellule. Son importance dans la protection de la cellule contre la transformation maligne a été largement démontrée, notamment en raison du fait que son inactivation initie le développement de plusieurs cancers chez les jeunes enfants, tels les rétinoblastomes (d'où son nom)^[193, 194] et les ostéosarcomes^[195-197]. De plus, chez l'adulte, l'inactivation de Rb par l'oncoprotéine E7 du virus du papillome humain initie le développement de carcinomes cervicaux et de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^[198, 199].

Rb agit en tant que suppresseur de tumeur principalement en inhibant les E2Fs, une famille de facteurs de transcription essentiels à la transition G1/S du cycle cellulaire^[200, 201]. En fait, en absence de stress, Rb est maintenue dans un état inactif par l'action du complexe cycline D1/CDK4,6^[202, 203]. Plus précisément, Rb est inactivée suite à sa phosphorylation par ce complexe^[202, 203]. Comme le complexe cyclinD1/CDK4,6 phosphoryle Rb sur plusieurs résidus, on parle de Rb «hyperphosphorylée» pour faire référence à son état inactif. Lorsque la cellule est soumise à un stress, le complexe cyclinD1/CDK4,6 est inactivé par le suppresseur de tumeur p16, un inhibiteur de CDK4^[204]. De ce fait, Rb n'est plus phosphorylée et se retrouve alors «hypophosphorylée», c'est-à-dire active. Rb activée est en mesure d'interagir avec les facteurs de transcription E2Fs et de les séquestrer de façon à les empêcher d'activer l'expression de leurs gènes cibles. Puisque les gènes régulés par les E2Fs sont essentiels au passage de la cellule en phase S, le cycle cellulaire est alors arrêté en phase G1^[202].

La protéine p16, ou p16^{INK4a}, est un des produits du locus INK4b-ARF-INK4a (Figure 1.10), lequel code pour deux autres protéines: la protéine p15^{INK4b} (aussi appelée

CDKN2B pour, en anglais, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*), une autre CDKI, et la protéine ARF, un inhibiteur de MDM2 [203]. Bien que p16^{INK4A} et p15^{INK4B} soient deux protéines fortement semblables (les deux gènes dont ils proviennent sont à l'origine d'une duplication en tandem d'exons), ARF, pour sa part, n'y est aucunement lié (le gène codant pour ARF utilise un exon qu'on ne retrouve pas dans les deux autres protéines et, comme son nom l'indique, est transcrit selon un cadre de lecture différent) [203]. Néanmoins, les trois protéines agissent comme des suppresseurs de tumeur. Ainsi, p16^{INK4a} et p15^{INK4b} favorisent l'hypophosphorylation de Rb en inhibant des complexes cycline/CDK, alors que ARF contribue à la stabilisation de p53 en inhibant l'activité ubiquitine ligase de MDM2 [203]. Il est important de noter que p53 assure la répression transcriptionnelle de ARF [205]. Ainsi, p53, de la même façon qu'avec MDM2, assure une rétro-inhibition de sa propre activité.

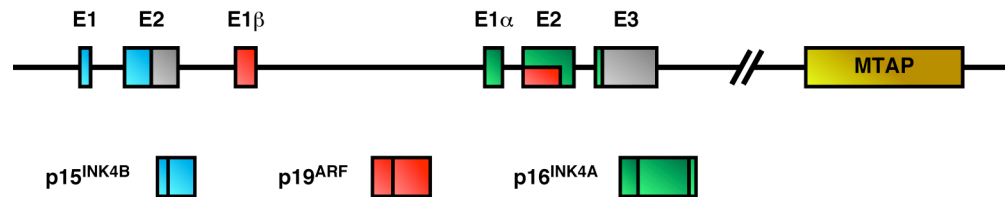


Figure 1.10 Représentation schématique du locus INK4b-ARF-INK4a.

Schéma adapté de Gil, 2006 [203].

Comme il l'a été mentionné précédemment, p16 inhibe le complexe cyclineD1/CDK4,6 de façon à maintenir Rb dans son état actif. La CDKI p21, dont nous avons parlé plus tôt, inhibe elle aussi le complexe cyclineD1/CDK4, de même que le complexe cyclinesA,E/CDK2. Ainsi, les voies de p53 et p16/Rb se rejoignent puisqu'elles

assurent et maintiennent toutes deux l'hypophosphorylation de Rb et, par conséquent, mènent à l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 1.11).

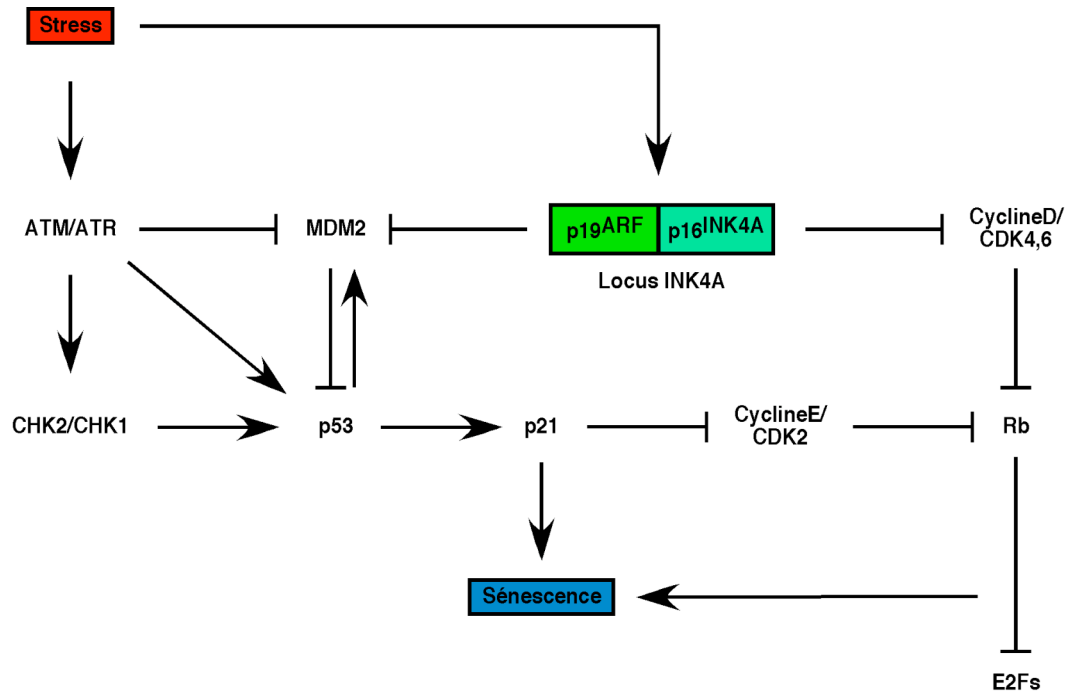


Figure 1.11 Les voies de p53 et p16/Rb dans la sénescence.

1.4.5 L'importance de la sénescence *in vivo*

Initialement, les expériences qui ont permis à Hayflick de mettre en évidence la sénescence répliquative ont été réalisées à partir de cellules en culture. Au cours des dernières décennies, la majorité des études qui ont contribué à l'avancement des connaissances et à la compréhension de ce mécanisme anti-prolifératif se sont elles aussi basées sur des expériences réalisées avec des cellules en culture. C'est seulement dans les dernières années que l'importance de la sénescence *in vivo* a été démontrée.

Chez les rongeurs, les primates et l'humain, les cellules sénescences sont présentes dans différents tissus capables de se régénérer, tels le système vasculaire, le système hématopoïétique, différents organes épithéliaux et le stroma ^[140, 206, 207]. Alors qu'on en retrouve très peu dans les jeunes organismes, leur présence est accrue dans les organismes âgés ^[126]. Ainsi, les cellules sénescences semblent s'accumuler à mesure qu'un organisme vieillit. D'ailleurs, la majorité d'entre elles présentent une accumulation de SDFs, lesquels co-localisent avec les télomères, ce qui tend à démontrer que la sénescence répliquative a lieu *in vivo* ^[126]. Au cours des dernières années, plusieurs études ont également montré que les cellules sénescences s'accumulent dans les tissus atteints par des maladies chroniques associées au vieillissement, telles l'ostéoartrite et l'athérosclérose ^[208, 209]. Ainsi, les cellules sénescences semblent être intimement liées au vieillissement et aux maladies qui en découlent.

En plus de s'accumuler aux sites de pathologies associées au vieillissement, les cellules sénescences sont retrouvées dans des lésions bénignes dysplasiques ou pré-néoplasiques ^[210-212], de même que dans l'hyperplasie bénigne de la prostate ^[213] et dans les naevi mélaniques (communément appelés «grains de beauté») ^[214], mais jamais dans des tumeurs malignes. De ce fait, la sénescence, même *in vivo*, apparaît comme une barrière à la progression des cellules vers la transformation maligne.

1.4.6 Le caractère sécrétoire des cellules sénescences ou le SASP

Dans les dernières années, plusieurs groupes ont démontré que les cellules sénescences influencent le comportement des cellules environnantes, principalement par la sécrétion d'une multitude de protéines, tels des facteurs de croissance, des cytokines proinflammatoires et des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (Tableau 1.2) ^[215]. Ce caractère sécrétoire des cellules sénescences, appelé le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP, en anglais, pour *senescence-associated secretory phenotype*) ^[215], apparaît bénéfique ou délétère pour l'organisme, selon l'état général dans

lequel il se trouve et l'état de la cellule sur laquelle il agit ^[216]. Par exemple, selon le contexte, le SASP peut contribuer au renforcement de la sénescence ou, au contraire, il peut contribuer à la transformation des cellules présentes dans des lésions pré-néoplasiques. Dans les prochains paragraphes, les différents effets engendrés par le SASP sont présentés.

Tableau 1.2 Liste des principaux facteurs du SASP.

Tableau tiré de Freund, 2010 ^[216].

Facteur	Inducteur de la sénescence	Type cellulaire	Référence
GM-CSF	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Acosta, Coppe
GRO α	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3, fibroblastes de la prostate (PSC27, PSC31 et PSC32)	Acosta, Coppe, Bavik
GRO α,β,γ	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Acosta, Rodier, Coppe
IGFBP-7	OIS (BRAF)	Mélanocytes	Wajapeyee
IL-1 α	OIS (RAS, MEK), DDIS	IMR-90, HCA2, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Acosta, Coppe, Liu
IL-6	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Acosta, Rodier, Coppe
IL-7	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ	Coppe
IL-8	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3, fibroblastes de la prostate (PSC27, PSC31 et PSC32)	Acosta, Rodier, Coppe, Bavik
MCP-1	OIS (RAS, MEK), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Acosta, Rodier, Coppe, Liu
MCP-2	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ	Coppe
MIP-1 α	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, PrECs, BPH1, RWPE1, PC3	Coppe
MMP-1	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ	Coppe, Liu
MMP-10	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ, myofibroblastes hépatiques	Coppe, Krizhanovsky
MMP-3	OIS (RAS), DDIS, REP	IMR-90, HCA2, WI-38, BJ	Coppe, Liu, Parrinello

1.4.6.1 Les effets bénéfiques du SASP

Il y a quelques années, différents groupes ont démontré que certaines cytokines sécrétées par les cellules sénescents et qui font partie du SASP, telles IL-6 (en anglais, *interleukin-6*) ^[217], IL-8 (en anglais, *interleukin-8*) ^[218], CXCL1 (en anglais, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*, aussi connue sous le nom de GRO α) et IGFBP7 (en anglais, *insulin-like growth factor binding protein 7*) ^[219], sont en mesure de renforcer le mécanisme de sénescence, dans des cellules primaires, suite à l'expression d'oncogènes, et qu'elles

coopèrent avec les voies de p53 et de Rb pour réduire les risques de transformation maligne. De plus, l'inhibition de ces cytokines suffit à mettre fin à l'état de sénescence. Il semble donc que, dans ce contexte, le SASP contribue à l'effet anti-prolifératif et anti-tumoral de la sénescence.

Un autre effet bénéfique du SASP a été mis en évidence suite à la réactivation de p53 dans des carcinomes p53^{-/-} du foie chez la souris [220]. Plus précisément, Xue et al. ont démontré que la réactivation de p53 dans ces tumeurs provoque l'entrée en sénescence de ces cellules, lesquelles sont par la suite éliminées par les cellules du système immunitaire inné (macrophages, neutrophiles et cellules NK). En fait, l'activation et le recrutement de ces cellules au site des tumeurs découlent d'une augmentation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules sénescents, telles Csf1 (en anglais, *colony stimulating factor 1*), Ccl2 (en anglais, *chemokine (C-C motif) ligand 2*), Cxcl1 et Il-15 (en anglais, *interleukin-15*). Ainsi, il semble que le SASP puisse contribuer à la suppression de cellules tumorales *in vivo*.

1.4.6.2 Les effets délétères du SASP

Comme nous venons de le voir, le SASP peut être associé, dans certains contextes, aux mécanismes anti-prolifératifs et à la protection contre le cancer. Cependant, dans d'autres situations, le caractère sécrétoire des cellules sénescents peut engendrer des effets non désirables pour l'organisme. En effet, la multitude de facteurs pro-inflammatoires qui constituent le SASP peuvent, à long terme, contribuer au développement de maladies associées au vieillissement, telles l'ostéoarthrite et l'athérosclérose, de même qu'au cancer [221-223].

1.4.6.2.1 Le SASP et les maladies chroniques associées au vieillissement

Les maladies chroniques associées au vieillissement sont à l'origine de l'inflammation chronique d'un tissu donné, laquelle découle de la présence continue de

facteurs proinflammatoires à des niveaux supérieurs à la normale ^[216]. Bien qu'il existe une forte corrélation entre l'inflammation et le vieillissement, aucun lien causal n'a encore été établi. En effet, aucune évidence n'est en mesure de déterminer si l'inflammation chronique des tissus est une conséquence du vieillissement de l'organisme ou, à l'inverse, si le vieillissement résulte de l'inflammation chronique. En fait, l'inflammation et le vieillissement sont peut-être trop intimement liés pour être considérés séparément ^[216]. Néanmoins, l'un et l'autre s'influencent et, de ce fait, ils sont tous deux impliqués dans le développement des maladies chroniques associées au vieillissement.

Les facteurs proinflammatoires à l'origine de l'inflammation chronique proviennent essentiellement de deux sources: les cellules du système immunitaire, lesquelles subissent une activation progressive à mesure que l'organisme vieillit ^[224, 225], et les cellules sénescentes, lesquelles s'accumulent avec l'âge ^[215, 226, 227]. À long terme, la présence continue de ces facteurs proinflammatoires entraîne des effets indésirables. En effet, l'inflammation chronique qui en découle peut engendrer la destruction des microenvironnements tissulaires et perturber la fonction des cellules souches ^[216]. Il y a alors une détérioration des tissus et le développement de pathologies.

1.4.6.2.2 Le SASP et la transformation maligne

En plus de contribuer à l'inflammation chronique à l'origine de maladies associées au vieillissement, il a été démontré que le SASP favorise également la prolifération et l'activité angiogénique des cellules voisines précancéreuses, en culture et *in vivo* ^[228-230]. Ainsi, les cellules sénescentes, lesquelles sont à l'origine d'une défense de l'organisme contre la transformation maligne, contribuent, par les facteurs qu'elles sécrètent, à la transformation maligne de cellules voisines prédisposées. Ces résultats semblent contredire le fait que certaines cytokines, comme nous l'avons mentionné plus tôt, sont en mesure, au contraire, de renforcer le mécanisme de sénescence. En fait, il semble que l'état des cellules sur lesquelles le SASP agit détermine l'effet engendré. Par exemple, l'action de l'IL-6 sur

des cellules normales dans lesquelles il y a activation d'un oncogène contribue à l'entrée en sénescence de ces cellules ^[217]. Cependant, l'action de cette même cytokine sur des cellules précancéreuses dans lesquelles la voie de p53 est inactivée contribue, à l'inverse, à la transformation maligne de ces cellules ^[217].

1.4.7 Résumé du concept de la sénescence cellulaire

La sénescence correspond à un mécanisme anti-prolifératif lequel apparaît, selon le contexte, bénéfique ou délétère pour l'organisme. En effet, alors qu'elle permet de contrer la transformation maligne en bloquant, de manière irréversible, la prolifération de cellules susceptibles de devenir cancéreuses, la sénescence contribue également au vieillissement et au développement de maladies chroniques qui y sont associées en stimulant l'inflammation et, dans certains cas, elle peut même faciliter la transformation maligne. Ainsi, lorsqu'une cellule est soumise à l'activation d'un oncogène, le SASP contribue à renforcer son entrée en sénescence. Cependant, lorsqu'une cellule est prédisposée à la transformation maligne, notamment en raison d'une altération des voies de suppression tumorale, le SASP participe, à l'inverse, au développement d'une tumeur. En plus de dépendre de l'état de la cellule sur laquelle il agit, l'effet du SASP peut également varier selon l'âge de l'organisme. En effet, à mesure qu'un organisme vieillit, les cellules sénescents s'accumulent ce qui, par le fait même, entraîne l'accumulation à long terme de facteurs proinflammatoires lesquels, à leur tour, conduisent à une inflammation chronique des tissus.

En résumé, on peut supposer que les premières cellules sénescents qui apparaissent dans un organisme ont un effet anti-tumoral. Cependant, si elles ne sont pas éliminées par le système immunitaire, comme nous l'avons plus tôt, et qu'elles persistent sur une longue période, elles en viennent à avoir des effets néfastes sur leur environnement. Pour plusieurs, cette caractéristique s'explique par la théorie de la pléiotropie antagoniste, selon laquelle certains traits qui sont bénéfiques pour un jeune organisme deviennent délétères à mesure que l'organisme vieillit ^[231].

1.5 Les cytokines et la voie de signalisation JAK/STAT

Les cytokines correspondent à une vaste famille de petites protéines sécrétées impliquées dans la signalisation extracellulaire. Plus précisément, elles assurent, par leur interaction avec des récepteurs spécifiques, la transduction du signal à travers la cellule. Elles sont impliquées dans la régulation de divers mécanismes, tels le développement et la maturation des cellules hématopoïétiques et la réponse immunitaire ^[232, 233]. Les cytokines comprennent les facteurs hématopoïétiques de croissance, les interférons et les interleukines.

Les cytokines utilisent différentes voies de signalisation pour induire une réponse cellulaire spécifique. Parmi elles, on retrouve la voie JAK/STAT ^[232]. Dans les prochains paragraphes, une description détaillée de cette voie ainsi que des principales protéines qui y sont impliquées est présentée.

1.5.1 La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT (Figure 1.12) permet la transduction d'une multitude de signaux à travers la cellule. Son activation stimule la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires, de même que l'entrée en apoptose ^[234]. De façon générale, la liaison d'une cytokine à son récepteur provoque l'oligomérisation de ce dernier. Les récepteurs aux cytokines peuvent ainsi former des homodimères, des hétérodimères ou, encore, des unités multimériques ^[235].

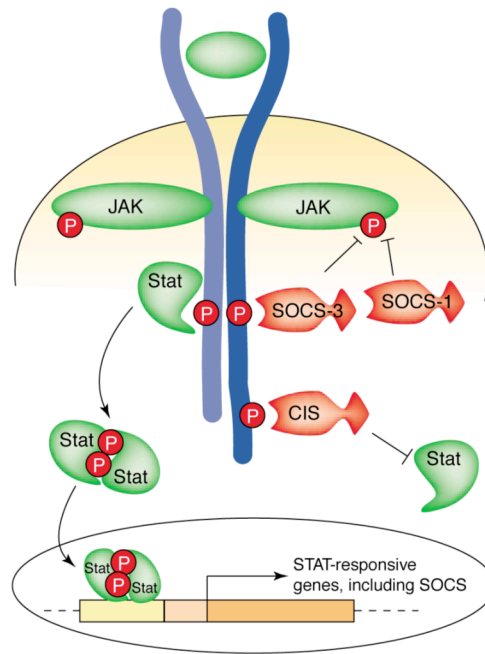


Figure 1.12 La voie de signalisation JAK/STAT.

Figure tirée de Kile, 2002 ^[235].

Bien que certains récepteurs aux cytokines possèdent une activité enzymatique intrinsèque, tels c-Kit (aussi appelée KIT pour, en anglais, *v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*), FLT3 (en anglais, *fms-related tyrosine kinase 3*) et FMS (aussi appelée CSF1R pour, en anglais, *colony stimulating factor 1 receptor*), la majorité en est dépourvue ^[233]. Afin d'assurer la transduction du signal, ces derniers recourent à l'activité enzymatique des JAKs (en anglais, *Janus kinases*), une famille de tyrosine kinases cytoplasmiques ^[236]. Ainsi, suite à la liaison d'une cytokine à son récepteur et à l'oligomérisation de ce dernier, les JAKs sont recrutées à proximité du récepteur et sont activées par autophosphorylation. Une fois activées, les JAKs sont en mesure de phosphoryler les résidus tyrosine de la queue cytoplasmique du récepteur. Ces résidus

phosphotyrosine servent de site d'ancrage à des protéines qui contiennent un domaine PTB (en anglais, *protein tyrosine binding domain*) ou SH2 (en anglais, *Src homology 2 domain*), telle la famille des STATs (en anglais, *signal transducers and activators of transcription*)^[235]. Une fois liées au récepteur, les STATs se trouvent à proximité des JAKs et, par le fait même, sont phosphorylées par ces dernières. La phosphorylation des STATs entraîne leur détachement du récepteur, leur dimérisation et, finalement, leur migration au noyau, où elles peuvent alors agir en tant que facteurs de transcription^[233, 235]. La dimérisation des STATs implique l'interaction du domaine SH2 d'une molécule STAT avec un résidu phosphotyrosine situé en C-terminal d'une autre molécule STAT^[235]. La liaison des STATs à des régions promotrices spécifiques permet ainsi l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux cytokines.

En plus d'activer les STATs, les JAKs sont en mesure de phosphoryler des protéines impliquées dans les voies de signalisation MAPK (en anglais, *Ras-mitogen-activated protein kinases*) et PI3K/PKB (en anglais, *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*), telles SHC (en anglais, *(Src homology 2 domain containing) transforming protein*) et la sous-unité p85 de PI3K^[237]. Cette interdépendance entre les voies JAK/STAT, MAPK et PI3K/PKB permet à la cellule d'utiliser des voies alternatives, dans le cas où la voie classique est défectueuse, pour induire une réponse spécifique.

1.5.2 La régulation négative de la voie JAK/STAT

Afin de prévenir une signalisation excessive et anormale pouvant mener au développement de maladies auto-immunes ou, encore, à la transformation maligne, différents mécanismes assurent une régulation négative de la signalisation par les cytokines^[233]. Parmi ceux-ci, on compte la compétition au récepteur par des sous-unités solubles du récepteur, l'internalisation et la dégradation du récepteur, l'inactivation des JAKs par des phosphatases ou, encore, l'inactivation des STATs par la famille de protéines PIAS (en anglais, *protein inhibitors of activated STATs*)^[233, 238, 239]. La voie JAK/STAT est

également régulée par une importante famille de protéines, les SOCS (en anglais, *suppressors of cytokine signaling*), des cibles transcriptionnelles des STATs qui agissent en tant que rétro-inhibiteurs de la voie ^[233].

1.5.3 La famille des SOCS

La famille des SOCS est composée de huit membres: SOCS1 à SOCS7 et la protéine CIS (en anglais, *cytokine inducible SH2-containing protein*) ^[240]. Toutes les SOCS partagent un domaine central SH2, un domaine SOCS box au niveau du C-terminus et une région N-terminale variable, tant au niveau de la longueur que de la composition en acides aminés ^[233, 240]. Le domaine SH2 leur permet de reconnaître et de lier des résidus phosphotyrosine alors que le domaine SOCS box leur confère une activité ubiquitine E3 ligase, comme nous le verrons plus loin.

Le domaine SOCS box, bien qu'il ait été initialement identifié comme une région caractéristique des SOCS ^[235], est retrouvé dans plus d'une quarantaine de protéines, lesquelles sont réparties à travers cinq classes protéiques distinctes ^[241]. En plus de la famille des SOCS, le SOCS box est caractéristique des protéines WSB (en anglais, *WD-40-repeat-containing proteins with a SOCS box*), des protéines SSB (en anglais, *SPRY domain-containing proteins with a SOCS box*), des protéines ASB (en anglais, *ankyrin-repeat-containing proteins with a SOCS box*) et d'une famille de petites GTPases ^[241]. Dans tous les cas, le SOCS box est situé à la queue C-terminale de la protéine, ou à proximité. De plus, toutes les protéines qui contiennent un SOCS box possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine situé en N-terminal de ce dernier: domaine SH2 ^[242] pour les protéines SOCS, motif WD-40 ^[243] pour les protéines WSB, domaine SPRY ^[244] pour les protéines SSB ou, encore, motif de répétition ankyrin ^[245] pour les protéines ASB.

Les différentes SOCS sont induites en réponse à une multitude de cytokines. Elles assurent la rétro-inhibition de la voie JAK/STAT au moyen de deux mécanismes ^[246]. Le premier implique une compétition entre les SOCS et les STATs au niveau des résidus

phosphotyrosine de la queue cytoplasmique du récepteur. En bloquant ainsi la liaison des STATs au récepteur, les SOCS empêchent leur phosphorylation par les JAKs et, par le fait même, leur activation. Les protéines CIS et SOCS2 agissent de cette manière ^[246]. Le deuxième mécanisme implique l'inhibition des JAKs par les SOCS. En inhibant les JAKs, les SOCS empêchent la phosphorylation du récepteur et celle des STATs et, donc, l'activation de la voie. SOCS1 et SOCS3 inhibent la voie par ce mécanisme ^[246].

1.5.3.1 La protéine SOCS1

Des huit membres de la famille des SOCS, SOCS1 est la deuxième à avoir été identifiée, après la protéine CIS ^[247]. En fait, elle a été mise en évidence simultanément par trois groupes distincts. Tout d'abord, Starr et al. l'ont identifiée suite à un criblage systématique de gènes capables de réguler négativement la signalisation par le récepteur de l'interleukine 6 (IL-6) ^[248]. Par la suite, Endo et al. l'ont identifiée en tant que partenaire d'interaction des JAKs (JAB, en anglais, pour *JAK-binding protein*) ^[249]. Enfin, Naka et al. l'ont identifiée en tant qu'inhibiteur des STATs induit par les STATs (SSI, en anglais, pour *STAT-induced STAT inhibitor*) ^[250].

Comme les autres protéines SOCS, SOCS1 est composée d'un domaine SH2 (acides aminés 78-168) et d'un domaine SOCS box (acides aminés 169-211). Sa région N-terminale est relativement courte (acides aminés 1-77) et fortement basique (Figure 1.13) ^[233].

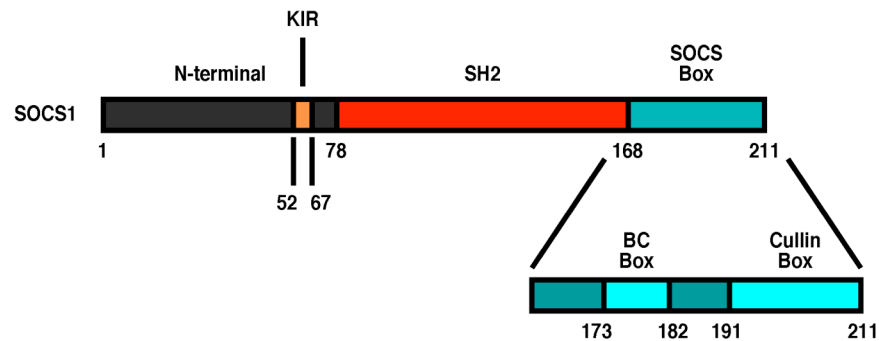


Figure 1.13 Représentation schématique des différents domaines protéiques de SOCS1.

Les chiffres indiqués au bas de la figure font référence aux acides aminés qui délimitent chaque domaine. **KIR**: kinase inhibitory region. **SH2**: domaine SH2. **SOCS Box**: domaine SOCS Box. **BC Box**: domaine de liaison au complexe Elongin B/C. **Cullin Box**: domaine de liaison au complexe Cullin5/Rbx2.

La capacité de SOCS1 d'inhiber la signalisation par diverses cytokines s'explique du fait qu'elle est capable de lier et d'inhiber les quatre membres de la famille des JAKs (JAK1-3 et TYK2 pour, en anglais, *tyrosine kinase 2*)^[249-253]. Plus précisément, SOCS1 inhibe l'activité catalytique des JAKs en agissant en tant que pseudosubstrat^[253]. Son domaine SH2 lie la poche catalytique des JAKs et, de cette façon, elle bloque l'accès à leurs véritables substrats, tels les STATs^[253]. Il est important de souligner que l'activation des JAKs est requise pour leur inhibition par SOCS1. Par exemple, dans le cas de JAK2, la phosphorylation de la tyrosine 1007 (pY1007) de son domaine JH1 est essentielle pour l'inhibition effectuée par SOCS1^[254]. De plus, il a été démontré que l'arginine en position 105 (R105) du domaine SH2 de SOCS1 est nécessaire pour son interaction avec les JAKs^[253, 255]. Enfin, une région de 24 acides aminés située en N-terminal du domaine SH2, le domaine KIR (en anglais, *kinase inhibitory region*), permet une liaison optimale de SOCS1 aux JAKs^[251-253].

Il a été démontré que le domaine SOCS box de SOCS1 est également nécessaire pour l'inhibition complète des JAKs. En fait, SOCS1, en plus d'inhiber leur activité catalytique, est en mesure de recruter, par le biais de son SOCS box, la machinerie requise pour l'ubiquitination des JAKs et, par conséquent, favorise leur dégradation en les dirigeant vers la voie du protéasome 26S ^[233].

1.5.3.2 L'activité ubiquitine ligase de SOCS1

Le domaine SOCS box de SOCS1 comprend deux régions caractéristiques, lesquelles sont en mesure de recruter la machinerie d'ubiquitination. Plus précisément, la région BC (en anglais, *BC box*), située entre les acides aminés 173 et 182, permet de lier le complexe Elongin B/C alors que la région Cullin (en anglais, *Cullin box*), située entre les acides aminés 191-211, permet de recruter le complexe CUL5/RBX2 ^[256].

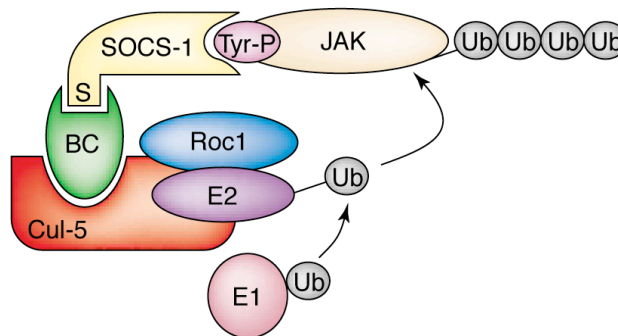


Figure 1.14 Le complexe d'ubiquitination formé par SOCS1.

Figure tirée de Kile, 2002 ^[235].

Initialement, le complexe Elongin B/C a été identifié comme un régulateur positif de la protéine Elongin A, un facteur de transcription capable d'augmenter la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II *in vitro* ^[257, 258]. Plus tard, il a été démontré que le

complexe Elongin B/C peut également s'associer à un complexe d'E3 ligases. En effet, l'Elongin B et C, avec les protéines Cullin et RBX (en anglais, *RING finger-containing protein*), forment les sous-unités d'un complexe CDL (en anglais, *Cullin-dependent ubiquitin ligase*), une large classe d'E3 ligases ^[259]. La classe des CDLs comprend les complexes SCF (en anglais, *SKP1—CUL1—F-box protein*) et ECS (en anglais, *Elongin B/C—CUL2—SOCS-box protein*) ^[260-262], lesquels, bien qu'ils ne soient pas composés des mêmes sous-unités protéiques, s'assemblent de manière semblable pour recruter la machinerie d'ubiquitination. Dans le cas du complexe SCF, la protéine SKP1 (en anglais, *S-phase kinase-associated protein 1*) s'associe, d'une part, au domaine F-box des protéines à F-box et, d'autre part, au module CUL1-RBX1, lequel est en mesure d'interagir et de recruter l'enzyme de conjugaison E2 du complexe d'ubiquitination ^[256]. Pour ce qui est du complexe ECS, les protéines Elongin B/C interagissent, d'une part, avec le domaine SOCS box des protéines à SOCS box et, d'autre part, avec le module CUL2/RBX1 ou CUL5/RBX2 afin de recruter, comme pour le complexe SCF, une enzyme E2 ^[256].

Pour ce qui est du complexe ECS spécifique à SOCS1, il est formé suite à l'interaction de l'Elongin B/C avec, d'une part, la région BC du domaine SOCS box (en fait, seule l'Elongin C interagit directement avec SOCS1) et, d'autre part, avec CUL5, laquelle est associée à RBX2 ^[256, 263]. Bien que le module CUL5/RBX2 soit recruté par le complexe Elongin B/C, CUL5 est elle-même en mesure d'interagir avec la région Cullin du SOCS box ^[235]. CUL5, une fois associée à SOCS1 et à l'Elongin B/C, peut alors recruter l'enzyme de conjugaison E2. Cette interaction entre CUL5 et E2 est stabilisée par la protéine d'échafaudage RBX2 ^[235]. Le fait que le complexe ECS contenant SOCS1 interagisse préférentiellement avec CUL5 plutôt que CUL2 indique que les Cullins contribuent à déterminer la nature de la protéine SOCS box recrutée dans le complexe ^[233].

Ainsi, SOCS1 semble agir comme une protéine adaptatrice. En effet, d'une part, elle cible et s'associe, à l'aide de son domaine SH2, à des protéines spécifiques, comme les

JAKs. D'autre part, à l'aide de son domaine SOCS box, elle recrute la machinerie d'ubiquitination nécessaire pour la dégradation de ses protéines cibles.

En plus de cibler les JAKs, SOCS1 assure la dégradation de plusieurs autres protéines. Parmi celles-ci, on compte Tel-JAK2^[254, 264, 265], laquelle correspond à une forme oncogénique de JAK2, VAV1, un facteur d'échange de guanine (GEF, en anglais, pour *guanine nucleotide exchange factor*) de la famille Rho des protéines liant le GTP spécifique aux cellules hématopoïétiques^[266], et les substrats du récepteur à l'insuline 1 et 2 (IRS1 et IRS2, en anglais, pour *insulin receptor substrate 1 and 2*)^[267].

En terminant, des études génétiques ont permis de mettre en évidence l'importance du domaine SOCS box pour les fonctions de SOCS1 *in vivo*. En effet, la délétion du domaine SOCS box de SOCS1, chez la souris, conduit à une perte de fonction partielle de la protéine et mène au développement d'une maladie inflammatoire mortelle^[268].

1.5.3.3 La régulation de l'expression de SOCS1

L'expression de SOCS1 est régulée par divers mécanismes au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

L'activation de la transcription de SOCS1 requiert l'activation des STATs^[233]. En fait, le promoteur de SOCS1 contient des sites de liaison pour STAT1, STAT3, STAT5 et STAT6^[250, 269], ce qui explique que son expression est induite en réponse à un grand nombre de cytokines. De plus, lorsque SOCS1 est surexprimée, elle est en mesure d'inhiber la plupart des cytokines qui induisent son expression^[240]. En plus d'être activée par les STATs, la transcription de SOCS1 est réprimée par le répresseur transcriptionnel GFI-1B (en anglais, *growth factor independence-1B*)^[270]. Cependant, une stimulation à l'érythropoïétine (EPO) permet de diminuer l'expression de GFI-1B ce qui, par conséquent, conduit à l'activation transcriptionnelle de SOCS1^[233]. La transcription de SOCS1 peut également être inhibée par la méthylation d'îlots CpG dans son promoteur^[271].

Au cours de l'initiation de la traduction, l'expression de SOCS1 est inhibée par un mécanisme coiffe-dépendant qui fait intervenir les protéines de liaison au facteur eIF4E (eIF4EBPs, en anglais, pour *eukaryotic translation initiation factor 4E binding proteins*)^[272]. Au niveau post-traductionnel, SOCS1 est une protéine très instable, avec un temps de demi-vie de moins de deux heures^[273], ce qui suggère qu'elle est dégradée par la voie du protéasome^[274-277]. Bien que plusieurs groupes aient tenté d'expliquer la régulation des niveaux protéiques de SOCS1, aucun mécanisme unanime n'a encore été décrit. Selon les travaux de Kamura et al., il semble que l'interaction de SOCS1 avec l'Elongin B/C stabilise ses niveaux protéiques^[278]. De ce fait, un mutant de SOCS1 auquel a été enlevé le SOCS box (SOCS1ΔBox) est rapidement dégradé. À l'inverse, Chen et al. ont démontré que la phosphorylation de SOCS1 par les kinases PIM1 et PIM2 déstabilise son interaction avec l'Elongin B/C, ce qui empêche sa dégradation^[276]. De la même manière, des mutations dans le SOCS Box qui perturbent l'interaction entre SOCS1 et l'Elongin B/C contribuent à augmenter sa stabilité^[276]. Il a également été démontré que l'interaction de SOCS1 avec la protéine à *RING finger* TRIM8 (en anglais, *tripartite motif containing 8*) favorise sa dégradation^[277]. Ainsi, la régulation des niveaux protéiques de SOCS1 est controversée et nécessite d'être davantage approfondie.

1.5.3.4 L'inhibition de SOCS1 par miR155

Dans les dernières années, il a été démontré que l'expression de SOCS1 peut également être régulée par des microARNs (miARNs). Plus précisément, Lu et al. ont montré, dans les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}), que l'augmentation de l'expression du miARN 155 (miR155) conduit à une diminution des niveaux protéiques de SOCS1^[279]. Dans ces cellules, l'expression de miR155 est activée par FOXP3 (en anglais, *Forkhead box P3*), un facteur de transcription de la famille des *forkhead/winged-helix* nécessaire à l'homéostasie des cellules T_{reg}. L'absence de miR155 dans les cellules T_{reg} conduit à une augmentation de l'expression de SOCS1, ce qui empêche l'activation de STAT5 en réponse à l'interleukine-2 (IL-2) et conduit à des problèmes d'autoimmunité. Ainsi, l'activation de

l'expression de miR155 par FOXP3 permet la régulation des niveaux protéiques de SOCS1 et, par le fait même, contribue à maintenir l'intégrité des cellules T_{reg}.

Bien que miR155 soit nécessaire à l'homéostasie des lymphocytes T_{reg}, il est également associé à la transformation maligne. En effet, son expression est augmentée dans plusieurs types de cancers humains. Récemment, Jiang et al. ont mis en évidence le pouvoir oncogénique de miR155 dans des cellules primaires provenant de tumeurs du sein ^[280]. Plus précisément, les auteurs montrent que miR155 effectue sa fonction oncogénique en ciblant et en inhibant l'expression de SOCS1. D'ailleurs, le rétablissement de l'expression de SOCS1 permet d'atténuer l'effet pro-tumoral de miR155. La surexpression de miR155 dans des cellules de cancer du sein entraîne l'activation constitutive de STAT3 et la stimulation de ces mêmes cellules avec l'interféron- γ (IFN γ) et l'interleukine-6 (IL-6), des cytokines proinflammatoires, conduit à une augmentation de l'expression de miR155. Ces résultats montrent que miR155 est associé à la fois à l'inflammation et au cancer et ils mettent en évidence la fonction anti-tumorale de SOCS1.

1.5.3.5 L'activité anti-tumorale de SOCS1

En plus de jouer un rôle central dans la régulation négative de la voie JAK/STAT, SOCS1 est également associée à la prévention du développement de certaines tumeurs. En effet, au cours des dernières années, plusieurs études ont permis de démontrer que SOCS1 agit comme un suppresseur de tumeur.

Comme il l'a déjà été mentionné, l'expression de *SOCS1* peut être inhibée suite à la méthylation d'îlots CpG présents dans son promoteur. Plus précisément, il a été démontré que l'expression de *SOCS1* est inhibée par méthylation dans différents types de tumeur. Par exemple, dans une analyse des cellules provenant de 26 carcinomes hépatocellulaires humains, Yoshikawa et al. ont montré une méthylation aberrante du gène *SOCS1* dans près de 65% des cas ^[271].

Des études génétiques ont également démontré que les souris *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* sont prédisposées au développement de leucémies lymphoïdes [281]. De plus, il a été observé que des fibroblastes *Socs1^{-/-}* en culture sont beaucoup plus susceptibles que les fibroblastes *Socs1^{+/+}* à la transformation par différents oncogènes, tels Tel-JAK2, Kit Δ 27 et 70Z/3-Cbl [233].

Dans une autre étude, il a été démontré que l'expression constitutive de SOCS1 inhibe complètement la prolifération des cellules BaF3-Tel.JAK2 et induit leur entrée en apoptose [233, 265]. Les cellules BaF3 sont des cellules hématopoïétiques de souris qui dépendent de l'interleukine-3 (IL-3) pour survivre. Cependant, leur transformation par l'oncogène Tel-JAK2 les libère de cette dépendance [282]. L'effet anti-prolifératif de SOCS1 sur les cellules BaF3-Tel-JAK2 se traduit également par l'inhibition de la phosphorylation de Tel-JAK2 au niveau de ses résidus tyrosine et par une diminution de ses niveaux protéiques [233]. De ce fait, plusieurs groupes ont démontré que SOCS1 induit la dégradation de Tel-JAK2 par un mécanisme qui dépend de son domaine SOCS box.

Il a également été démontré que l'expression constitutive de SOCS1 inhibe la prolifération de cellules pré-B transformées par v-Abl [233], une forme oncogénique de la protéine c-Abl, une tyrosine kinase. v-Abl résulte du remplacement du domaine SH3 de c-Abl par la protéine *gag* du virus de la leucémie murine d'Abelson [233]. v-Abl est constitutivement active et son interaction avec JAK1 engendre l'activation constitutive de la voie JAK/STAT [283]. Contrairement à ce qui est observé dans ces cellules, l'expression constitutive de SOCS1 dans les cellules BaF3 transformées par l'oncogène BCR-Abl n'inhibe que partiellement leur prolifération [233]. BCR-Abl est une protéine chimérique qui résulte de la translocation chromosomique (9;22)(q34;q11) [233]. Bien que cet oncogène entraîne l'activation constitutive des STATs, l'implication des JAKs dans ce processus n'a pas encore été démontrée [284], ce qui tend à expliquer l'inhibition partielle de la prolifération des cellules BaF3-BCR-Abl par SOCS1.

En terminant, il semble que SOCS1 soit impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire en réponse à des facteurs de croissance, tel le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, en anglais, pour *platelet-derived growth factor*) [233, 265]. En effet, des fibroblastes *SOCS1*^{-/-} maintenus dans un milieu contenant du sérum subissent une transformation spontanée. Aussi, ces mêmes fibroblastes sont en mesure de proliférer dans un milieu pauvre en sérum, alors que les fibroblastes sauvages correspondants en sont incapables. En accord avec ces résultats, il a été démontré que PDGF engendre l'activation des JAKs et que la phosphorylation subséquente de STAT3 est inhibée suite à la surexpression de SOCS1 [285].

Ces différentes études mettent en évidence la fonction anti-tumorale de SOCS1 et tendent à la considérer comme un suppresseur de tumeur.

1.5.3.6 SOCS1 et la signalisation par l'interféron- γ

La signalisation par l'interféron- γ (IFN γ) débute avec sa liaison aux récepteurs IFNGR1 et IFNGR2 (en anglais, *interferon gamma receptor 1* et *interferon gamma receptor 2*) [233]. Par la suite, la stimulation de JAK1 et JAK2 conduit à la phosphorylation de STAT1, lequel peut alors former un homodimère et migrer au noyau afin d'activer la transcription des gènes de réponse à l'IFN γ [233]. L'induction de ces gènes peut conduire à différentes réponses cellulaires, tels l'arrêt de la prolifération, l'activation de mécanismes anti-viraux, la différenciation et l'induction de l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II [286]. SOCS1 est fortement induite suite à une stimulation cellulaire par IFN γ [287]. De plus, sa surexpression inhibe à la fois l'activité de JAK1 et JAK2, ce qui, par le fait même, entraîne une complète inhibition de la signalisation par IFN γ [287-290]. Il y a quelques années, Madonna et al. ont démontré que SOCS1 peut également inhiber la signalisation par IFN γ en maintenant l'activation de ERK1/2 [291], lesquels sont en mesure de contrer l'effet pro-inflammatoire de IFN γ . Dans leur étude, les auteurs montrent que SOCS1 contribue à l'activation de ERK1/2 en interagissant avec p120

RasGAP, un inhibiteur de RAS, et en favorisant son ubiquitination et sa dégradation après une stimulation à l'IFN γ .

Les souris *Socs1*^{-/-} meurent environ deux à trois semaines après la naissance en raison d'une infiltration myélomonocytaire des organes viscéraux et d'une dégénération du foie [288, 292-294]. Il a été démontré que la mort périnatale de ces souris est due à une signalisation par l'IFN γ incontrôlée [233]. De ce fait, l'administration d'anticorps neutralisants anti-IFN γ retarde la mort prématurée des souris *Socs1*^{-/-} et leur croisement avec des souris *Ifn γ* ^{-/-} permet d'obtenir des souris viables [293, 294]. SOCS1 apparaît donc comme un régulateur essentiel de la signalisation par l'IFN γ .

1.5.3.7 La localisation nucléaire de SOCS1

Jusqu'à récemment, SOCS1, compte tenu de son rôle d'inhibiteur de la voie JAK/STAT, était considérée comme une protéine exclusivement cytoplasmique. Cependant, dans les dernières années, différentes études ont permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions de SOCS1, lesquelles impliquent que la protéine soit transloquée au noyau. À la lumière de ces résultats, Baetz et al. ont identifié un NLS dans SOCS1 [295], ce qui est venu renforcer l'idée que cette protéine est en mesure d'agir dans d'autres compartiments cellulaires que le cytoplasme.

Le NLS identifié par Baetz et al. est situé à la frontière des domaines SH2 et SOCS box, entre les acides aminés 159 et 172. Sa séquence correspond à RMLGAPLRQRR, laquelle concorde avec la séquence consensus du NLS bipartite classique R[MNQ]X,R[MNQ]RR. Dans leur étude, les auteurs montrent que le NLS de SOCS1 est nécessaire pour sa localisation nucléaire (des délétions et des mutations de différents acides aminés du NLS inhibent ou diminuent sa localisation nucléaire) et qu'il est suffisant pour induire une translocation nucléaire (la fusion du NLS de SOCS1 à la protéine CIS, laquelle est dépourvue de ce motif, entraîne son accumulation au noyau). Enfin, les auteurs montrent que la localisation nucléaire de SOCS1 est requise pour ses différentes fonctions.

En effet, lorsque son NLS est muté de façon à empêcher sa translocation au noyau, SOCS1 n'est plus en mesure d'inhiber la signalisation par l'interféron- α (IFN α), ni la signalisation par l'IFN γ . Ainsi, le NLS de SOCS1 et, donc, sa localisation nucléaire, sont essentiels au bon fonctionnement de la protéine.

1.5.4 ca-STAT5A, une forme oncogénique de la protéine STAT5A

Plusieurs cancers sont à l'origine de l'activation constitutive de la voie JAK/STAT et, dans plusieurs cas, cette activation continue est à l'origine de l'activation constitutive des STATs. Il y a une dizaine d'années, Onishi et al. ont identifié une forme constitutivement active de STAT5A (ca-STAT5A, en anglais, pour *constitutively activated-STAT5A*)^[296]. En fait, ca-STAT5A est mutée au niveau de deux résidus: l'histidine 299, laquelle est mutée en arginine (H299R), et la sérine 711, laquelle est mutée en phénylalanine (S711F). Ces deux mutations engendrent la phosphorylation constitutive de ca-STAT5A sur ses résidus tyrosine ce qui, par conséquent, entraîne sa localisation nucléaire et son activation transcriptionnelle continues^[296]. Les niveaux d'activation de ca-STAT5A sont comparables à ceux observés dans différents types de cancer humain, tels le cancer de la prostate^[297] et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^[298]. Ainsi, ca-STAT5A peut être considérée comme une forme oncogénique de STAT5A.

Comme il l'a été déjà mentionné dans ce chapitre, l'expression de ca-STAT5A dans des fibroblastes humains normaux provoque leur entrée en sénescence^[145, 299], au même titre que l'oncogène H-RAS V12^[186]. La sénescence induite par ca-STAT5A dépend de l'activation des voies de p53 et Rb^[299] et requiert l'activation de la voie du dommage à l'ADN^[145]. Ainsi, la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A est un modèle bien établi pour l'étude de ce mécanisme anti-tumoral.

1.6 Les objectifs de la thèse

La sénescence, comme l'apoptose, est un mécanisme anti-prolifératif qui permet à la cellule de se protéger contre la transformation maligne. Plus précisément, la sénescence engendre un arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase G1 et, par conséquent, bloque la prolifération de façon permanente. Dans les dernières années, plusieurs études ont démontré que l'activation d'oncogènes dans des cellules normales provoque leur entrée en sénescence. Plus particulièrement, nous avons démontré, dans notre laboratoire, que l'oncogène ca-STAT5A exprimé dans des fibroblastes humains normaux induit la sénescence. Comme nous l'avons mentionné plus tôt, la sénescence induite par ca-STAT5A dépend de l'activation des suppresseurs de tumeur p53 et Rb, de même que de l'activation de la voie du dommage à l'ADN.

La protéine p53 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation des différents mécanismes cellulaires anti-tumoraux. Son activation est cruciale pour l'établissement de la sénescence et, par conséquent, l'étude de sa régulation dans différents contextes est de mise. Dans notre laboratoire, une analyse sur micropuces d'ADN a été réalisée à partir de l'ARNm de cellules humaines normales exprimant ca-STAT5A afin d'identifier de nouveaux régulateurs de p53 dans le contexte de la sénescence induite par ca-STAT5A. Parmi les transcrits dont l'expression était la plus augmentée, celui correspondant à la protéine SOCS1 a retenu notre attention. SOCS1 est une cible transcriptionnelle des STATs et elle agit comme rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT. De plus, SOCS1 est en mesure de freiner l'activation aberrante de la signalisation par les cytokines induite par différents oncogènes et, par le fait même, elle est considérée comme un suppresseur de tumeur.

Les objectifs de cette thèse étaient de mettre en évidence un mécanisme de régulation de p53 et de la sénescence par SOCS1. Plus précisément, nous avons tenté de

démontrer l'importance de SOCS1 dans l'établissement de la sénescence induite par ca-STAT5A, de même que son implication dans l'activation de p53 et de la DDR.

Les deux prochains chapitres présentent, sous forme d'articles, les résultats de cette thèse. Chacun de ces articles est précédé d'une brève mise en contexte, de même que d'une description de la contribution de chaque auteur ayant collaboré à leur rédaction. Par la suite, l'importance et l'impact de ces résultats sont discutés au chapitre 4.

2 La protéine SOCS1 permet de relier la signalisation par les cytokines au suppresseur de tumeur p53 et à la sénescence

2.1 Présentation de l'article 1

Ce premier article avait pour but de démontrer l'importance de SOCS1 dans l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A, de même que son implication dans l'activation de p53 et de la DDR. Plus précisément, nous avons d'abord voulu vérifier quel était l'effet de l'inhibition de SOCS1 dans la sénescence induite par ca-STAT5A. Par la suite, nous avons voulu voir quel serait l'effet de l'expression de SOCS1 dans des fibroblastes humains normaux. Aussi, nous avons effectué une étude d'interaction entre SOCS1 et p53 afin de vérifier si une interaction entre les deux protéines pourrait être à la base d'un mécanisme de régulation de p53 par SOCS1. Enfin, nous avons voulu voir quel serait l'effet de l'inhibition de SOCS1 sur la régulation de la voie du dommage à l'ADN dans le contexte de la sénescence par ca-STAT5A. Globalement, l'objectif général de cet article était de démontrer la capacité de SOCS1 de relier l'activation aberrante de la voie JAK/STAT à l'activation de la voie de p53 afin de limiter le signal oncogénique.

Cet article a été publié dans le journal *Molecular Cell* en décembre 2009 (Calabrese, V. et al. (2009). SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol. Cell* 36, 754-67.)^[300]. Pour cet article, ma contribution est égale à celle de Frédéric-Antoine Mallette. Plus précisément, j'ai effectué toutes les expériences de co-immunoprécipitation, de GST pull-down, d'immunoprécipitation de la chromatine et de qPCR. J'ai également effectué la majorité des expériences réalisées avec le siRNA SOCS1. Frédéric-Antoine Mallette, lequel a initié le projet, a contribué aux expériences démontrant une induction de la sénescence par SOCS1. Xavier Deschênes-Simard a réalisé la majorité des essais luciférase de même que certaines immunofluorescences. Enfin, l'équipe du Dr. Ilangumaran, laquelle a fourni les cellules provenant de souris *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}*, a réalisée les essais de mort cellulaire.

2.2 Article 1

SOCS1 LINKS CYTOKINE SIGNALING TO P53 AND SENESENCE

Viviane Calabrese*¹, Frédérick A. Mallette*^{1,3}, Xavier Deschênes-Simard¹, Sheela Ramanathan², Julien Gagnon², Adrian Moores¹, Subburaj Ilangumaran² and Gerardo Ferbeyre¹

1) Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

2) Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

3) Present address: Terry Fox Molecular Oncology Group and the Bloomfield Center for Research on Aging, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital. Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Québec, Canada.

* These two authors contributed equally.

Running head : SOCS1 regulates p53

Keywords : SOCS1, p53, ATM, STAT5, senescence

Correspondence to :

[REDACTED]

2.2.1 Abstract

SOCS1 is lost in many human tumors but its tumor suppression activities are not well understood. We report that SOCS1 is required for transcriptional activity, DNA-binding and serine-15 phosphorylation of p53 in the context of STAT5 signaling. In agreement, inactivation of SOCS1 disabled p53-dependent senescence in response to oncogenic STAT5A and radiation-induced apoptosis in T cells. In addition, SOCS1 was sufficient to induce p53-dependent senescence in fibroblasts. The mechanism of activation of p53 by SOCS1 involved a direct interaction between the SH2 domain of SOCS1 and the N-terminal transactivation domain of p53, while the C-terminal domain of SOCS1 containing the SOCS Box mediated interaction with the DNA damage regulated kinases ATM/ATR. Also, SOCS1 colocalized with ATM at DNA damage foci induced by oncogenic STAT5A. Collectively, these results add another component to the p53 and DNA damage networks and reveal a mechanism by which SOCS1 functions as a tumor suppressor.

2.2.2 Introduction

The p53 tumor suppressor exerts antitumor activities by regulating cell autonomous processes such as DNA repair, apoptosis, cell cycle arrest and cellular senescence (Lowe et al., 2004). p53 also plays important roles in development, longevity and several tissue specific functions (Vousden and Prives, 2009). These activities of p53 are largely dependent on its ability to regulate the transcription of specific genes. In addition, p53 undergoes posttranslational modifications which cooperatively stabilize the protein and increase its transcriptional activity (Vousden and Prives, 2009). These modifications can be detected in normal cells that express oncogenic activities, suggesting that oncogenic stimuli activate signaling pathways that activate p53 via post-translational modifications. In cells expressing oncogenes, the DNA damage activated kinases ATM and ATR play an essential role in p53 activation, indicating that the DNA damage response links oncogenic activity to the tumor suppression functions of p53 (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007a). The mechanism of p53 activation by ATM and ATR is not completely understood. These kinases phosphorylate p53 at serine 15 (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998) with the help of adaptor proteins such as BRCA1 and 53BP1, which are also called mediators (Wang et al., 2002). Phosphorylation at this site is required for tumor suppression *in vivo* (Armata et al., 2007), but most probably this modification acts in the context of other posttranslational modifications.

The suppressor of cytokine signaling SOCS1 was originally identified as a protein that limits signaling from cytokine receptors (Starr et al., 1997). SOCS1 possesses an N-terminal proline rich domain, a central SH2 domain and a C-terminal SOCS Box that interacts with elongin B/C and cullin 2 (Kamura et al., 2004). SOCS1 serves as an adaptor to bring proteins involved in cytokine signaling to the elongin B/C-cullin E3 ligase complex for ubiquitination (Kamura et al., 1998; Zhang et al., 1999). Major targets of SOCS1 in the suppression of cytokine signaling are the JAK kinases (Endo et al., 1997).

SOCS1 is silenced by mutations, promoter methylation or miRNA overexpression in several human cancers suggesting that it acts as a tumor suppressor (Fukushima et al., 2003; Galm et al., 2003; Pichiorri et al., 2008; Sutherland et al., 2004; Weniger et al., 2006; Yoshikawa et al., 2001; Zardo et al., 2002).

We found SOCS1 as a gene highly expressed in cells undergoing senescence due to expression of constitutively active STAT5A (ca-STAT5A) at levels found in human tumors (Malette et al., 2007b). This allele of STAT5A is oncogenic in mice and recapitulates the constitutive activation of STAT5 seen in many human tumors (Kato et al., 2005). We report here that SOCS1 is required for p53 activity and the senescence response to ca-STAT5A. SOCS1 was also required in T cells for the control of apoptosis, cell proliferation and the expression of several p53 targets genes. Finally, we provide mechanistic data that shed light on the role of SOCS1 in p53 activation. Although SOCS1 has been found to form cytoplasmic E3 ligase complexes with elongin B/C and cullin 2, our results show that SOCS1 can also localizes to the nucleus at DNA damage foci and interacts with p53 and ATM. SOCS1 affects p53 phosphorylation at serine 15, DNA binding and transcriptional activity. These findings connect SOCS1 to p53 and have potential implications for human cancers.

2.2.3 Results

SOCS1 is required for p53 accumulation and senescence induced by ca-STAT5A

Constitutive expression of STAT5 is characteristic of many human tumors but in normal cells oncogenic STAT5A induces senescence (Malette et al., 2007a; Malette et al., 2007b). We used microarrays to profile the gene expression pattern of STAT5-induced senescence and found a high expression of several members of the suppressor of cytokine signaling family (SOCS). We confirmed the array results by qPCR (Figure 2.1A and Supplementary Figure 2.1) and Western blot (Figure 2.1B). We focus here on SOCS1,

which was the most highly expressed. In fact, the levels of SOCS1 in STAT5-senescent cells were four times higher than in cells treated with γ -interferon (Figure 2.1A).

Next, we asked whether inhibition of SOCS1 would affect STAT5-induced senescence using a siRNA against SOCS1, previously used to specifically deplete SOCS1 in dendritic cells (Shen et al., 2004). We found that reduction of SOCS1 expression by siRNA (Figure 2.1C and D) inhibited the number of flat cells that stained positive for the senescence marker SA- β -gal when combined with papillomavirus E7, which inactivates the Rb pathway (Figure 2.1E). Since senescence induced by ca-STAT5A can only be bypassed by inactivation of both the p53 and the Rb pathways (Mallette et al., 2007a; Mallette et al., 2007b), we concluded that SOCS1 is an important player in the senescence response to oncogenic JAK/STAT signaling acting on the p53 pathway. The remaining senescent cells after SOCS1 knockdown may be explained by partial knockdown of SOCS1 by RNAi or by compensatory functions of other proteins, perhaps other members of the SOCS family also induced by STAT5A (Supplementary Figure 2.1).

To investigate whether SOCS1 played a role in p53 accumulation during STAT5A-induced senescence, we used the siRNA against SOCS1. Transfection of this siRNA reduced p53 accumulation (Figure 2.1F) in cells expressing ca-STAT5A. To investigate the functional significance of SOCS1 inhibition for p53 activity we first profiled the p53 pathway during STAT5-induced senescence using a p53 pathway-microarray (Supplementary Table 2.1). Then we used qPCR to confirm the array results and evaluate the effects of SOCS1 inhibition. We found that STAT5A induced a unique and interesting pattern of p53 pathway genes, including *p53* itself, *RELA*, *DAPK1*, *PMP22*, *HDM2* and *GADD45 α* . Among these genes, *DAPK1*, *HDM2*, *GADD45 α* and *p53* are *bona fide* p53 target genes. SOCS1 was required for induction of all those genes (Figure 2.1G). Taken together, these data indicate that SOCS1 is linked to the activation of p53 during STAT5-induced senescence.

***Socs1* null mice have defects in the p53 signaling pathway**

The requirement of SOCS1 for activation of p53 during STAT5-induced senescence reveals a mechanism for the assigned tumor suppressor role of SOCS1 and suggested that an interaction between SOCS1 and p53 might underlie the regulation of other p53 functions. To investigate this issue, we used *socs1* null mice. Deletion of *socs1* is lethal in mice. However, concomitant ablation of *IFN γ* allows animals to survive adulthood. First, we analyzed the apoptotic response of T cells undergoing development and maturation within the thymus after irradiation, which is known to be mediated by p53 (Lowe et al., 1993). We exposed the total thymocyte preparation to the indicated doses of γ -radiation for 16 h followed by evaluation of apoptosis by flow cytometry using annexin V. The thymocytes were labelled with anti-CD4 and anti-CD8 antibody to evaluate the apoptotic response in the four distinct sequential maturation stages of T cells within the thymus: the CD4/CD8 double negative (DN) cells which become CD4/CD8 double positive (DP) cells that later differentiate into either CD4 single positive (SP) or CD8 SP cells (Zuniga-Pflucker, 2004). As reported earlier, *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* mice accumulate CD8 SP thymocytes compared to *Socs1^{+/+}Ifn γ ^{-/-}* and *Socs1^{+/+}Ifn γ ^{+/+}* control mice (Ilangumaran et al., 2003b; Ramanathan et al., 2006) (Figure 2.2A). We found a dramatic defect in the p53-dependent cell death response in *Socs1* null CD8 SP cells (Figure 2.2B), which constitutively express SOCS1 and selectively accumulate in the *Socs1* null thymus. This defect is specific to SOCS1 deficiency and is not compounded by IFN γ deficiency. SOCS1 deficiency did not affect the radiation sensitivity of CD4 SP cells, which neither express SOCS1 constitutively nor accumulate in SOCS1-deficient thymus (Ilangumaran et al., 2003b; Ramanathan et al., 2006). DN cells lacking SOCS1 showed resistance to radiation-induced apoptosis, however they did not accumulate in SOCS1-deficient thymi, possibly due to rapid transit through this developmental stage to become DP cells (Zuniga-Pflucker, 2004). Curiously, the p53-dependent apoptosis of DP cells (Lowe et al., 1993) was not affected by SOCS1 deficiency (Figure 2.2B), suggesting that other compensatory mechanisms may operate during the DP stage in mediating p53-dependent apoptosis.

Although the absence of IFN γ allows the survival of *Socs1* null mice these double knockout mice display defective homeostasis of T cells characterized by selective increase in the subpopulation of CD8⁺ cells (Cornish et al., 2003; Ilangumaran et al., 2003a). Therefore, we used CD8⁺ T cells from *Socs1*^{-/-}*Ifn γ* ^{-/-} double knockout mice to test other functions of the p53 pathway in a *Socs1* null background. Stimulation of purified CD8⁺ T cells by a combination of IL-15 and IL-21 showed increased proliferation of cells derived from *Socs1*^{-/-}*Ifn γ* ^{-/-} mice compared to those isolated from the control *Socs1*^{+/+}*Ifn γ* ^{-/-} or *Socs1*^{+/+}*Ifn γ* ^{+/+} mice (Figure 2.2C). Although an increased sensitivity to cytokines could explain the increased proliferation of *Socs1* null T cells (Gagnon et al., 2007; Ilangumaran et al., 2003a) we asked whether a defect in the expression of p53 target genes might also contribute to this increased proliferation. Since endogenous SOCS1 is expressed during STAT5A-induced senescence and is required for p53 activity, we speculated that p53 target genes upregulated during cytokine stimulation may also be relevant targets of SOCS1 and p53 in T cells. Among these targets, we found a significant decrease in the expression of *p53*, *MDM2*, *PMP22*, *BBC3 (PUMA)* and *GADD45 α* in CD8⁺ T cells from *Socs1* null mice (Figure 2.2D). Consistent with a defect in p53-target gene expression, lower levels of p53 or of phospho-p53^{Ser15} were found bound to the Mdm2 promoter in *Socs1* null T cells (Figure 2.2E). Not all p53 target genes were found reduced in *Socs1* null T cells. These cells have an increased JAK/STAT signaling that can activate some p53 targets independently of p53. For example, p21 can be induced by STAT1 (Chin et al., 1996) perhaps explaining why we do not find a defect in p21 expression in *Socs1* null T cells treated with IL-21 (data not shown), which activates STAT1 (Gagnon et al., 2008). Taken together, these results indicate that SOCS1 plays an active role in p53 functions *in vivo* and is important for the control of cell proliferation and p53-target gene expression in CD8⁺ T cells stimulated with cytokines.

SOCS1 induces a p53-dependent senescence program in human fibroblasts

We showed above that SOCS1 was required for p53 activity in the context of cytokine signaling. To investigate whether SOCS1 is sufficient to activate p53 and trigger p53-dependent responses, we first used as a model the osteosarcoma cell line U2OS, which express wild type p53. Transfection with SOCS1 but not with a control vector dramatically inhibited colony formation in these cells (Supplementary Figure 2.2A). On the other hand, transfection of SOCS1 in the p53 null cell line H1299 did not affect their proliferation (Supplementary Figure 2.2B). The antiproliferative effect of SOCS1 in U2OS cells was accompanied with an accumulation of p53 protein and its target p21 (Supplementary Figure 2.2C).

To study the effects of SOCS1 in normal cells we infected the human diploid fibroblasts strain IMR90 with a retroviral vector encoding SOCS1 or a control vector. Expression of SOCS1 inhibited cell growth (Figure 2.3A) and induced senescence, characterized by senescence associated β -galactosidase staining (Supplementary Figure 2.3A) and the accumulation of PML bodies (Supplementary Figure 2.3B). In addition, SOCS1 induced high levels of p53 and its target p21, a reduction in Rb phosphorylation and the inhibition of E2F target genes such as Mcm6 (Figure 2.3B). Intriguingly, during SOCS1-induced senescence the increase in p53 levels was accompanied with serine 15 phosphorylation of p53 (Figure 2.3B) and activation of the DNA damage regulated kinases ATM and Chk2 (Figure 2.3C). Staining of SOCS1 expressing cells with an antibody against γ H2AX revealed numerous DNA damage foci (Supplementary Figure 2.3C).

One of the key mechanisms by which SOCS1 functions as a tumor suppressor is by targeting oncoproteins to the ubiquitination machinery via the C-terminal SOCS Box (Ilangumaran and Rottapel, 2003). Therefore, we investigated the role of the SOCS Box on the effects of SOCS1 in normal human fibroblasts. As shown in Supplementary Figure 2.3A and Figure 2.3D, SOCS1 Δ Box was not able to induce p53, p53 phosphorylation at serine 15 or senescence in IMR90 fibroblasts. These results suggest that the SOCS Box is

essential for the activation of the DNA damage response, p53 and senescence by SOCS1 in normal cells.

To investigate whether activation of p53 was required for SOCS1-induced senescence, we used a cell line expressing a dominant negative allele of p53 (p53His175) that we used before to interfere with p53-dependent senescence (Mallette et al., 2004; Serrano et al., 1997). As shown in Figure 2.3E, the senescence response to SOCS1 was completely inhibited by the dominant negative allele of p53. Overall, these results indicate that SOCS1 can activate p53 both in tumor cells and normal cells and that the SOCS Box is required to induce the p53-dependent senescence process.

SOCS1 cooperates with p53 to transactivate p53 target promoters

To investigate the mechanisms of activation of p53 by SOCS1, we transfected SOCS1 or a control vector along with the p21-promoter-luciferase reporter and p53 into the p53 null cell line H1299. SOCS1 was not able to activate the p53 reporter alone, but it did increase the activity of added p53 to a similar extent as PML (Figure 2.4A), another regulator of p53 and senescence (Ferbeyre et al., 2000; Fogal et al., 2000). This result indicates that SOCS1 can potentiate the transcriptional activity of p53. To generalize these results we transfected SOCS1 with one of several p53 reporter promoters into U2OS cells that express endogenous wild type p53. We found that SOCS1 increased the ability of endogenous p53 to activate the transcription of reporters containing the p53 binding sites of *p21*, *MDM2*, *PTEN*, *NOXA* and *BAX* in cells treated with the DNA damaging drug doxorubicin (Figure 2.4B and Supplementary Figure 2.4A). In the absence of doxorubicin, SOCS1 did not stimulate the p21 promoter but it did stimulate endogenous p53 on the MDM2 promoter (Supplementary Figure 2.4B). SOCS1 Δ Box did not stimulate the ability of transfected p53 to induce p21 in H1299 cells (Figure 2.4A) and similar results were obtained when this mutant was transfected in U2OS cells treated with doxorubicin (not shown). Hence, the SOCS Box is required to stimulate p53 activity on the p21 promoter.

To further prove that SOCS1 stimulated the expression of p53 reporters via p53, we knocked down p53 expression in U2OS cells with a validated shRNA against p53 (Voorhoeve and Agami, 2003). This shRNA abrogated the stimulation of the p21 reporter by SOCS1 in U2OS cells treated with doxorubicin (Figure 2.4C). Interestingly, an shRNA against ATM (Mukhopadhyay et al., 2005) decreased significantly, but not completely, the p53 activity stimulated by SOCS1 on the p21 promoter (Figure 2.4C). Next we investigated how SOCS1 affected p53 binding on the p21 and the HDM2 promoters using chromatin immunoprecipitation in U2OS cells treated with doxorubicin or vehicle. SOCS1 increased the binding of endogenous p53 to the p21 promoter by a factor of 1.8 and to the HDM2 promoter by a factor of 8.4. In addition it stimulated the effect of DNA damage increasing p53 binding to the p21 promoter by a factor of 5.1 and to the HDM2 promoter by a factor of 1.5 (Figure 2.4D). Collectively, these results suggest that SOCS1 stimulates p53 target gene expression by stimulating p53 DNA binding. To confirm this model we used a fusion of the GAL4 DNA binding domain with the transcriptional activation domain of p53 that binds DNA via GAL4. As expected, SOCS1 did not stimulate the activity of GAL4-p53 on a reporter promoter containing GAL4 binding sites (Figure 2.4E).

SOCS1 interacts with p53

To investigate whether SOCS1 could bind p53, we cotransfected Myc-tagged SOCS1 and p53 in the p53 null cell line H1299. We found Myc-SOCS1 in the immunoprecipitate of a p53 specific antibody but not in the immunoprecipitate of an anti-cyclin A antibody (Supplementary Figure 2.5A). Next we repeated the experiments in U2OS cells that express endogenous p53. We transfected these cells with a Flag-tagged SOCS1 or a Flag-tagged SOCS1 Δ Box and treated them with doxorubicin to increase the expression of p53. We found both SOCS1 and SOCS1 Δ Box in p53 immunoprecipitates (Figure 2.5A) suggesting that the interaction between SOCS1 and p53 involves the N-terminal proline rich domain or the SH2 domain of SOCS1 and not the SOCS Box as reported for VHL, another SOCS Box protein interacting with p53 (Roe et al., 2006). This interaction between SOCS1 and endogenous p53 was also revealed in cells that were not

treated with doxorubicin (Supplementary Figure 2.5B) indicative of some level of interaction in the absence of strong external stimuli.

To clarify if the SOCS1-p53 complex found *in vivo* is the result of direct interaction, we performed GST-pull down assays using GST-p53 fusion proteins (Figure 2.5B) and *in vitro* transcribed/translated SOCS1. SOCS1 interacted with full-length p53 and a fragment containing the N-terminal region of p53 (amino acids 1-160) (Figure 2.5C, top panel). Next, we determined that the interaction region between p53 and SOCS1 involves the first 80 amino acids of p53 (Figure 2.5C, bottom panel), known to contain the transcriptional activation domains (Laptenko and Prives, 2006). In fact, a construct containing only the two transactivation domains of p53, GST-p53(1-67) was sufficient to bind the SH2 domain of SOCS1 (Figure 2.5D and E). This interaction must be phospho-tyrosine-independent because there are not tyrosines in the p53 fragment p53-1-67. Consistent with this explanation, a mutant of the phospho-tyrosine-binding pocket of SOCS1 (SOCS1R105E) unable to inhibit Jak functions was able to interact with p53, induce senescence in fibroblasts and reduce colony formation in U2OS cells (Supplementary Figure 2.6).

Finally, to test whether the interaction of p53 and SOCS1 could be shown with both endogenous proteins we used again the model of STAT5A-induced senescence in normal human fibroblasts. In these cells, the immunoprecipitation of endogenous SOCS1 pulled down endogenous p53 (Figure 2.5F). Taken together, these biochemical studies suggest that SOCS1 is engaged in direct protein-protein interaction with the N-terminal transactivation domain region of p53.

SOCS1 interacts with the DNA damage responsive kinases ATM and ATR

The stimulation of p53 reporters by SOCS1 was partially inhibited by knocking down ATM (Figure 2.4C). This suggested that SOCS1, like VHL (Roe et al., 2006) or BRCA1 (Fabbro et al., 2004), might facilitate the interactions between p53 and ATM. To examine if this was indeed the case we probed the immunoprecipitates of endogenous ATM or its homologue kinase ATR by Western blot using an anti-SOCS1 antibody. We found

SOCS1, but not SOCS1 Δ Box, in both ATM and ATR immunoprecipitates from U2OS cells treated with doxorubicin (Figure 2.6A, top panel). This interaction between SOCS1 and ATM was independent of p53, because it was also observed in the p53 null cell line H1299 (Figure 2.6A, bottom panel). Hence, SOCS1 interacts with p53 via its N-terminus and with ATR/ATM through the SOCS Box. Finally, we immunoprecipitated ATM phosphorylated at serine 1981 with a specific antibody in U2OS cells, taking advantage of a constitutively activated DNA damage response in these cells. Again we found SOCS1 in the immunoprecipitates (Supplementary Figure 2.7).

To determine whether the interaction between SOCS1 and ATM occurred *in vitro* as a result of direct protein-protein interactions we performed GST-pull down assays using GST-ATM fragments purified from *E. coli* and *in vitro* transcribed/translated SOCS1. We found that SOCS1 interacted more strongly with the FAT domain of ATM, a region that is also present in the PIK-related kinases ATR and DNA-PK (Bosotti et al., 2000) (Figure 2.6B). Two additional fragments of ATM interacted with purified SOCS1, including the fragment that contains the kinase domain. None of these interacting regions overlap with the region of ATM that binds p53, which was mapped to the N-terminus of ATM (Khanna et al., 1998). Overall, our functional analysis of SOCS1 and our protein-protein interaction data suggest that SOCS1 could facilitate the phosphorylation of p53 at serine 15 by PIK-related kinases (Figure 2.3B). To test this model we evaluated the ATM/ATR-dependent phosphorylation of p53 at serine 15 in human fibroblasts expressing ca-STAT5A and transfected with the siRNA against SOCS1 or a siRNA control. Consistent with the ability of this siRNA to inhibit p53 activity in STAT5A-expressing cells (Figure 2.1F), we also observed a reduction in the levels of p53 phosphorylation at serine 15 in cells treated with the anti-SOCS1 siRNA in comparison with the siRNA control (Figure 2.6C). Taken together, our results are consistent with a model proposing that SOCS1 can form two different complexes, one as an E3 ligase with elongin B/C and another acting as an adaptor for phosphorylation of p53 by ATR/ATM (Figure 2.6E).

SOCS1 can localize to the nuclear compartment and can be found at DNA damage foci induced by oncogenic STAT5

Most of the known SOCS1 targets in cytokine signaling are cytoplasmic. However, some studies have indicated that a fraction of SOCS1 is nuclear when it is overexpressed (Ben-Zvi et al., 2006). We confirmed the nuclear localization of SOCS1 in U2OS cells by indirect immunofluorescence of cells transfected with a Flag-tagged SOCS1 (Figure 2.7A) or by direct immunofluorescence using a GFP-SOCS1 fusion protein (Figure 2.7B).

Interestingly, immunolocalization of endogenous SOCS1 in cells expressing ca-STAT5A revealed a pattern of foci that colocalized with foci stained by an antibody recognizing phosphorylated ATM and were largely reduced by a siRNA against SOCS1 (Figure 2.7C and D). These oncogene-induced DNA damage foci are part of a DNA damage response necessary to mediate oncogene-induced senescence (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007a). Hence the localization of SOCS1 at these foci further strength the proposition that SOCS1 plays a role as a mediator of the DNA damage response.

2.2.4 Discussion

The numerous functions of p53 (Vousden and Prives, 2009) imply the existence of multiple cellular regulators of this protein. Here, we report a link between SOCS1 and the p53 pathway relevant for three important physiological processes. First, SOCS1 connects aberrant STAT5 signaling to p53 facilitating the process of cellular senescence, which is an important tumor suppressor mechanism *in vivo* (Braig et al., 2005). Interestingly, SOCS1 can be induced by many cytokines, which play an important role in maintaining the senescent cell cycle arrest (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Second, SOCS1 was required in T cells for radiation-induced apoptosis, a p53 dependent process (Lowe et al., 1993). Finally, we also showed that SOCS1 was required to control T cell proliferation in response to cytokines, in part because it controls the expression of several p53 target genes.

Structural-functional analysis of SOCS1 points to a novel adaptor function of SOCS1 in the DNA damage response. The SH2 domain of SOCS1 binds the N-terminus of p53 containing the transcriptional activation domains while the SOCS Box mediates binding to ATM and ATR. In this way SOCS1 can facilitate the interaction between the ATM/ATR kinases and p53 (Figure 2.6E). In agreement, SOCS1 colocalizes with ATM at DNA damage foci. Also, inhibition of SOCS1 expression by RNAi decreased p53^{S15}-phosphorylation and the expression of several p53 target genes during STAT5-induced senescence. In addition, a mutant of SOCS1 without the SOCS Box, and therefore unable to bind ATM/ATR, was not able to induce senescence or p53^{S15}-phosphorylation. Hence, we propose that SOCS1 can link the DNA damage signals characteristic of oncogene-expressing cells to p53, serving as a mediator for p53 phosphorylation by ATM and ATR (Figure 2.6E). p53^{S15}-phosphorylation has been previously linked to oncogene-induced senescence (Ferbeyre et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000). This modification affects the conformation of the p53 N-terminus (Kar et al., 2002), facilitating binding to coactivators and increasing the transactivation potential of p53 (Lambert et al., 1998). It is also plausible that SOCS1 can shape the pattern of ATM/ATR targets phosphorylated after DNA damage and influence the p53 response to the extent that other components of the p53 pathway can be recruited to ATM/ATR by SOCS1.

The decrease in expression of p53 targets in *Socs1/Ifn γ* null animals may have implications for diseases characterized by hyperproliferation of T cells such as autoimmunity and lymphomas. In particular, SOCS1 was required for the expression of *Gadd45 α* and *Gadd45 α* null mice display signs of hyperproliferation of T cells and autoimmune disease (Salvador et al., 2002; Salvador et al., 2005). Also, *Bbc3/Puma*, a proapoptotic p53 target decreased in *Socs1* null T cells, is known to control T cell survival (Bauer et al., 2006). Consistent with our data, it has been reported that the p53 pathway plays a role in controlling the proliferation of CD8⁺ T cells (Zhou et al., 1999). The impact of these defects in the expression of p53 target genes for T cells is not only a

hyperproliferative response to cytokines but also a higher susceptibility to accumulate genetic alterations that may lead to transformation.

2.2.5 Concluding remarks

SOCS1 has been considered almost exclusively as a gene that blocks cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. The results presented here add another aspect of SOCS1 function, namely its ability to interact with ATM/ATR and modulate the p53 pathway. In this way, SOCS1 can block an excessive cytokine response not only by blocking cytokine signaling in the cytoplasm but also by activating p53 in the nucleus preventing the proliferation of pro-inflammatory cells. Other negative regulators of cytokine signaling may share this paradigm. For example, in STAT5-senescence we found multiple members of the SOCS family highly upregulated. Also, the E3-Sumo ligase PIASy regulates p53-dependent apoptosis and senescence (Bischof et al., 2006). These p53-activating activities can engage antiproliferative and anti-inflammatory programs in cells exposed to aberrant cytokine stimulation.

2.2.6 Materials and Methods

Cells and tissue culture

U2OS, H1299 and IMR90 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO). Retroviral-mediated gene transfer, BrdU incorporation, cell cycle analysis, senescence assays, and fluorescence microscopy were done as described previously (Ferbeyre et al. 2000).

Mice

Socs1^{+/-}Ifn γ ^{-/-} mice (Marine et al., 1999) (generous gifts from Dr. J. Ihle) have been backcrossed onto the C57BL/6 background for more than ten generations in our animal facility. *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* mice were generated by crossing *Socs1^{+/-}Ifn γ ^{-/-}* parents. The *Socs1^{+/+}Ifn γ ^{-/-}* and C57BL/6 (*Socs1^{+/+}Ifn γ ^{+/+}*) control mice were purchased from the Jackson Laboratory. All experiments using mice have been carried out with strict adherence to institutional guidelines.

T cells apoptosis

Single cell suspensions of thymocytes from C57BL/6, *Ifn γ ^{-/-}* and *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* mice were exposed to different doses of γ radiation as described (Clarke et al., 1993). Irradiated cells were incubated in RPMI-1640 culture medium containing 10% FCS at 37°C for 16 h. The cells were stained with anti-mCD4-FITC and anti-mCD8-biotin (BD Biosciences) followed by streptavidin SPRD (Southern Biotechnologies) for 10 min each. After the final wash, the cells were stained with annexin-PE (BioLegend) following the manufacturer's instructions. The flow cytometry data were acquired using the FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software.

In vitro transcription/translation

Flag-mSOCS1, Flag-mSOCS1 Δ Box and Flag-mSH2-SOCS1 were transcribed and translated *in vitro* using the TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Co-Immunoprecipitations

H1299 and U2OS were transfected with 20 μ g of DNA using calcium phosphate precipitation method. 24h post-transfection, U2OS were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. To prepare cell lysates, cells were washed twice with PBS and collected by scrapping in cold Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate, protease inhibitor cocktail [Roche]) after 5 min of incubation on ice. Immunoprecipitations were performed with 1 or 2 mg of total cell proteins overnight at 4°C with a suitable antibody. The antibodies used for immunoprecipitation were as follows: anti-p53 (9282, 1:200, Cell Signaling), anti-SOCS1 (4H1, 1:200, MBL), anti-ATM (c-20, 1:200, Santa Cruz), anti-ATR (N-19, 1:200, Santa Cruz), anti-pATM^{S1981}, (4526, 1:200, Cell Signaling), anti-Cyclin A (C-19, 1:200, Santa Cruz), anti-Caveolin (BD, 1:200, Santa Cruz) and anti-E4BP4 (V-19, 1:200, Santa Cruz). Immunoprecipitates were recovered by 1h of incubation at 4°C with protein A/G Sepharose beads (Amersham). Precipitates were washed three times with Cell Lysis Buffer, one time with PBS and one time with H₂O. Precipitates were eluted in 30 μ L of SDS Sample Buffer, 30 μ L of H₂O and 10 μ L of Bromophenol Blue and boiled for 5 min. Half of elutions (35 μ L) were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). For whole cell lysates, 50-75 μ g were loaded.

siRNA Transfections

24h before transfection, 1 x 10⁴ IMR-90 cells stably expressing pBabe or pBabe ca-STAT5A were plated in 6 wells plates. 300 pmol of siRNA against SOCS1 (siSOCS1) or siRNA against GFP (siGFP) (Supplementary methods) were transfected with Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

2.2.7 Acknowledgements

We thank L. DesGroseillers, J. Ihle, S. W. Lowe, S. Meloche, G. Rechavi, W. Tansey and I. Touw for reagents. We thank S. Roy and members of the Ferbeyre lab for critical comments. This work was funded by a grant from the Canadian Institute of Health and Research (CIHR MOP82887) to GF and CIHR MOP-84234 to SI. GF and FAM are supported by “Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)” and VC by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.2.8 References

- Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., *et al.* (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* *133*, 1006-1018.
- Armata, H.L., Garlick, D.S., and Sluss, H.K. (2007). The ataxia telangiectasia-mutated target site Ser18 is required for p53-mediated tumor suppression. *Cancer Res* *67*, 11696-11703.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* *281*, 1674-1677.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633-637.
- Bauer, A., Villunger, A., Labi, V., Fischer, S.F., Strasser, A., Wagner, H., Schmid, R.M., and Hacker, G. (2006). The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10979-10984.
- Ben-Zvi, T., Yayon, A., Gertler, A., and Monsonego-Ornan, E. (2006). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 interact with and modulate fibroblast growth factor receptor signaling. *J Cell Sci* *119*, 380-387.
- Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R., and Dejean, A. (2006). The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol Cell* *22*, 783-794.
- Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci* *25*, 225-227.

- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.
- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wyllie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-852.
- Cornish, A.L., Davey, G.M., Metcalf, D., Purton, J.F., Corbin, J.E., Greenhalgh, C.J., Darwiche, R., Wu, L., Nicola, N.A., Godfrey, D.I., *et al.* (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 has IFN-gamma-independent actions in T cell homeostasis. *J Immunol* 170, 878-886.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., *et al.* (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924.
- Fabbro, M., Savage, K., Hobson, K., Deans, A.J., Powell, S.N., McArthur, G.A., and Khanna, K.K. (2004). BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* 279, 31251-31258.

- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3497-3508.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-2027.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19, 6185-6195.
- Fukushima, N., Sato, N., Sahin, F., Su, G.H., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2003). Aberrant methylation of suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) gene in pancreatic ductal neoplasms. *Br J Cancer* 89, 338-343.
- Gagnon, J., Ramanathan, S., Leblanc, C., Cloutier, A., McDonald, P.P., and Ilangumaran, S. (2008). IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8(+) T lymphocytes. *J Immunol* 180, 7958-7968.
- Gagnon, J., Ramanathan, S., Leblanc, C., and Ilangumaran, S. (2007). Regulation of IL-21 signaling by suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in CD8(+) T lymphocytes. *Cell Signal* 19, 806-816.
- Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R., and Herman, J.G. (2003). SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 101, 2784-2788.
- Ilangumaran, S., Ramanathan, S., La Rose, J., Poussier, P., and Rottapel, R. (2003a). Suppressor of cytokine signaling 1 regulates IL-15 receptor signaling in CD8+CD44^{high} memory T lymphocytes. *J Immunol* 171, 2435-2445.
- Ilangumaran, S., Ramanathan, S., Ning, T., La Rose, J., Reinhart, B., Poussier, P., and Rottapel, R. (2003b). Suppressor of cytokine signaling 1 attenuates IL-15 receptor signaling in CD8⁺ thymocytes. *Blood* 102, 4115-4122.

- Ilangumaran, S., and Rottapel, R. (2003). Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1. *Immunol Rev* 192, 196-211.
- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Nakayama, K.I. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18, 3055-3065.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Jr., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12, 3872-3881.
- Kar, S., Sakaguchi, K., Shimohigashi, Y., Samaddar, S., Banerjee, R., Basu, G., Swaminathan, V., Kundu, T.K., and Roy, S. (2002). Effect of phosphorylation on the structure and fold of transactivation domain of p53. *J Biol Chem* 277, 15579-15585.
- Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., and Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med* 202, 169-179.
- Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., and Lavin, M.F. (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* 20, 398-400.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133, 1019-1031.
- Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhattar, R., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J. Biol. Chem.* 273, 33048-33053.
- Laptenko, O., and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13, 951-961.

- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.
- Mallete, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007a). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-48.
- Mallete, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., Huot, G., and Ferbeyre, G. (2007b). Myc Down-regulation as a Mechanism to Activate the Rb Pathway in STAT5A-induced Senescence. *J Biol Chem* 282, 34938-34944.
- Mallete, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., and Ferbeyre, G. (2004). Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91-99.
- Marine, J.C., Topham, D.J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A., and Ihle, J.N. (1999). SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98, 609-616.
- Mukhopadhyay, U.K., Senderowicz, A.M., and Ferbeyre, G. (2005). RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res* 65, 2872-2881.
- Pichiorri, F., Suh, S.S., Ladetto, M., Kuehl, M., Palumbo, T., Drandi, D., Taccioli, C., Zanesi, N., Alder, H., Hagan, J.P., *et al.* (2008). MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12885-12890.
- Ramanathan, S., Gagnon, J., Leblanc, C., Rottapel, R., and Ilangumaran, S. (2006). Suppressor of cytokine signaling 1 stringently regulates distinct functions of IL-7 and IL-15 in vivo during T lymphocyte development and homeostasis. *J Immunol* 176, 4029-4041.
- Roe, J.S., Kim, H., Lee, S.M., Kim, S.T., Cho, E.J., and Youn, H.D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* 22, 395-405.

- Salvador, J.M., Hollander, M.C., Nguyen, A.T., Kopp, J.B., Barisoni, L., Moore, J.K., Ashwell, J.D., and Fornace, A.J., Jr. (2002). Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity* 16, 499-508.
- Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., Jr., and Ashwell, J.D. (2005). The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol* 6, 396-402.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R., and Chen, S.Y. (2004). Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol* 22, 1546-1553.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Hilton, D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.
- Sutherland, K.D., Lindeman, G.J., Choong, D.Y., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I.G., and Visvader, J.E. (2004). Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* 23, 7726-7733.
- Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 4, 311-319.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435-1438.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F., and Moller, P. (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25, 2679-2684.

- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C., and Herman, J.G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28, 29-35.
- Zardo, G., Tiirikainen, M.I., Hong, C., Misra, A., Feuerstein, B.G., Volik, S., Collins, C.C., Lamborn, K.R., Bollen, A., Pinkel, D., *et al.* (2002). Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet* 32, 453-458.
- Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., *et al.* (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2071-2076.
- Zhou, X., Wong, S., Walter, J., Jacks, T., and Eisen, H.N. (1999). Increased generation of CD8+ T cell clones in p53 mutant mice. *J Immunol* 162, 3957-3960.
- Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 4, 67-72.

2.2.9 Legends

Figure 2.1 SOCS1 in STAT5-induced senescence. **A)** qPCR for SOCS1 of IMR90 cells with a vector control or ca-STAT5A or the same cells treated with γ -interferon (100 ng/mL for one hour) or vehicle. **B)** Immunoblot for SOCS1 using cell lysates from STAT5A-senescent IMR90 cells (5A) or control cells with empty vector (V). **C)** SOCS1 mRNA levels measured by qPCR in cells expressing ca-STAT5A transfected with a siRNA control or a siRNA against SOCS1. **D)** SOCS1 protein levels in cells as in (C). **E)** SA- β -gal staining of IMR90 cells expressing E7 and infected with a control vector or its derivative expressing ca-STAT5A. After selection cells were transfected with a siRNA control or an anti-SOCS1 siRNA. The average and standard deviation of the quantitation of SA- β -gal positive cells is shown at the bottom right of each panel. **F)** p53 immunofluorescence of IMR90 cells expressing an empty control vector or ca-STAT5A and transfected with a siRNA control or a siRNA against SOCS1. **G)** qPCR of *p53* pathway genes in cells expressing a control vector or ca-STAT5A and then treated with a siRNA control or against SOCS1.

Figure 2.2 *Socs1* null mice have defects in p53 pathways. **A)** The four different developmental stages of thymocytes are indicated within rectangles, and the proportion of cells within these gates is indicated in parenthesis. **B)** Single cell thymocyte suspensions were exposed to the indicated doses of gamma radiation. After incubation at 37°C for 16 hours, the cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and annexin V-PE. The percent of cells stained positive for Annexin V within the gated thymocyte subsets are indicated as a function of the dose of radiation. The data shown are representative of 4 different experiments and the flow cytometer charts are available as Supplementary Figure 8. The flow cytometry profile of irradiated thymocytes from C57BL/6 controls was similar to that of *Ifn γ ^{-/-}* control (data not shown). **C)** Cell proliferation of T cells, as measured by ³[H]-thymidine incorporation, from *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* mice, control *Ifn γ* null mice or wild-type BL6

mice treated with IL-21, IL15 or both cytokines. **D)** qPCR of p53 pathway genes from CD8⁺ lymphocytes T from *Socs1/Ifn γ* null mice, control *Ifn γ* null mice or wild-type BL6 mice after stimulation with IL15 and IL-21. **E)** Chromatin immunoprecipitation of p53 and phospho-p53^{Ser15} on the Mdm2 promoter in T cells from *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* mice, control *Ifn γ* null mice or wild-type BL6 mice after stimulation with IL-15 and IL-21.

Figure 2.3 SOCS1 induces cellular senescence. **A)** Growth curves of IMR90 cells infected with an empty control vector, RasV12, ca-STAT5A or SOCS1. **B)** Immunoblots of cell cycle regulators in IMR90 cells expressing an empty control vector (V) or SOCS1 (S1). **C)** As in (B) but using antibodies for markers of the DNA damage response. **D)** Immunoblots of p53 and phospho-p53^{S15} in IMR90 cells infected with an empty control vector (V), SOCS1 (S1) or SOCS1 Δ Box (S1 Δ Box). **E)** SA- β -gal staining of IMR90 cells expressing an empty control vector or dominant negative p53 (dnp53) and then infected with an empty control vector or SOCS1.

Figure 2.4 SOCS1 stimulates the transcriptional activity of p53. **A)** Luciferase assay in H1299 cells transiently transfected with the p21 promoter luciferase plasmid, an empty control vector or p53 and an empty control vector (V), SOCS1 (S1), SOCS1 Δ Box (S1 Δ Box) or PML. **B)** Luciferase assay in U2OS cells transiently transfected with the p21 or MDM2 promoter luciferase reporter and an empty control vector or SOCS1. The cells were treated for 24h with doxorubicin (300 ng/mL) 24h post-transfection. **C)** Luciferase assay in U2OS cells transiently transfected with the p21 promoter luciferase plasmid and an empty control vector, SOCS1 or SOCS1 with shRNA against ATM (shATM), p53 (shp53) or GFP (shGFP). The cells were treated for 24h with doxorubicin (300 ng/mL) 24h post-transfection. The data represents the mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase of luciferase activity (paired *t* test: *, *p* < 0,01; **, *p* < 0,001) compared to control cells. **D)** Chromatin immunoprecipitation of p53 on the p21 and HDM2 promoters in U2OS cells transfected with SOCS1 or control plasmid and treated with doxorubicin (300 ng/mL) or vehicle. **E)** Luciferase assay in

H1299 cells transiently transfected with the Gal4 promoter plasmid, a Gal4-p53 fusion and either an empty control vector (V) or SOCS1 (S1).

Figure 2.5 SOCS1 directly interacts with p53. **A)** U2OS were transiently transfected with an empty control vector (V), SOCS1 (S1) or SOCS1 Δ Box (S1 Δ Box). 24h after transfection cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24 h. Lysates were immunoprecipitated with anti-p53 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody. Immunoprecipitation against caveolin (CAV1) was used as a negative control. **B)** Schematic representation of the GST-p53 fusion proteins used in C. Numbers indicate the p53 amino acids starting and ending every fragment. **C)** Autoradiography of 35 [S]-Flag-SOCS1 pull down with GST-hp53 full length (FL) or fragments bound to glutathione Sepharose-4B. Input is 50% of the amount of protein used for immunoprecipitation. Numbers 1-6 corresponds to constructs in B. **D)** Schematic representation of SOCS1 and its domain structure. **E)** GST-pull down assays as in C, numbers 1, 7 and 5 corresponds to constructs in B. **F)** STAT5A-senescent IMR90 cell lysates were immunoprecipitated with anti-SOCS1 antibody and immunoblotted with anti-p53 antibody four days post-infection. Immunoprecipitation against E4BP4 was used as a negative control.

Figure 2.6 SOCS1 interacts with ATM and ATR. **A)** SOCS1 immunoblots of ATM or ATR immunoprecipitates from U2OS or H1299 cells transfected with a control vector (V), SOCS1 (S1) or SOCS1 Δ Box (S1 Δ Box). Cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) 24 h after transfection. * denotes a non-specific band. **B)** Equal amounts of each GST-ATM fragment (top panel) were estimated from Coomassie blue staining (middle panel), bound to glutathione Sepharose-4B and incubated with 35 [S]-Flag-SOCS1. After washing and SDS PAGE, 35 [S]-Flag-SOCS1 was detected by autoradiography (bottom panel). Numbers 1-12 corresponds to GST-ATM fragments indicated at the top of the panel. **C)** Phospho-p53^{Ser15} and total p53 immunoblots of p53 immunoprecipitates from extracts of IMR90 cells expressing an empty control vector or ca-STAT5A and transiently transfected with a siRNA control or a siRNA against SOCS1. The percent of phospho-p53^{S15} is indicated. **D)**

SOCS1 immunoblot from total lysates of the experiment shown in C. **E)** SOCS1 forms part of two protein complexes. **Top:** SOCS1 regulates cytokine signaling as part of an E3 ligase complex with elongin B/C and cullin 2. **Bottom:** SOCS1 serves as a mediator of the DNA damage response by binding to ATM and p53 enhancing the phosphorylation of p53 at serine 15.

Figure 2.7 Cellular localization of SOCS1. **A)** Indirect Flag immunofluorescence of U2OS transiently transfected with GFP as a transfection control and an empty control vector or FLAG-SOCS1. **B)** Direct GFP fluorescence of U2OS cells transiently transfected with GFP-SOCS1. All cells (100%) transfected with the SOCS1 constructs in A and B were positive for SOCS1 in the nucleus. **C)** Confocal immunofluorescence of IMR90 fibroblasts expressing a vector control or its derivative expressing ca-STAT5A and transfected with siRNA control or against SOCS1. Cells were fixed four days after selection and stained with the antibodies recognizing SOCS1 and phospho-ATM^{S1981}. **D)** Quantitation of the percentage of cells having SOCS1/phospho-ATM^{S1981} foci. Asterisks represent a significant change in the number of SOCS1/phospho-ATM^{S1981} foci according to the paired *t* test: *, *p* < 0,001.

2.2.10 Figures

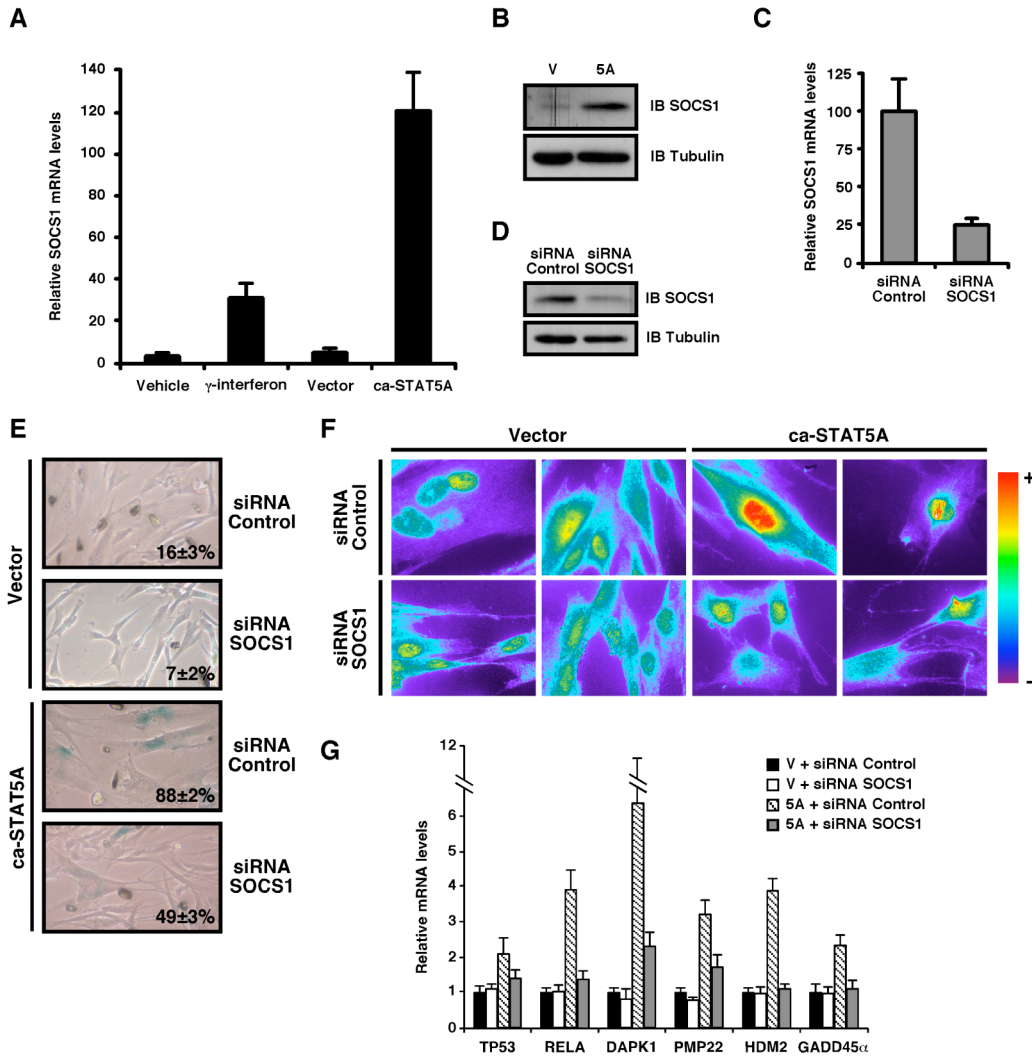


Figure 2.1 SOCS1 in STAT5-induced senescence.

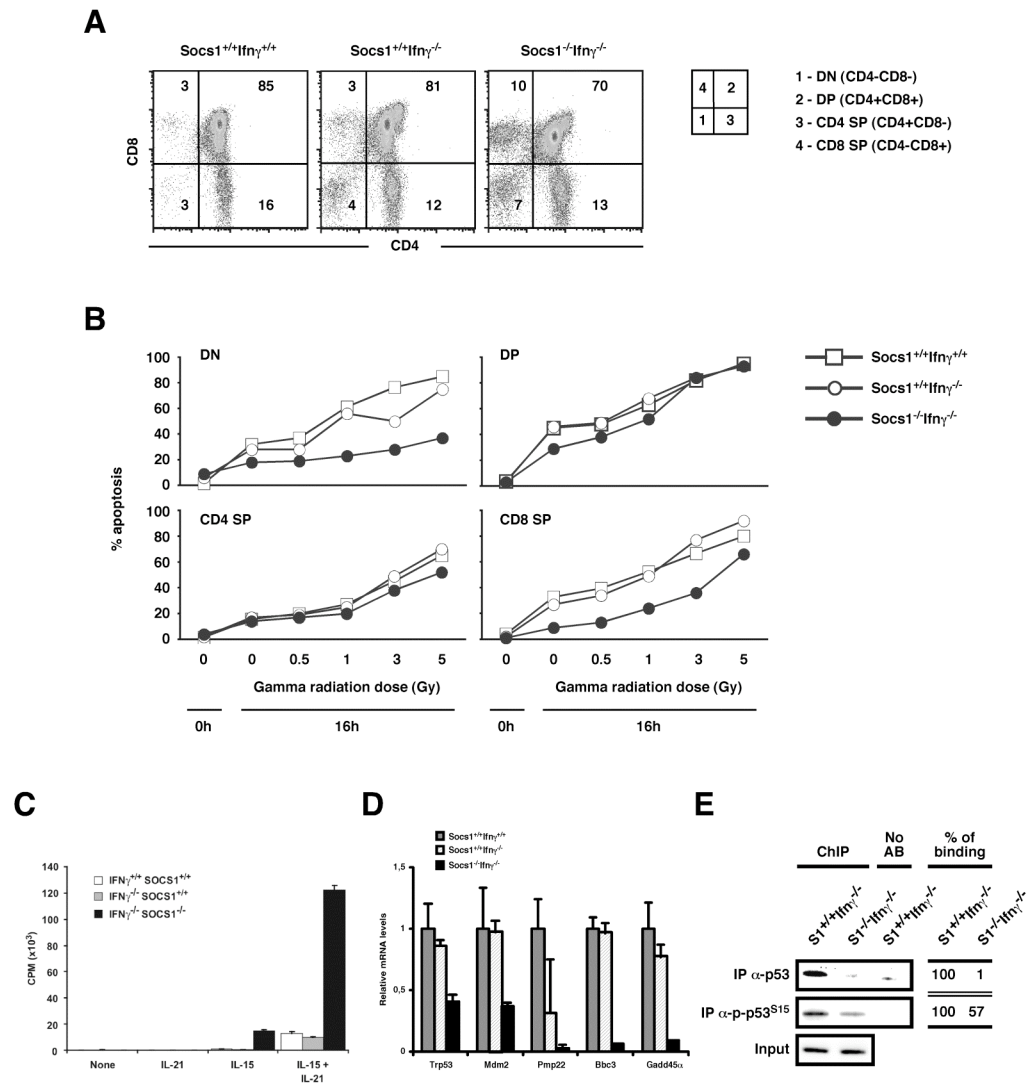


Figure 2.2 *Socs1* null mice have defects in p53 pathways.

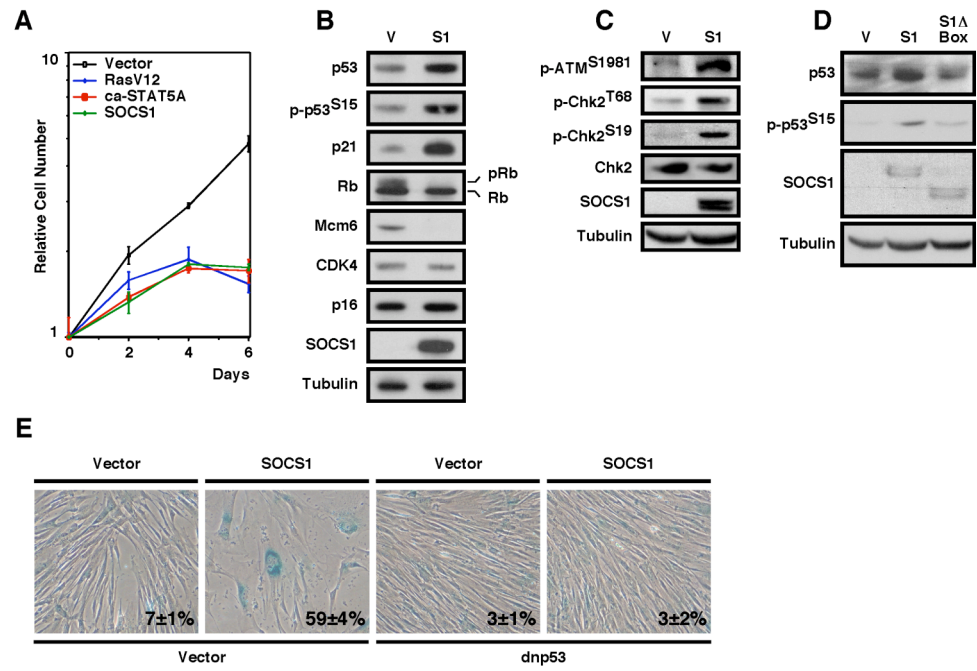


Figure 2.3 SOCS1 induces cellular senescence.

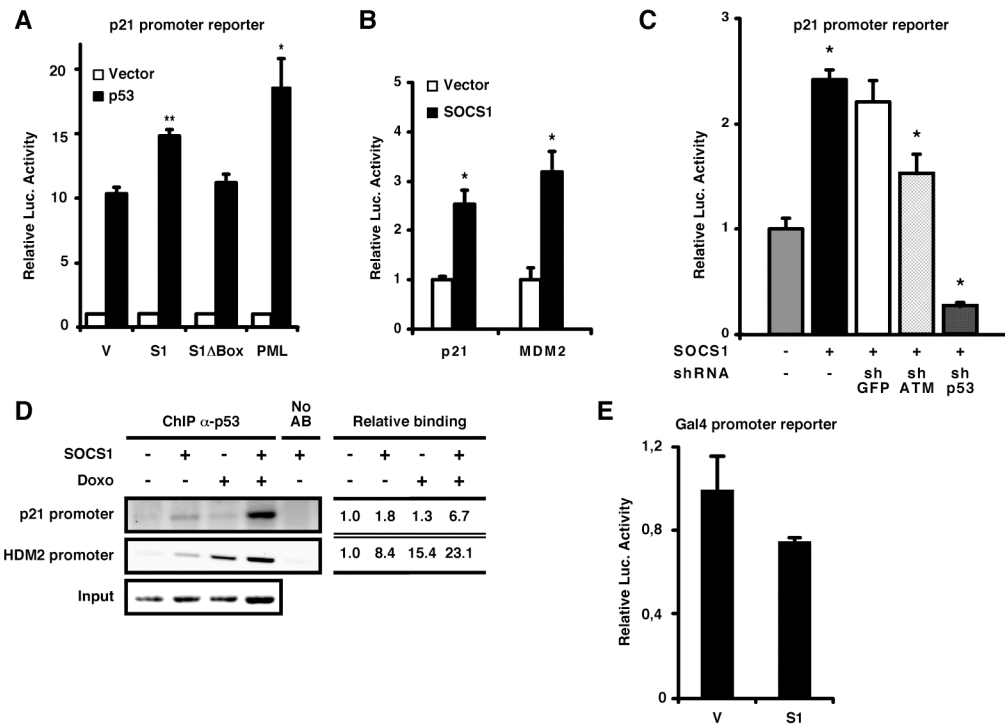


Figure 2.4 SOCS1 stimulates the transcriptional activity of p53.

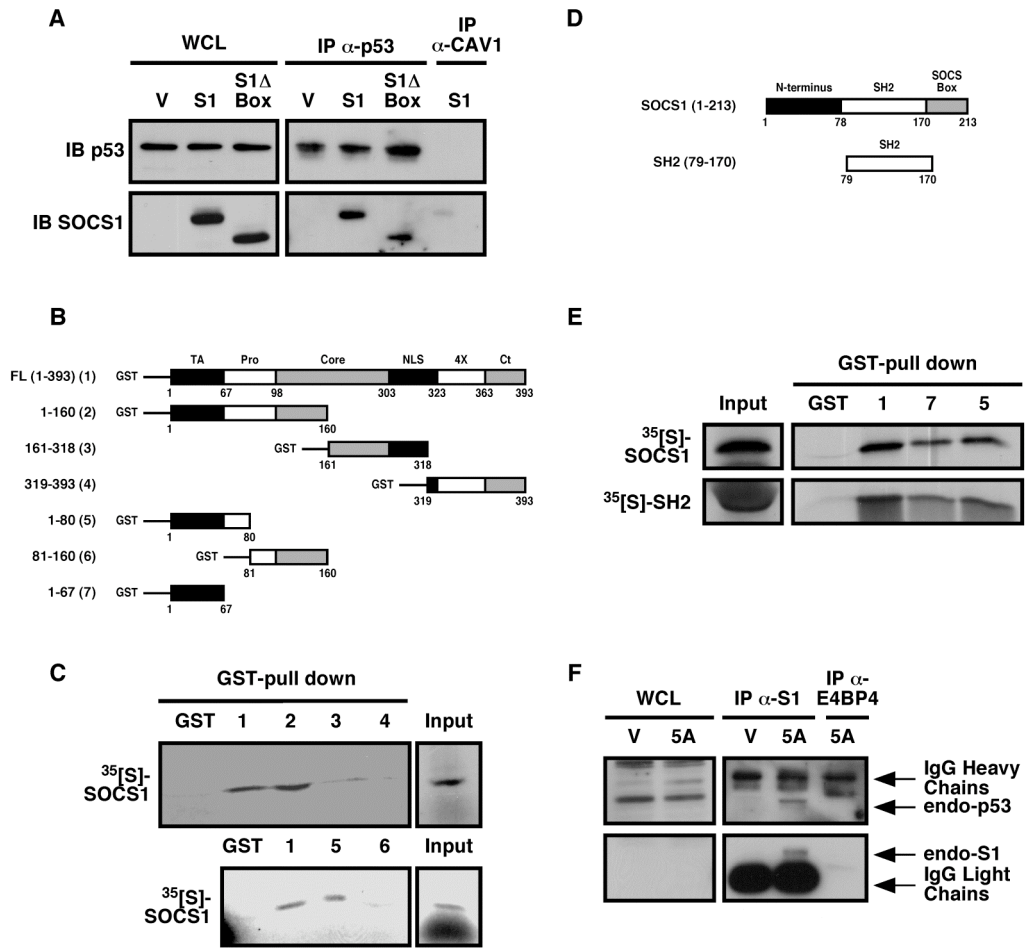


Figure 2.5 SOCS1 directly interacts with p53.

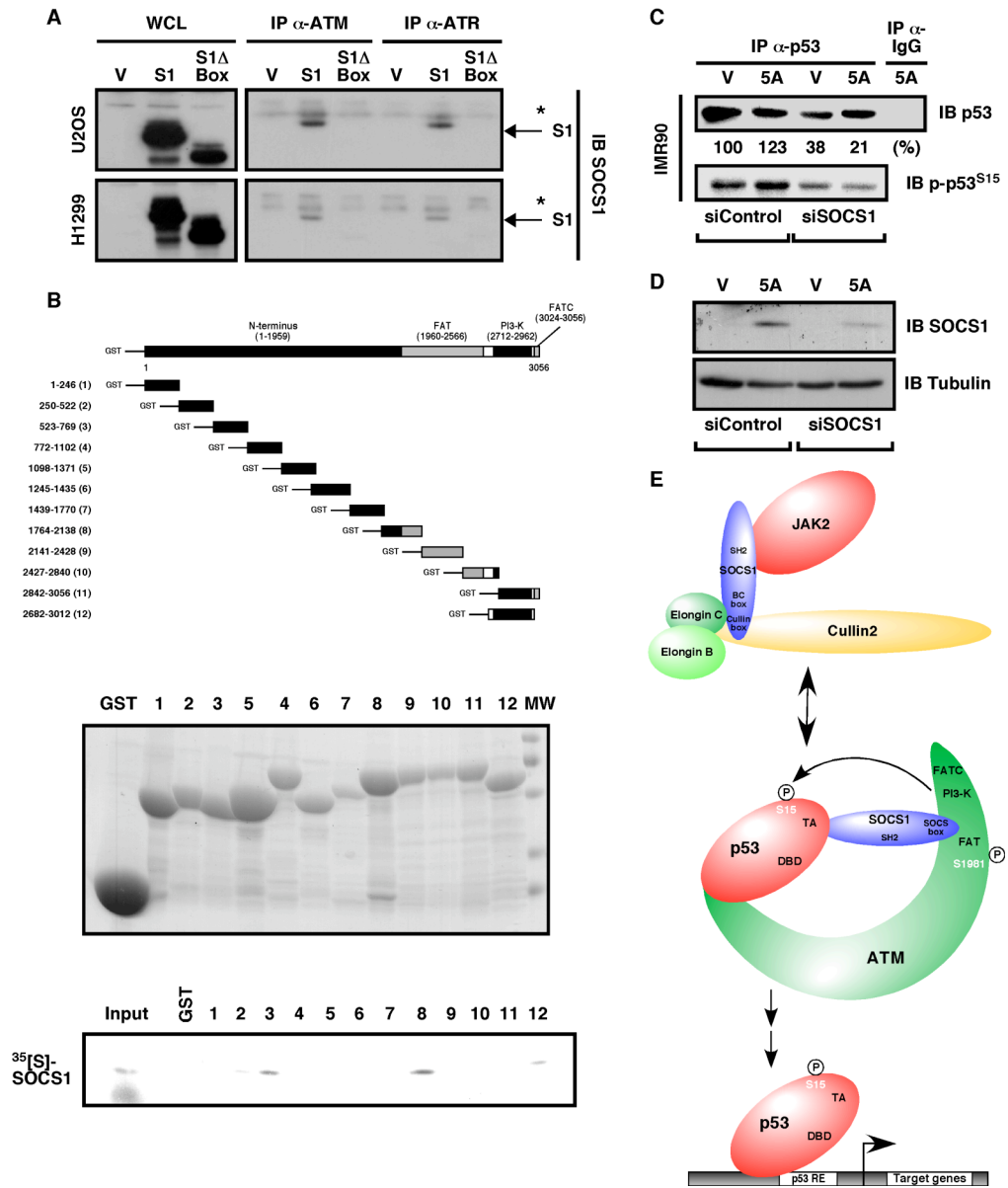


Figure 2.6 SOCS1 interacts with ATM and ATR.

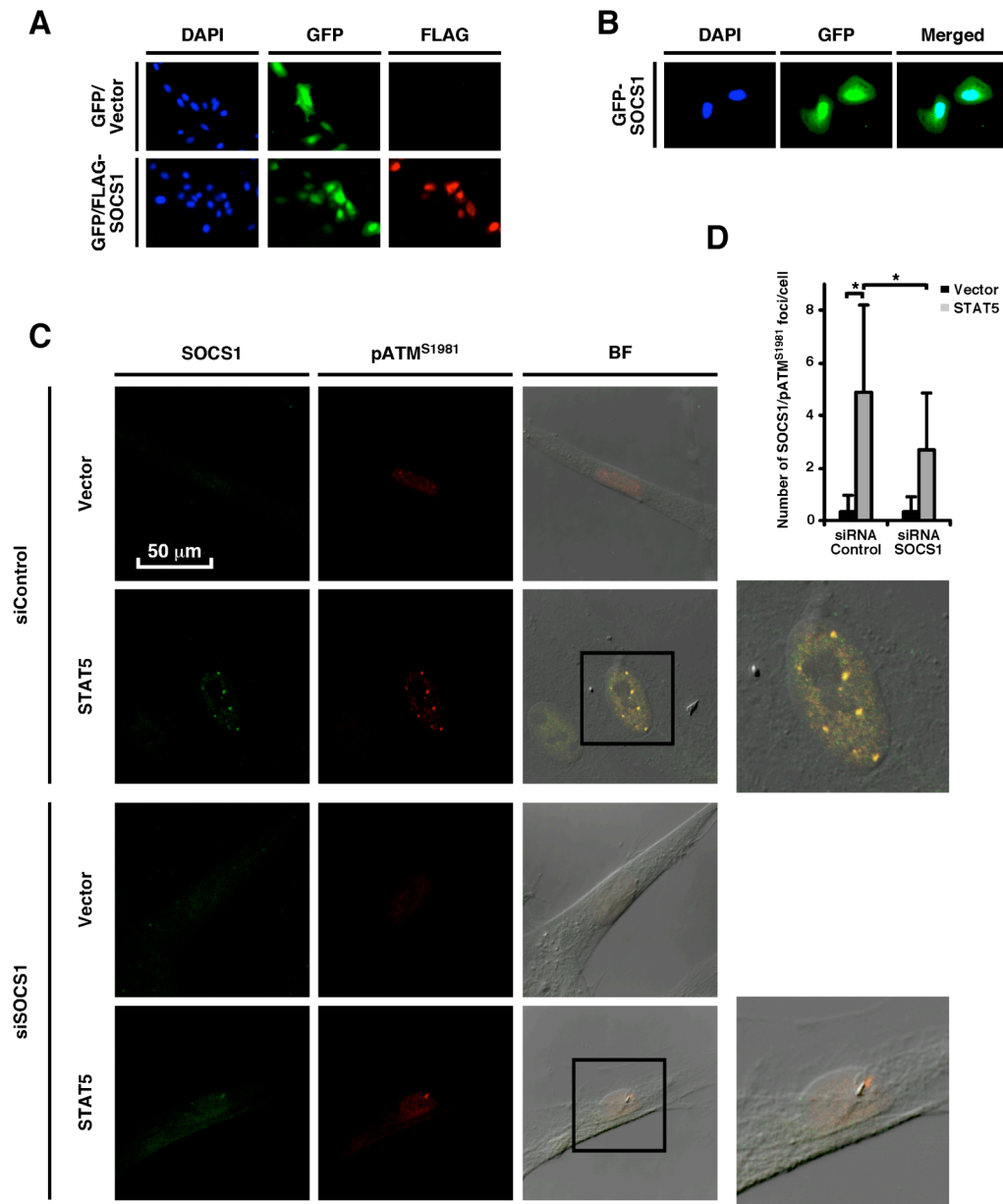


Figure 2.7 Cellular localization of SOCS1.

2.2.11 Supplementary Data

2.2.11.1 Supplementary Material and Methods

Plasmids and vector constructions

pBabe, pBabeRas, pLPC and pLPCp53 were described in (Ferbeyre et al. 2000) and pBabeSTAT5A1*6 in (Malette et al. 2007). pBabeSOCS1 and pBabeSOCS1 Δ Box were obtained from Dr I. Touw. pLPCMyc-tagged SOCS1 was obtained from Dr. S. Meloche. To obtain Flag-SOCS1, Flag-SOCS1 Δ Box and Flag-SH2-SOCS1, a flag tag was added at the N-terminal of the proteins using PCR. PCR products were cloned into pLPC as EcoRI-XhoI fragments. Flag-SOCS1, Flag-SOCS1 Δ Box and Flag-SH2-SOCS1 were subcloned from pLPC-vectors into pGEM[®]-3Zf(+) vector (Promega) as EcoRI-SalI fragments. SOCS1R105E was made by PCR mutagenesis from Flag-SOCS1 and cloned into pLPC as an EcoRI-XhoI fragment. pGEX-2T-hp53 and the corresponding deletion mutants were previously described (Huibregtse et al., 1991). To obtain GFP-SOCS1, GFP was subcloned from Topaz CSII-CMV-MCS (provided by Dr. L. Desgroseillers) into pLPC-MycSOCS1 as a BamHI-EcoRI fragment. By this way, Myc-tagged was substituted by GFP. GST-hp53 1-80, GST-hp53 80-160 and GST-hp53 1-67 were obtained by inserting PCR fragments of hp53 into pGEX-5X-3 vector (Amersham) as EcoRI-XhoI fragments. The twelve GST-ATM deletion constructs were previously described (Khanna et al., 1998).

shRNA against ATM (shATM) was described in (Mukhopadhyay et al. 2005) and shRNA against p53 (shp53) was described in (Voorhoeve and Agami, 2003). All p53 reporter promoters were obtained from G. Rechavi.

T cell proliferation assay

CD8⁺ T cells were purified by positive selection using magnetic cell sorting (MACS) microbeads (Miltenyi Biotech) following the manufacturer's instructions. Proliferation of total splenocytes or purified T cell subsets was measured by thymidine

incorporation. Purified T cells were cultured in 96-well microtiter plates (5×10^5 cells/well) with RPMI, 10% FCS stimulated with 10 ng/ml of IL-21, IL-15 or both for 72 h. To measure cell proliferation, 1 mCi of methyl- ^3H -thymidine (NEN, Boston, MA) was added per well during the last 8 h of culture. The cells were harvested onto glass fiber filter mats and the incorporated radioactivity was measured in a Top Count[®] microplate scintillation counter (Perkin Elmer).

Protein Expression Analysis

To prepare total cellular protein, cells were collected by trypsinization, washed with PBS, lysed in 100 μl of SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glycerol, 2 % SDS and 5% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 min. For Western blots, 20 μg of total cell protein were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Primary antibodies used were: anti-Rb (G3-245, 1:250, BD Pharmingen), anti-p16^{INK4a} (F-12, 1:500, Santa Cruz), anti-CDK4 (C-22, 1:250, Santa Cruz), anti-MCM6 (provided by Dr. Heidebrecht, 1:10), anti-p53 (9282, 1:1000, Cell Signaling), anti-p53 (2524, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-p53^{S15} (9286, 1:2000, Cell Signaling), anti-p21 (C-19, 1:750 Santa Cruz), anti-Myc (9E10, 1:2500), anti- α -tubulin (B-5-1-2, 1:5000, Sigma), anti-phospho-Chk2^{T68} (2661, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-Chk2^{S19} (2666, 1:1000, Cell Signaling), anti-Chk2 (2662, 1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-ATM^{S1981} (10H11.E12, 1:200, Cell Signaling) and anti-SOCS1 (4H1, 1:1000, MBL). Signals were revealed after incubation with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, coupled to peroxidase (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) or Lumi-Light^{PLUS} (Roche).

GST Pull-Downs

E. coli BL21 harboring each of the p53-GST-fusion vectors were grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.6 in 400 mL YTA 2X medium (16g/L tryptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl) and induced with 0.4 mM IPTG for 4 hr at 30°C. Cell pellets were resuspended in 4 mL PBS 0.1% Triton X-100 with Protease Inhibitors Cocktail (Roche) and sonicated with a

microtip five times for 10s. Extracts were centrifuged and supernatants were incubated for 2 hr at 4°C with glutathione Sepharose-4B (Amersham) and washed four times with PBS 0.1% Triton X-100. Beads were resuspended in PBS. Pull downs of the GST-ATM fusion proteins were performed as previously described (Khanna et al., 1998). Briefly, [S]³⁵Flag-SOCS1 was incubated with GST-hp53 or GST-hATM purified proteins bound to glutathione Sepharose-4B for 2h at 4°C. Equal amounts of GST fusion proteins were used as judged from SDS gel electrophoresis and Coomassie blue staining. Beads were washed 5 times with PBS 0.1% Triton X-100. Precipitates were eluted in 20 µL of SDS Sample Buffer and 10 µL of Bromophenol Blue and boiled for 5 min. Eluates (30 µL) were separated on SDS-PAGE, dried and exposed for autoradiography.

Luciferase Assays

7,5x10⁴ H1299 cells or 2x10⁵ U2OS cells were plated in 12 wells plates. For H1299, 0,5 µg of the firefly luciferase reporter plasmid under the control of the p21 promoter was co-transfected with 50 ng of pLPCp53 and 0,2 µg of pBabe, pBabeSOCS1, pBabeSOCS1ΔBox or pLPCPML. 0,1 mg of *Renilla* luciferase reporter plasmid under the control of the β-globin was used to normalize the data. Cells were transfected with FUGENE 6 (Roche), according to the manufacturer's instructions. The total quantity of plasmid was kept constant by adding the empty vector pLPC.

For U2OS, 937,5 ng of reporter genes were co-transfected with 312,5 ng of pLPC-Flag-mSOCS1, pLPC-Flag-mSOCS1ΔBox or empty pLPC (ratio 3:1) and 2,5 ng of the *Renilla* luciferase reporter. Cells were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. 24h post-transfection, cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. 24h (H1299) or 48h (U2OS) after transfection, cells were lysed and luciferase assays were performed using Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions. Firefly and *Renilla* counts were obtained using Fusion a-FP (Perkin Elmer). Firefly counts were normalized to *Renilla* counts.

For the GAL4 reporter, we plated 2×10^5 H1299 cells and transfected the day after with 2,5 ng of Gal4-p53 (Tansey et al., 1994), 500 ng of GAL4 reporter, 2.5 ng of renilla and 750 ng of pLPC (empty vector) or its derivative expressing SOCS1. Cells were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to manufacturer's instructions.

siRNAs

siSOCS1: 5'-GGCUACGUCCAGGAGCGCACC

siGFP: 5'-CUACCUGAGUCCUUCUUUUUU

Primer pairs

Mouse PMP22 sense	5'-GCGGTGCTAGTGTGCTCTT-3'
Mouse PMP22 antisense	5'-TCAGTCGTGTGTCCATTACCC-3'
Mouse p53 sense	5'-ACGCTTCTCCGAAGACTGG-3'
Mouse p53 antisense	5' –AGGGAGCTCGAGGCTGATA-3'
Mouse BBC3 sense	5' –TTCTCCGGAGTGTTTCATGC-3'
Mouse BBC3 antisense	5' –TACAGCGGAGGGGCATCAG-3'
Mouse GADD45 α sense	5' –GCAGAGCAGAAGACCGAAAG-3'
Mouse GADD45 α antisense	5' –GTAATGGTGCGCTGACTCC-3'
Mouse Mdm2 sense	5' – CCAGGCCAATGTGCAATACCAACA-3'
Mouse Mdm2 antisense	5' – TGCGCTCCAACGGACTTTAACAAC -3'
Human SOCS1 sense	5' – GGTCCCCCTGGTTGTTGTA -3'
Human SOCS1 antisense	5' – TAGGAGGTGCGAGTTCAGGT -3'
Human Tp53 sense	5' – AGGCCTTGGA ACTCAAGGAT- 3'
Human Tp53 antisense	5' – CCCTTTTGGACTTCAGGTG – 3'

Human RelA sense	5' – CGGGATGGCTTCTATGAGG – 3'
Human RelA antisense	5' – CTCCAGGTCCCGCTTCTT – 3'
Human DAPK1 sense	5' – GCAGGAAAACGTGGATGATT – 3'
Human DAPK1 antisense	5' – CATTCTTCACAACCGCAA – 3'
Human PMP22 sense	5' – TTCTCATCATCACCAAACGAA – 3'
Human PMP22 antisense	5' – GCTGAAGATGATCGACAGGAT – 3'
Human HDM2 sense	5' – GACTCCAAGCGCGAAAAC – 3'
Human HDM2 antisense	5' – CAGACATGTTGGTATTGCACATT – 3'
Human GADD45 α sense	5' – TTGCAATATGACTTTGGAGGAA – 3'
Human GADD45 α antisense	5' – CATCCCCACCTTATCCAT -3'
Human p21 (ChIP) sense	5'- ACATCCTCCTTCTTCAGG- 3'
Human p21 (ChIP) antisense	5'- CACTCACACAAGCACA- 3'
Human Hdm2 (ChIP) sense	5'- AGTTCAGGGTAAAGGTCA- 3'
Human Hdm2 (ChIP) antisense	5'-AACTGGAAATCATGAAAC- 3'
Mouse Mdm2 (ChIP) sense	5'- CTGGAGGCCCGCAGGAGA -3'
Mouse Mdm2 (ChIP) antisense	5'- CTGGGCTCGTTGCTGGGG -3'

Real-time RT-PCR (qPCR)

To analyze the induction of p53-induced genes in the absence of SOCS1, CD8+ T cells purified from SOCS1 deficient and control mice were stimulated with a combination of IL-15 and IL-21 for 24 h, harvested and lysed in Trizol (Invitrogen) before RNA extraction according to the manufacturer's instructions. For cDNA preparation, total RNA

were reverse transcribed in a final volume of 100 μ L using the High Capacity cDNA Archive Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described by the manufacturer. Reverse transcribed samples were stored at -20°C . A reference RNA (Human reference total RNA, Stratagene, Ca) was also transcribed in cDNA. Gene expression level was determined using primer and probe sets from Universal ProbeLibrary (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>). PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2 μ l of cDNA samples (50 ng), 5 μ l of the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA), 2 μ M of each primer and 1 μ M of the Universal TaqMan probe in a total volume of 10 μ l. The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 10 minutes at 95°C , followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C . All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. The GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ACTB (β -Actin) or 18S ribosomal RNA were used as endogenous controls. The relative quantification of target genes was determined by using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

Chromatin Immunoprecipitation Assay in U2OS cells

U2OS cells were transfected with 20 μ g of SOCS1 or vector control and 24 hours later treated with doxorubicin (300 ng/mL) or vehicle for 8h. Cells were then treated with 1% formaldehyde for 15 min at RT. Cross-linking was stopped with 125 mM glycine. Cells were washed twice with PBS and collected in cold PBS by scrapping. They were successively resuspended in NCPI buffer (EDTA 10 mM, EGTA 0,5 mM, Hepes 10 mM pH 6,5, Triton X-100 0,25%, protease inhibitor cocktail [Roche]), NCPII buffer (EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, Hepes 10 mM pH 6,5, NaCl 200 mM) and harvested in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) deoxycholate, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail [Roche]). Samples were sonicated to generate DNA fragments around 500 bp. For immunoprecipitation, 750 μ g of protein

extract was precleared for 3h with 35 μ L of a 50% slurry of protein A sepharose beads and 6 μ g of salmon sperm DNA before adding anti-p53 antibody (9282, 1:150, Cell Signaling) for 2h at 4°C. Immunoprecipitates were recovered by 1h incubation at 4°C with 50 μ L of a 50% slurry of protein A sepharose beads. Precipitates were washed 3 times with RIPA buffer and 3 times with RIPA buffer at 300 mM NaCl. Immunocomplexes were eluted for 10 min at 65°C with 1% SDS and cross-linking was reversed by adjusting to 200 mM NaCl and incubating 5h at 65°C. DNA was extracted with phenol/chloroform, precipitated with EtOH and resuspended in 50 μ L TE. PCR reactions were performed with 5 μ L of each sample. Primers are described above.

2.2.11.2 Supplementary References

Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., and Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev* *14*, 704-718.

Brancolini, C., Marzimoto, S., and Schneider, C. (1997). Susceptibility to p53 dependent apoptosis correlates with increased levels of Gas2 and Gas3 proteins. *Cell death and differentiation* *4*, 247-253.

Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and Howley, P.M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* *10*, 4129-4135.

Jen, K.Y., and Cheung, V.G. (2003). Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Genome research* *13*, 2092-2100.

Jen, K.Y., and Cheung, V.G. (2005). Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res* *65*, 7666-7673.

Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., and Lavin, M.F. (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* *20*, 398-400.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* *133*, 1019-1031.

Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., Huot, G., and Ferbeyre, G. (2007). Myc Down-regulation as a Mechanism to Activate the Rb Pathway in STAT5A-induced Senescence. *J Biol Chem* *282*, 34938-34944.

Martoriati, A., Doumont, G., Alcalay, M., Bellefroid, E., Pelicci, P.G., and Marine, J.C. (2005). *dapk1*, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* *24*, 1461-1466.

Sehgal, P.B., and Margulies, L. (1993). Cell-type- and promoter-dependent ts phenotype of p53 Val135. *Oncogene* *8*, 3417-3419.

Stein, S., Thomas, E.K., Herzog, B., Westfall, M.D., Rocheleau, J.V., Jackson, R.S., 2nd, Wang, M., and Liang, P. (2004). NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279, 48930-48940.

Tansey, W.P., Ruppert, S., Tjian, R., and Herr, W. (1994). Multiple regions of TBP participate in the response to transcriptional activators in vivo. *Genes Dev* 8, 2756-2769.

Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., Milia, E., Padura, I.M., Raker, V.A., Maccarana, M., *et al.* (2002). A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 3872-3878.

Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 4, 311-319.

Wang, S., and El-Deiry, W.S. (2006). p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints. *Cancer Res* 66, 6982-6989.

2.2.11.3 Supplementary Legends

Supplementary Figure 2.1 The suppressor of cytokine family in STAT5-induced senescence. STAT5 senescent cells were obtained by retroviral gene transfer as previously described (Malette et al., 2007). RNA from these cells and control cells was purified and analyzed by real time RT-PCR.

Supplementary Figure 2.2 SOCS1 inhibits cell proliferation and activates p53 in U2OS cells. **A)** Colony formation assay in U2OS cells transiently transfected with 20 µg of an empty control vector, SOCS1 or SOCS1ΔBox using the calcium phosphate precipitation method. They were then selected with 2,0 µg/ml of puromycin for 2 days. Foci were detected using crystal violet (0,5 % in H₂O) ten days after transfection. **B)** Colony formation assay in H1299 cells transiently transfected with 20 µg of an empty control vector or its derivatives expressing SOCS1 or p53. **C)** Western blot analysis for the indicated proteins in U2OS cells transfected with an empty control vector or its derivative expressing SOCS1, selected with 2,0 µg/mL of puromycin for 24h and collected 24h later.

Supplementary Figure 2.3 Senescence markers in SOCS1-induced senescence. **A)** Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) staining of IMR90 cells expressing an empty control vector, STAT5A1*6, SOCS1 or SOCSΔBox and fixed 6 days post-selection. **B)** Indirect PML immunofluorescence of IMR90 cells expressing an empty control vector, SOCS1, STAT5A1*6 or RasV12. **C)** DNA damage foci revealed by indirect immunofluorescence using an antibody against γH2AX in IMR90 cells expressing SOCS1 or a vector control.

Supplementary Figure 2.4 SOCS1 activates p53 in reporter assays. **A)** SOCS1 stimulates multiple p53-dependent promoters. Luciferase activity (fold of control) of U2OS cells transiently transfected with the p21, HDM2, PTEN, NOXA, BAX or β-casein (negative control) promoter luciferase plasmid and an empty control vector or SOCS1. The cells were

treated for 24h with doxorubicin (300 ng/mL) 24h post-transfection. **B)** DNA damage requirements for SOCS1's ability to stimulate the activity of p53 on p21 and HDM2 promoters. Luciferase activity (% of control) comparing cells treated with doxorubicin or vehicle. Asterisk represents a significant increase of luciferase activity (Paired *t* test: *, $p < 0,01$) compared to control cells.

Supplementary Figure 2.5 Interaction of SOCS1 and p53. **A)** H1299 cells were transiently co-transfected with an empty control vector or Myc-SOCS1 and an empty control vector or p53. Cells lysates were immunoprecipitated with anti-p53 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibodies. Immunoprecipitation against cyclin A (CA) was used as a negative control. **B)** SOCS1 interacts with p53 without DNA damage induction. U2OS were transiently transfected with an empty control vector (V) or SOCS1 (S1). Lysates were immunoprecipitated with anti-p53 polyclonal antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody. Immunoprecipitation against cyclin A (CA) was used as a negative control. * denotes a non-specific band.

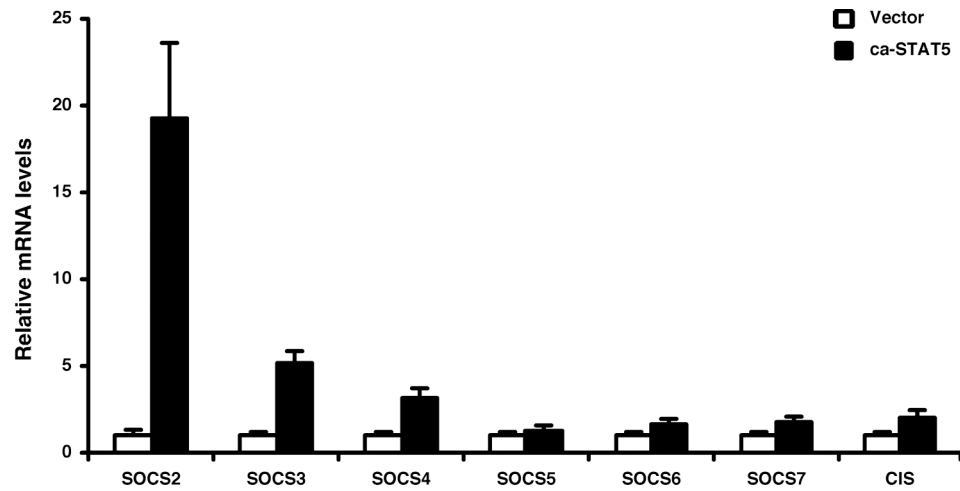
Supplementary Figure 2.6 Phosphotyrosine-binding independent functions of SOCS1. **A)** SOCS1R105E interacts with endogenous p53. U2OS were transiently transfected with an empty control vector (V), SOCS1 (S1) or SOCS1R105E (Mut). Lysates were immunoprecipitated with anti-p53 polyclonal antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody. Immunoprecipitation against cyclin A (CA) was used as a negative control. **B)** SA- β -gal staining of IMR90 cells expressing an empty control vector, SOCS1 or SOCS1R105E. Cells were fixed 6 days post selection. The number of blue cells was quantified in three independent counts of 200 cells each one. The average and standard deviation of this quantitation is shown at the bottom right of each panel. **C)** Immunoblots for SOCS1 expression in the cells presented in B. **D)** Colony formation assay in U2OS cells transiently transfected with 20 μ g of an empty control vector, SOCS1 or SOCS1R105E using the calcium phosphate precipitation method. They were then selected with 2,0 μ g/ml

of puromycin for 2 days. Foci were detected using crystal violet (0,5 % in H₂O) ten days after transfection.

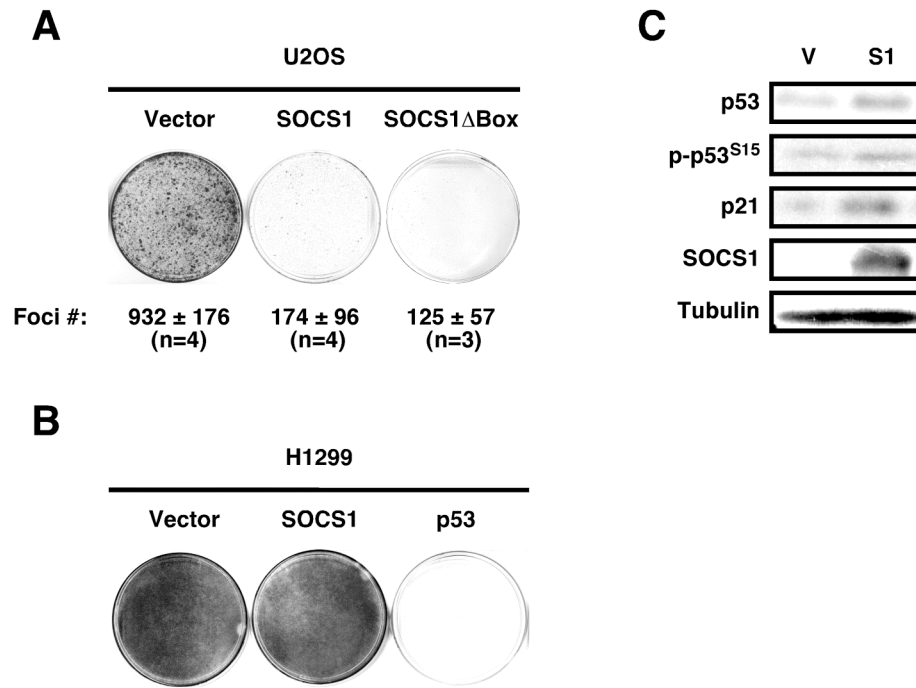
Supplementary Figure 2.7 Interaction of SOCS1 and phosphoATM^{Ser1981}. U2OS were transiently transfected with an empty control vector (V) or SOCS1 (S1). Lysates were immunoprecipitated with anti-phosphoATM^{Ser1981} antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody or anti-ATM antibody. Immunoprecipitation against cyclin A (CA) was used as a negative control.

Supplementary Figure 2.8 Socs1 null CD8 SP cells have a dramatic defect in the p53-dependent cell death response. Single cell thymocyte suspensions were exposed to the indicated doses of gamma radiation. After incubation at 37°C for 16 hours, the cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and annexin V-PE. Annexin V staining on cells within the gated thymocyte subsets are indicated as histograms. The numbers represent the annexin V positive apoptotic cells.

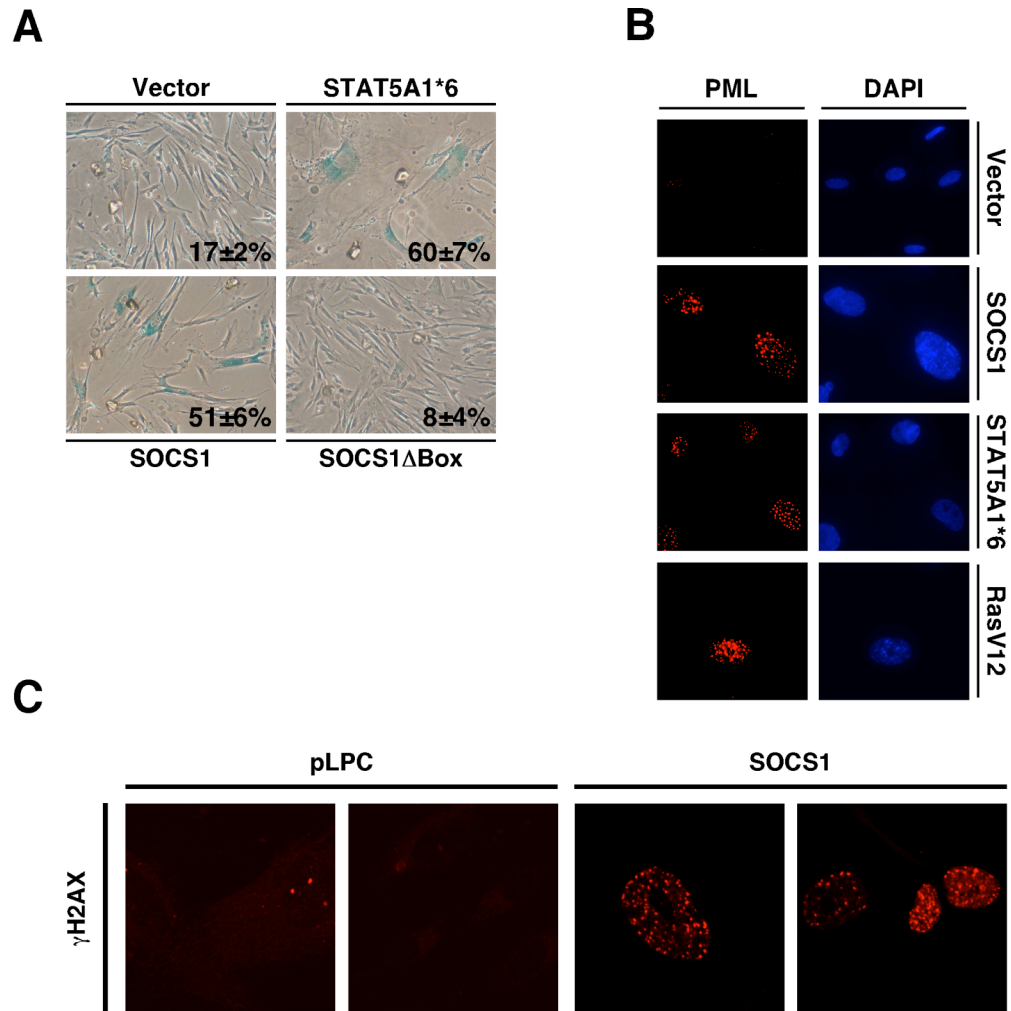
2.2.11.4 Supplementary Figures and Tables



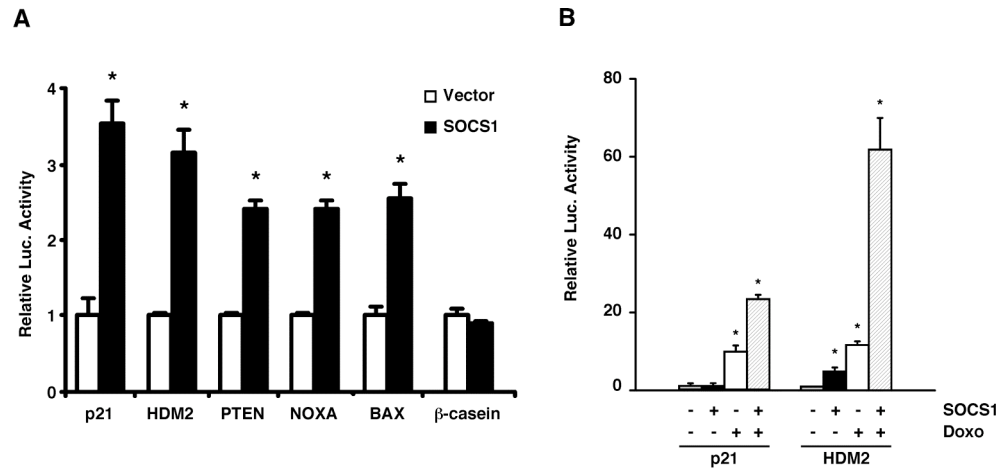
Supplementary Figure 2.1 The suppressor of cytokine family in STAT5-induced senescence.



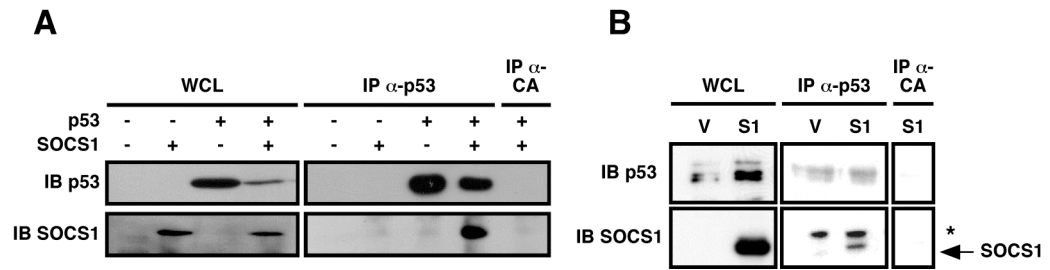
Supplementary Figure 2.2 SOCS1 inhibits cell proliferation and activates p53 in U2OS cells.



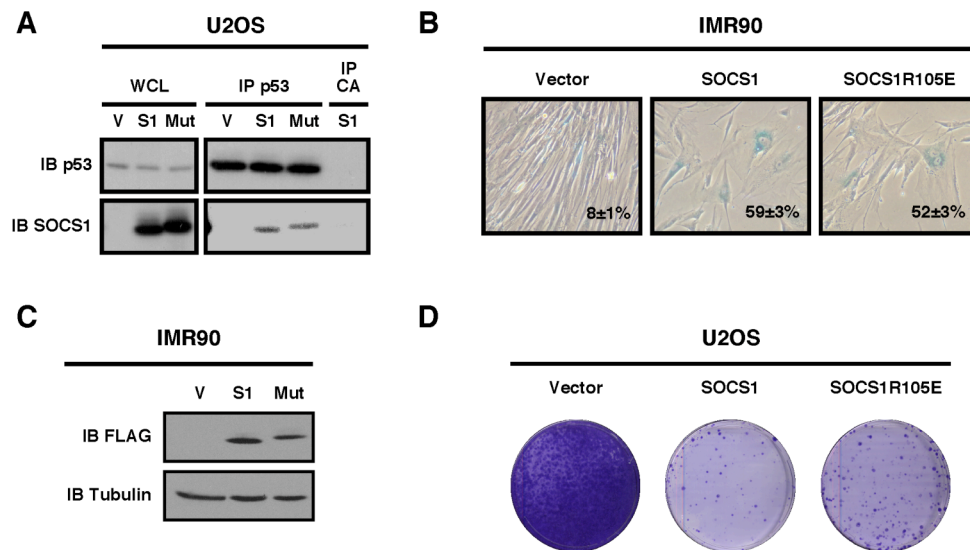
Supplementary Figure 2.3 Senescence markers in SOCS1-induced senescence.



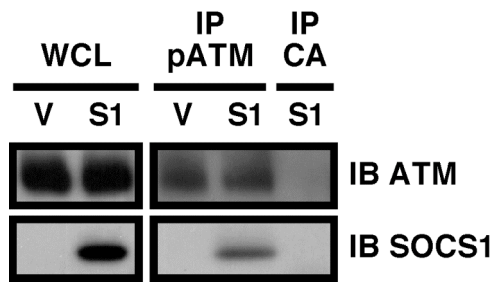
Supplementary Figure 2.4 SOCS1 activates p53 in reporter assays.



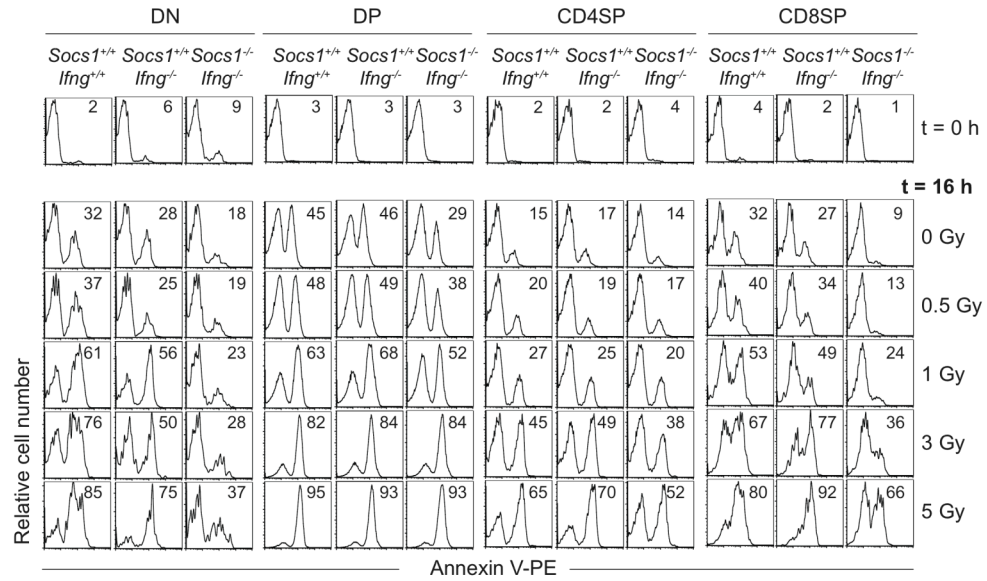
Supplementary Figure 2.5 Interaction of SOCS1 and p53.



Supplementary Figure 2.6 Phosphotyrosine-binding independent functions of SOCS1.



Supplementary Figure 2.7 Interaction of SOCS1 and phosphoATM^{Ser1981}.



Supplementary Figure 2.8 *Socs1* null CD8 SP cells have a dramatic defect in the p53-dependent cell death response.

Supplementary Table 2.1 Genes found deregulated during STAT5-induced senescence*.

Gene	Fold variation
<i>Up-regulated</i>	
DAPK1(Martoriati et al., 2005)	1,58
FRAP1**	1,86
IGFR1**	1,82
IL6*** (Sehgal and Margulies, 1993)	2,89
NDRG1 (Stein et al., 2004)	2,16
PMP22 (Brancolini et al., 1997)****	2,02
PPP1R9B**	1,73
RELA (Jen and Cheung, 2003)*****	1,97
SHC1 (Trinei et al., 2002)	1,66
TNFRSF10B (Jen and Cheung, 2005)	2,21
TP53 (Wang and El-Deiry, 2006)	2,25
<i>Down-regulated</i>	
BIRC5	-2,42
CCNE2	-2,04
CDKN2A	-1,62
DAXX	-1,58
E2F1	-2,12
EI24	-1,89
GAS1	-2,68
PTTG1	-1,68

* For array analysis, we obtained total RNA from IMR90 cells expressing ca-STAT5A or control six days post selection. We send these samples to Superarray Bioscience Corporation, (Frederick, MD). Probes from the total RNA were hybridized against microarrays containing only genes in the p53 pathway (four spots per gene). Data was normalized by using minimum value background subtraction and interquartile normalization.

** these genes are not reported as bona fide p53 targets although they were included in the p53-target microarray of Superarray Bioscience Corporation.

***. Interleukin 6 is part of the cytokine program required for senescence (Kuilman et al., 2008)

**** this gene is not a validated p53 target but it is homologous to PERP, which has been well characterized as a p53 target (Attardi et al., 2000).

***** RelA was identified as a DNA damage-induced gene but is not yet proven to be a p53 target.

3 SOCS1, un régulateur commun aux facteurs de transcription composés d'un domaine de transactivation acide

3.1 Présentation de l'article 2

Le deuxième article de cette thèse a pour but d'approfondir l'étude d'interaction entre SOCS1 et p53. Comme nous l'avons vu au chapitre 2, le premier article de cette thèse met en évidence un mécanisme de régulation de p53 et de la sénescence par la protéine SOCS1. Plus précisément, suite à une activation aberrante de la signalisation par les cytokines, SOCS1 est en mesure d'interagir avec ATM et p53 de façon à faciliter l'activation de cette dernière par ATM. L'interaction entre SOCS1 et p53 fait intervenir le domaine SH2 de SOCS1 et le domaine de transactivation de p53, alors que l'interaction entre SOCS1 et ATM implique le domaine SOCS box de SOCS1. Afin d'identifier la région précise de p53 nécessaire pour son interaction avec SOCS1, nous avons poursuivi l'étude d'interaction entre les deux protéines. La génération de nouveaux mutants de délétion de p53 a permis de démontrer que SOCS1 interagit spécifiquement avec le TAD-II de p53. De plus, les acides aminés tryptophane 53 (W53) et phénylalanine 54 (F54) de ce domaine semblent essentiels pour l'interaction. L'analyse approfondie de cette région de p53 a permis de mettre en évidence un motif conservé dans plusieurs autres facteurs de transcription pourvus d'un domaine de transactivation acide, dont NFκB, p63, p73 et E2F1. En accord avec les résultats de cette analyse, nous avons démontré, par co-immunoprécipitation, que SOCS1 est en mesure d'interagir avec p63, p73 et E2F1. Il apparaît donc que la capacité de SOCS1 d'interagir et de réguler p53 puisse s'étendre à d'autres facteurs de transcription.

Ce deuxième article est en fait un manuscrit en préparation. Il n'a encore jamais été soumis, mais nous prévoyons le soumettre d'ici mars 2012 au journal *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Plusieurs expériences restent à faire, dont celles permettant de démontrer que l'interaction de SOCS1 avec p63, p73 et E2F1 a un effet sur leur fonction. Pour cet article, je suis la seule, avec mon directeur de recherche, à avoir contribué. Par conséquent, j'ai réalisé la totalité des expériences qui y sont présentées.

3.2 Article 2

SOCS1 BINDS TO TRANSCRIPTION FACTORS CONTAINING ACIDIC ACTIVATION DOMAINS

Viviane Calabrese¹ and Gerardo Ferbeyre¹

1) Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

Correspondence to :

[Redacted contact information]

3.2.1 Introduction

Cytokines exert powerful effects on cellular function mainly by modulating gene expression. In addition, cytokines regulate their own signaling pathways by inducing genes capable of interacting with signal transduction from cytokines receptors to cytokine-regulated transcription factors. Two families of cytokine regulatory factors have been identified. The SOCS family comprises proteins that combine a SH2 domain for target protein recognition [1] with a SOCS box, which recruits E3 ubiquitin ligases [2] and other effectors complexes to regulate the functions of the target proteins [3]. The PIAS family, consist of proteins that interact with transcription factors usually inhibiting their activity [4]. This clear dichotomy was broken with the discovery that the SH2 domain of SOCS1 could interact with the N-terminal transcriptional activation domain of p53 [5], indicating that the SOCS family can also modulate cytokine signaling by interacting with transcription factors.

The interaction between SOCS1 and p53 could be a specific event that evolved to reinforce the tumor suppression functions of SOCS1. Alternatively, the SH2 domain of SOCS1 might have evolved to interact with several transcription factors modulating global gene expression programs triggered by cytokines. Here we report that SOCS1 interact with the acidic transcriptional activation domain II (TAD-II) of p53 but not with the transcriptional activation domain I (TAD-I). In agreement, SOCS1 was able to interact with the p53 isoform Δ Np53 that lacks the TAD-I. In addition, we found that specific hydrophobic residues in the p53 TAD-II are required for interaction with SOCS1. The TAD-II of p53 is structurally similar to many acidic transcription activation domains (aTADs), which also contain critical hydrophobic residues for interaction with general transcription regulatory factors. We found that SOCS1 also interacts with p63, p73 and E2F1, which contain such aTADs. We thus propose that SOCS1 can potentially modulate gene expression programs by interacting with multiple transcription factors.

3.2.2 Results

SOCS1 interacts with the acidic transcriptional activation domain II of p53

We previously published that the SH2 domain of SOCS1 was able to interact with the N-terminus of p53 containing the TAD-I and TAD-II [5]. To further determine the region of p53 that interacts with SOCS1, we made GST-p53 fusion proteins containing the sequence corresponding to either the TAD-I or the TAD-II of p53. These constructs were expressed in bacteria and the fusion proteins purified. To investigate if the SOCS1-p53 complex found *in vivo* is the result of direct interaction, we performed GST-pull down assays using the GST-p53 fusions fragments (Figure 3.1A) and *in vitro* transcribed/translated SOCS1. SOCS1 interacted with the fragment containing the TAD-II of p53 (amino acids 35-67) (Figure 3.1B) but not with the fragment containing the TAD-I (amino acids 1-34).

The TAD-II of p53 is the only p53 activation domain present in a very interesting p53 variant known as Δ Np53. Δ Np53 is produced by alternative initiation of translation of the p53 mRNA [6-8]. In mice engineered to overexpress this variant, the p53 pathway is highly activated and the animals prematurely aged [9]. This data suggest the interesting possibility that SOCS1 could regulate senescence and aging by selectively stabilizing and activating Δ Np53.

To study whether SOCS1 interacts with Δ Np53 we have prepared a p53 mutant gene where the first AUG of p53 is mutated. This gene can only be translated from the AUG at position 40, which is exactly the first amino acid of Δ Np53. As expected, this construct lead to high levels of Δ Np53 when transfected in p53 in U2OS and p53 null H1299 cells and from now on we will refer to it as Δ Np53 (Supplementary Figure 3.1). To study whether SOCS1 can interact with Δ Np53, we co-expressed Δ Np53 and SOCS1 in p53 null H1299 cells and immunoprecipitated the putative complexes with an anti-p53

antibody. We found SOCS1 in the same complex with Δ Np53 (Figure 3.1C). Taken together, these results indicate that SOCS1 modulate p53 functions by interaction with its TAD-II.

Hydrophobic residues in the p53 TAD-II are required for p53 binding to SOCS1

The TAD-II of p53 is an acidic activation domain that contains several negatively charged residues which could mediate interaction with the SH2 domain of SOCS1. However, mutations of S46, E51 or E56 did not affect the interaction with SOCS1 in GST pull down assays (Figure 3.2A and B). We also mutated several arginine residues, which are important for interaction between SOCS1 and JAK2. The mutations R110A, R128A, K119A and K119E did not affect binding to p53 (Supplementary Figure 3.2).

Residues 47-55 of p53 form a nine-residue amphipathic alpha helix upon binding to the general transcription factor Tfb1 a subunit of TFIIH. In this complex, three hydrophobic residues (F54, W53 and I50) of the p53 helix establish a series of contacts with Tfb1 [10]. We thus reasoned that these residues might as well be important for p53 to bind SOCS1. Two mutants, p53-W53S and p53-F54S, showed a marked reduction in SOCS1 binding indicating that these residues are important for this interaction. Mutations of amino acids 50-52 to A, which include I50, reduced slightly binding to p53 (Figure 3.2C). Altogether, the results suggest that p53 uses the same binding surface for SOCS1 and Tfb1.

SOCS1 binds to p63, p73 and E2F1, which also contain acidic activation domains

Since all acidic activation domains must contact the basal transcriptional apparatus using a similar structure, it is possible that SOCS1 is able to interact and modulate transcription factors with acidic activation domains. To search for candidate binders of SOCS1, we used Prosite descriptors to blast the GeneBank for proteins possessing the p53 sequence x(4)-I-x(2)-W-F-x(3) or variants of it where hydrophobic positions I, W or F were allowed to exchange one for each other. Transcription factors possessing this sequence constrains in acidic activator sequences are presented in Table 3.1. To test that SOCS1 can

bind this sort of sequences, we chose p63, p73 and E2F1 for further analysis. We expressed SOCS1 in U2OS cells and then immunoprecipitated endogenous p63, p73 or E2F1. We were able to recover SOCS1 from the immunoprecipitates (Figure 3.3). Taken together, these data suggest that SOCS1 might have the ability to influence the global transcriptome by binding to several transcription factors.

3.2.3 Discussion

SOCS1 codes for a 211-amino acid protein (~24 kDa) originally cloned as a gene able to inhibit JAK/STAT signaling [11, 12]. It belongs, together with CIS and SOCS2-7, to a family of signaling proteins composed of an N-terminal region of variable length, a central SH2 (src homology) domain, and a C-terminal motif called the SOCS box. The SOCS box is present in up to 20 proteins [13] and binds to an Elongin B/C containing E3 ligase which helps to transfer ubiquitin to target proteins. The current model to explain the functions of SOCS1 proposes that the SH2 domain recognizes target proteins. These proteins are then ubiquitinated and targeted to the proteasome by the E3 ligase complex bound to the SOCS box [14-17]. This model has been extended by the discovery of an adaptor role for SOCS1 for the phosphorylation of the p53 tumor suppressor by the DNA damage activated kinases ATM and ATR [5].

SOCS1 knockout animals die from a complex neonatal disease largely mediated by γ -interferon [18]. This phenotype can be explained by the lack of the negative regulation that SOCS1 exerts over the interferon signaling pathway [14-17]. However, SOCS1 knockout animals display other phenotypes that can not be entirely explained by this paradigm. For, example SOCS1 exerts a positive regulatory role on the expression of Class II molecules, which are induced by γ -interferon [19]. *Socs1/Ifn γ* double knockout animals display a diseased phenotype characterized by polycystic kidneys, pneumonia, chronic ulcers of the skin, granulomas and liver inflammation [20, 21] that can not be explained by the lack of negative regulation of γ interferon signaling by SOCS1. In addition, loss of

SOCS1 expression has been associated to malignant transformation in multiple cell types [22-25]. Since interferon signaling blocks cell proliferation, other regulatory interactions of SOCS1 might explain its tumor suppressor activities.

The ability of SOCS1 to link cytokine signaling to p53 activation via the DNA damage response can explain the tumor suppressor activities of SOCS1 but does not eliminate the possibility that this activity might be more complex. In addition to p53, SOCS1 interacts with NF κ B, a transcription factor possessing an acidic transcriptional activation domain similar to the TAD-II of p53 [26]. Here, we add three additional transcription factors that can interact with SOCS1, p63, p73 and E2F1, and suggest that multiple transcription factors possessing acidic activation domains may be subject to modulation by SOCS1. The physiological outcome of this global regulatory mechanism remains to be investigated but may underlie the complex phenotype of SOCS1 knockout animals and its tumor suppressor activities.

3.2.4 Materials and Methods

Cells and tissue culture

U2OS and H1299 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO).

Plasmids and vectors constructions

pLPC-Flag-SOCS1 and pGEM-Flag-SOCS1 were described in (Calabrese et al. 2009). SOCS1R110A, SOCS1R128A, SOCS1K119A and SOCS1K119E were made by PCR mutagenesis from Flag-SOCS1 and cloned into pLPC as EcoRI-XhoI fragments. All GST-hp53 fragments were obtained by inserting PCR fragments of hp53 into pGEX-5X-3 vector (Amersham) as EcoRI-XhoI fragments.

GST Pull-Downs

E. coli BL21 harboring each of the p53-GST-fusion vectors were grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.6 in 400 mL YTA 2X medium (16g/L tryptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl) and induced with 0.4 mM IPTG for 4 hr at 30°C. Cell pellets were resuspended in 4 mL PBS 0.1% Triton X-100 with Protease Inhibitors Cocktail (Roche) and sonicated with a microtip five times for 10s. Extracts were centrifuged and supernatants were incubated for 2 hr at 4°C with glutathione Sepharose-4B (Amersham) and washed four times with PBS 0.1% Triton X-100. Beads were resuspended in PBS. Briefly, [S]³⁵Flag-SOCS1 was incubated with GST-hp53 purified proteins bound to glutathione Sepharose-4B for 2h at 4°C. Equal amounts of GST fusion proteins were used as judged from SDS-PAGE gel electrophoresis and Coomassie blue staining. Beads were washed 5 times with PBS 0.1% Triton X-100. Precipitates were eluted in 20 µL of SDS Sample Buffer and 10 µL of Bromophenol Blue and boiled for 5 min. Eluates (30 µL) were separated on SDS-PAGE, dried and exposed for autoradiography.

In vitro transcription/translation

Flag-mSOCS1 was transcribed and translated *in vitro* using the TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Co-Immunoprecipitations

H1299 and U2OS were transfected with 20 µg of DNA using calcium phosphate precipitation method. 24h post-transfection, U2OS were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. To prepare cell lysates, cells were washed twice with PBS and collected by scrapping in cold Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM β-glycerolphosphate, protease inhibitor cocktail [Roche]) after 5 min of incubation on ice. Immunoprecipitations were performed with 2 mg of total cell proteins overnight at 4°C with a suitable antibody. The antibodies used for immunoprecipitation were as follows:

anti-p53 (9282, 1:200, Cell Signaling), anti-p63 (H-137, 1:200, Santa Cruz), anti-p73 (H-79, 1:200, Santa Cruz), anti-E2F1 (H-137, 1:200, Santa Cruz), anti-Cyclin A (C-19, 1:200, Santa Cruz) and anti-CDK4 (C-22, 1:200, Santa Cruz). Immunoprecipitates were recovered by 1h of incubation at 4°C with protein A/G Sepharose beads (Amersham). Precipitates were washed four times with Cell Lysis Buffer, eluted in 25 µL of SDS Sample Buffer containing Bromophenol Blue and 25 µL of H₂O, and boiled for 5 min. Half of elutions (25 µL) were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). For whole cell lysates, 50 µg were loaded.

Protein Expression Analysis

For Western blots, 50 µg of total cell protein were separated on SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Primary antibodies used were: anti-p53 (2524, 1:1000, Cell Signaling), anti-p53 (Pab 1801, 1:200, Santa Cruz), anti-SOCS1 (4H1, 1:1000, MBL) and anti-E2F1 (KH95, 1:500, Santa Cruz). Signals were revealed after incubation with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, coupled to peroxidase (Amersham) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) or Lumi-Light^{PLUS} (Roche).

3.2.5 References

- [1] P. De Sepulveda, K. Okkenhaug, J.L. Rose, R.G. Hawley, P. Dubreuil, R. Rottapel, Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation, *Embo J*, 18 (1999) 904-915.
- [2] T. Kamura, S. Sato, D. Haque, L. Liu, W.G. Kaelin, Jr., R.C. Conaway, J.W. Conaway, The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families, *Genes Dev*, 12 (1998) 3872-3881.
- [3] S. Ilangumaran, R. Rottapel, Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1, *Immunological reviews*, 192 (2003) 196-211.
- [4] A.D. Sharrocks, PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases?, *Genes Dev*, 20 (2006) 754-758.
- [5] V. Calabrese, F.A. Mallette, X. Deschenes-Simard, S. Ramanathan, J. Gagnon, A. Moores, S. Ilangumaran, G. Ferbeyre, SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence, *Mol Cell*, 36 (2009) 754-767.
- [6] K.L. Harms, X. Chen, The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties, *Cell Death Differ*, 13 (2006) 890-897.
- [7] T.M. Johnson, L.D. Attardi, Dissecting p53 tumor suppressor function in vivo through the analysis of genetically modified mice, *Cell Death Differ*, 13 (2006) 902-908.
- [8] M.M. Candeias, D.J. Powell, E. Roubalova, S. Apcher, K. Bourougaa, B. Vojtesek, H. Bruzzoni-Giovanelli, R. Fahraeus, Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation, *Oncogene*, 25 (2006) 6936-6947.
- [9] B. Maier, W. Gluba, B. Bernier, T. Turner, K. Mohammad, T. Guise, A. Sutherland, M. Thorner, H. Scrable, Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53, *Genes Dev*, 18 (2004) 306-319.

- [10] P. Di Lello, L.M. Jenkins, T.N. Jones, B.D. Nguyen, T. Hara, H. Yamaguchi, J.D. Dikeakos, E. Appella, P. Legault, J.G. Omichinski, Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53, *Mol Cell*, 22 (2006) 731-740.
- [11] R. Starr, T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, D.J. Hilton, A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling, *Nature*, 387 (1997) 917-921.
- [12] T.A. Endo, M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiya, A. Yoshimura, A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases, *Nature*, 387 (1997) 921-924.
- [13] D.J. Hilton, R.T. Richardson, W.S. Alexander, E.M. Viney, T.A. Willson, N.S. Sprigg, R. Starr, S.E. Nicholson, D. Metcalf, N.A. Nicola, Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 114-119.
- [14] J.G. Zhang, A. Farley, S.E. Nicholson, T.A. Willson, L.M. Zugaro, R.J. Simpson, R.L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B.J. Kile, S.B. Kent, W.S. Alexander, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, M. Baca, The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 2071-2076.
- [15] J.G. Zhang, D. Metcalf, S. Rakar, M. Asimakis, C.J. Greenhalgh, T.A. Willson, R. Starr, S.E. Nicholson, W. Carter, W.S. Alexander, D.J. Hilton, N.A. Nicola, The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 13261-13265.
- [16] S. Kamizono, T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, K. Nakayama, A. Yoshimura, The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2, *J Biol Chem*, 276 (2001) 12530-12538.

- [17] P. De Sepulveda, S. Ilangumaran, R. Rottapel, Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation, *J Biol Chem*, 275 (2000) 14005-14008.
- [18] W.S. Alexander, R. Starr, J.E. Fenner, C.L. Scott, E. Handman, N.S. Sprigg, J.E. Corbin, A.L. Cornish, R. Darwiche, C.M. Owczarek, T.W. Kay, N.A. Nicola, P.J. Hertzog, D. Metcalf, D.J. Hilton, SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine, *Cell*, 98 (1999) 597-608.
- [19] S. Ilangumaran, D. Finan, J. La Rose, J. Raine, A. Silverstein, P. De Sepulveda, R. Rottapel, A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN-gamma-induced MHC class II expression in fibroblasts, *J Immunol*, 169 (2002) 5010-5020.
- [20] D. Metcalf, S. Mifsud, L. Di Rago, N.A. Nicola, D.J. Hilton, W.S. Alexander, Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 943-948.
- [21] D.V. Bullen, R. Darwiche, D. Metcalf, E. Handman, W.S. Alexander, Neutralization of interferon-gamma in neonatal SOCS1^{-/-} mice prevents fatty degeneration of the liver but not subsequent fatal inflammatory disease, *Immunology*, 104 (2001) 92-98.
- [22] K.D. Sutherland, G.J. Lindeman, D.Y. Choong, S. Wittlin, L. Brentzell, W. Phillips, I.G. Campbell, J.E. Visvader, Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas, *Oncogene*, 23 (2004) 7726-7733.
- [23] M. Suzuki, H. Shigematsu, N. Shivapurkar, J. Reddy, K. Miyajima, T. Takahashi, A.F. Gazdar, E.P. Frenkel, Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer, *Cancer Lett*, 242 (2006) 222-230.
- [24] G. Zardo, M.I. Tiirikainen, C. Hong, A. Misra, B.G. Feuerstein, S. Volik, C.C. Collins, K.R. Lamborn, A. Bollen, D. Pinkel, D.G. Albertson, J.F. Costello, Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors, *Nat Genet*, 32 (2002) 453-458.

- [25] T. Yoshida, H. Ogata, M. Kamio, A. Joo, H. Shiraishi, Y. Tokunaga, M. Sata, H. Nagai, A. Yoshimura, SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis, *J Exp Med*, 199 (2004) 1701-1707.
- [26] J. Strebovsky, P. Walker, R. Lang, A.H. Dalpke, Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus, *FASEB J*, 25 (2011) 863-874.

3.2.6 Legends

Figure 3.1 SOCS1 interacts with the TAD-II of p53. **A)** Schematic representation of the GST-hp53 fusion proteins used in B. Numbers indicate the p53 amino acids starting and ending every fragment. **B)** Autoradiography of $^{35}\text{[S]}$ -Flag-SOCS1 pull down with GST-hp53 TAD (amino acids 1-67), GST-hp53 TAD-I (amino acids 1-34) or GST-hp53 TAD-II (amino acids 35-67). Input is 50% of the amount of protein used for each pull down. Numbers 1-3 corresponds to constructs in A. **C)** H1299 cells were transiently cotransfected with an empty control vector or Flag-SOCS1 and an empty control vector, p53 or ΔNp53 . Cells lysates were immunoprecipitated with anti-p53 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 and anti-p53 antibodies. Immunoprecipitation against Cyclin A (CA) was used as a negative control.

Figure 3.2 Tryptophan 53 and phenylalanine 54 of p53 are important for its interaction with SOCS1. **A)** Schematic representation of the GST-hp53 fusion proteins used in B and C. Numbers indicate the p53 amino acids starting and ending every fragment. * indicates the amino acids mutated in each fragment. **B)** Autoradiography of $^{35}\text{[S]}$ -Flag-SOCS1 pull down with GST-hp53 TAD-II or different mutants of GST-hp53 TAD-II. Input is 50% of the amount of protein used for each pull down. Numbers 1-4 corresponds to constructs in A. **C)** GST-pull down assays as in B. Numbers 1, 2, 5, 6 and 7 corresponds to constructs in A.

Figure 3.3 SOCS1 interacts with transcription factors p63, p73 and E2F1. **A)** U2OS cells were transiently transfected with an empty control vector (V) or Flag-SOCS1 (S1). 24h after transfection, cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-p63 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody. Immunoprecipitation against CDK4 was used as a negative control. **B)** U2OS cells were transiently transfected with an empty control vector (V) or Flag-SOCS1 (S1). 24h after transfection, cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24 h. Cell

lysates were immunoprecipitated with anti-p73 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 antibody. Immunoprecipitation against Cyclin A (CA) was used as a negative control. C) U2OS cells were transiently transfected with an empty control vector (V) or Flag-SOCS1 (S1). 24h after transfection, cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-E2F1 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 and anti-E2F1 antibodies. Immunoprecipitation against CDK4 was used as a negative control.

Table 3.1 Identification of transcription factors which can potentially interact with SOCS1. Prosite descriptors were used to blast the GeneBank for proteins possessing the p53 sequence X(4)-I-X(2)-W-F-X(3) or variants of it where hydrophobic positions I, W or F were allowed to exchange one for each other. Amino acids highlighted are those that determine the structure of the motif shared by these factors.

Supplementary Figure 3.1 Δ Np53 overexpression in U2OS cells. Immunoblot of p53 in U2OS cells transiently transfected with an empty control vector (V) or Δ Np53 (Δ N). Bands corresponding to p53 full length (p53 FL) or to Δ Np53 are indicated.

Supplementary Figure 3.2 The interaction between SOCS1 and p53 does not depend of the residues that are important for its interaction with JAK2. U2OS cells were transiently transfected with an empty control vector (V), Flag-SOCS1 (S1) or different mutants of Flag-SOCS1 (S1-R110A, S1-R128A, S1-K119A and S1-K119E). 24h after transfection, cells were treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 24h. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-p53 antibody and immunoblotted with anti-SOCS1 or anti-p53 antibodies. Immunoprecipitation against Cyclin A (CA) was used as a negative control.

3.2.7 Figures

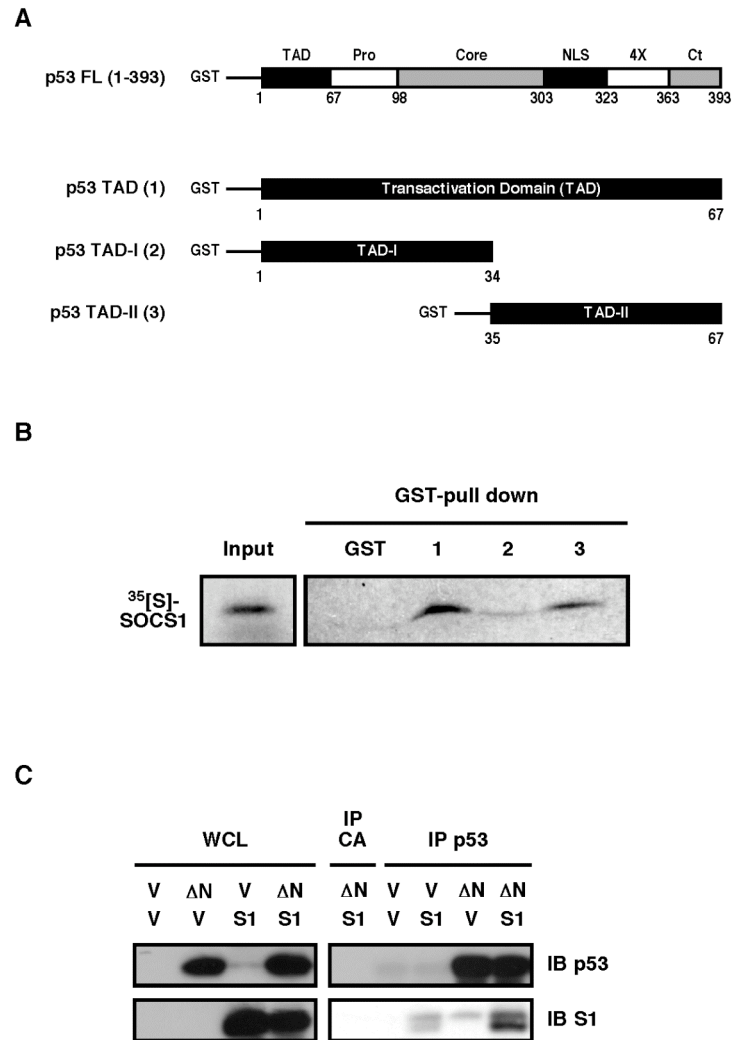


Figure 3.1 SOCS1 interacts with the TAD-II of p53.

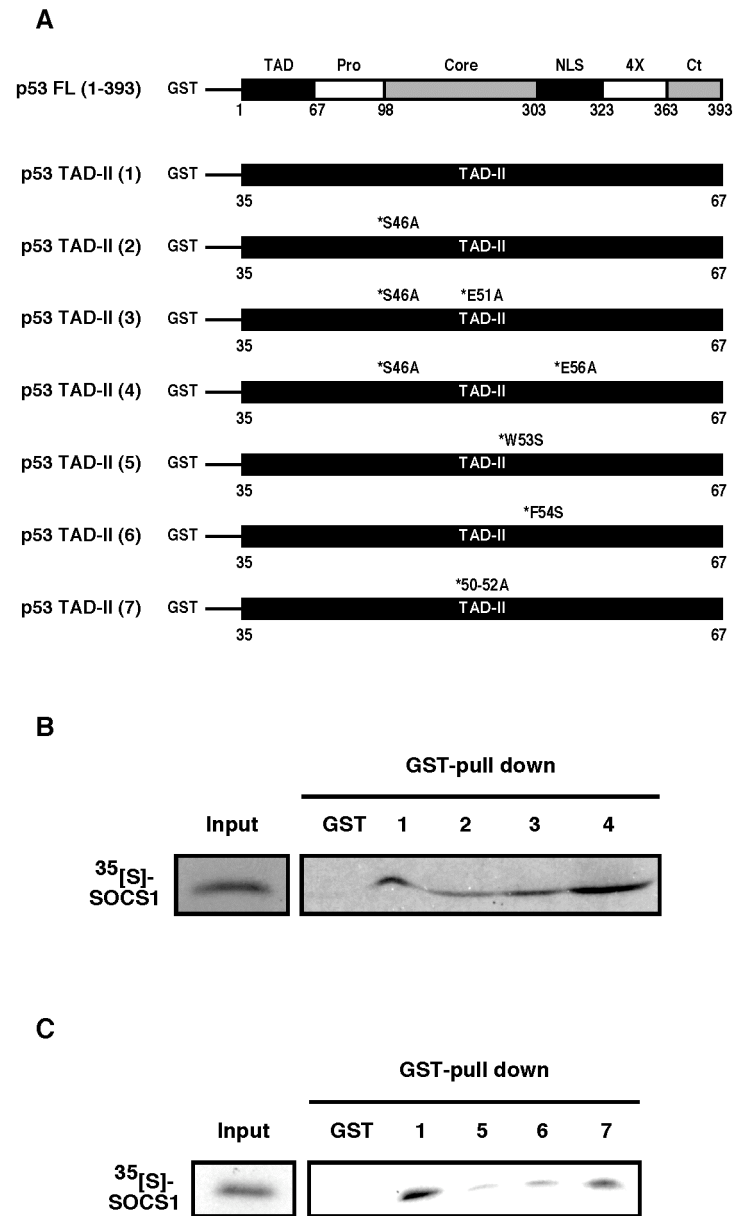


Figure 3.2 Tryptophan 53 and phenylalanine 54 of p53 are important for its interaction with SOCS1.

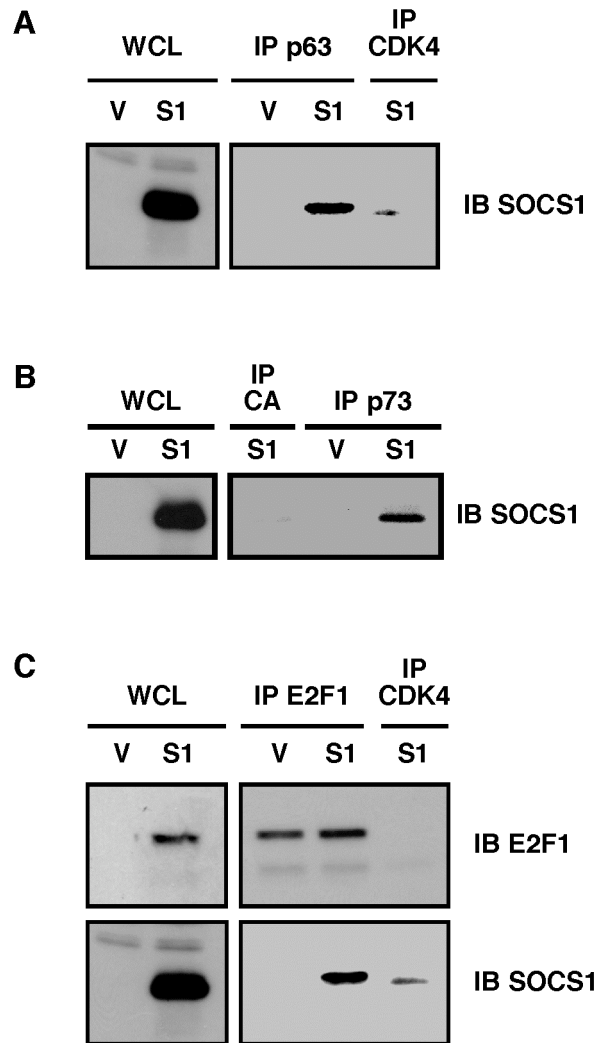
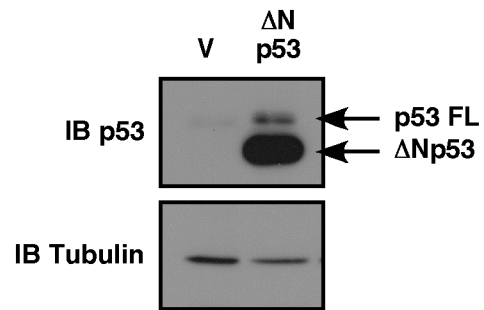


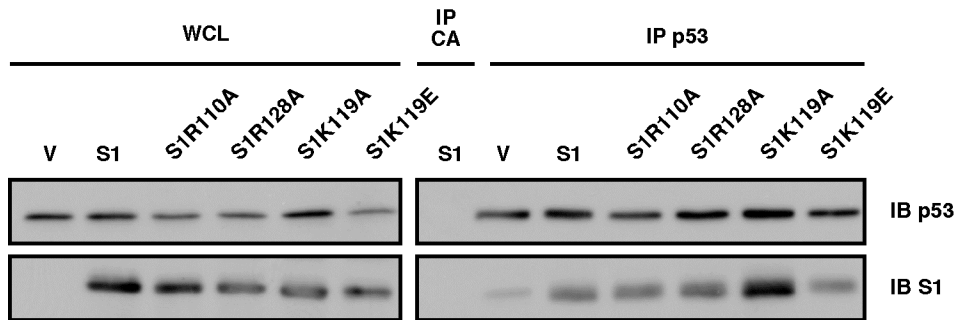
Figure 3.3 SOCS1 interacts with transcription factors p63, p73 and E2F1.

Table 3.1 Identification of transcription factors which could potentially interact with SOCS1.

Transcription Factor	Sequence	Position
CEBPZ	ALDTFKELLI TD	285-296
E2F1	EGEGIRD LFD CD	417-428
FOXM1	FGEGFSPLL PVQ	446-457
MYST3	FLIDFSYLLSKR	661-672
p65	ADMDFSALLSQI	538-549
p53	SPDDIEQWFTED	46-57
p63	SPEVFQHIWDFL	51-62
p73	GGTTFEHLWSSL	11-22
STAT1	ATIRFHDLLSQL	53-64
STAT2	AEMIFNLLLEEK	105-116
STAT3	ATLVFHNLLGEI	53-64
STAT6	CSALFKNLLLKK	356-367
Tax	SFHNLHLLFEEY	301-312
TAF2	MLQVFNKLLSLA	469-480



Supplementary Figure 3.1 ΔN p53 overexpression in U2OS cells.



Supplementary Figure 3.2 The interaction between SOCS1 and p53 does not depend of the residues that are important for its interaction with JAK2.

4 Discussion

Les mécanismes cellulaires anti-prolifératifs, lesquels comprennent l'apoptose, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et la sénescence, permettent à la cellule de prévenir l'accumulation de mutations pouvant conduire à une prolifération incontrôlée et, éventuellement, au développement d'une tumeur. La régulation de ces différents mécanismes requiert l'activation de protéines appelées des suppresseurs de tumeur, dont le principal est le facteur de transcription p53.

La sénescence, laquelle correspond à un arrêt permanent de la cellule en phase G1 du cycle cellulaire, permet, au même titre que l'apoptose, de freiner la prolifération de cellules qui expriment des oncogènes, tel H-RAS V12. Dans les dernières années, notre laboratoire a démontré que l'oncogène ca-STAT5A, lequel entraîne l'activation constitutive de la voie JAK/STAT, est en mesure d'induire la sénescence. En effet, bien que ca-STAT5A contribue au développement de différents cancers ^[297, 298], son expression, dans des cellules normales, provoque leur entrée en sénescence ^[145, 299]. La sénescence induite par ca-STAT5A requiert l'activation des suppresseurs de tumeur p53 et Rb ^[299], de même que l'activation de la voie du dommage à l'ADN ^[145].

Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de p53 dans le contexte de la sénescence induite par ca-STAT5A, une analyse sur micropuces d'ADN a été effectuée à partir de l'ARNm de fibroblastes humains normaux exprimant ca-STAT5A. Parmi les transcrits dont l'expression était la plus augmentée, celui correspondant à la protéine SOCS1 a retenu notre attention. SOCS1, une cible transcriptionnelle des STATs, est un régulateur négatif de la voie JAK/STAT et, par le fait même, contribue à la suppression tumorale de cellules soumises à une activation aberrante de la signalisation par les cytokines ^[233]. Cependant, le mécanisme précis par lequel SOCS1 assure sa fonction anti-tumorale n'a pas encore été décrit.

L'objectif général de cette thèse était de mettre en évidence l'importance de SOCS1 dans l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A et de décrire le

mécanisme par lequel SOCS1 mène à l'activation de p53. Cette thèse avait également pour but de démontrer l'implication de SOCS1 dans la régulation d'autres facteurs de transcription partageant un domaine de transactivation semblable à celui de p53.

Les prochains paragraphes sont consacrés à la discussion des résultats décrits dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse, de leur importance et de leur impact, de même que des perspectives qu'ils laissent envisager. Cependant, préalablement, un bref résumé de ces résultats est présenté.

4.1 Résumé des résultats décrits aux chapitres 3 et 4

Les résultats présentés dans cette thèse montrent un nouveau mécanisme d'activation du suppresseur de tumeur p53 par la protéine SOCS1, un inhibiteur de la signalisation par les cytokines. Ce mécanisme implique une interaction directe entre les deux protéines, plus précisément entre le domaine SH2 de SOCS1 et le domaine de transactivation de p53. En plus d'interagir avec p53, SOCS1 est également en mesure de recruter les kinases ATM et ATR par le biais, cette fois, de son domaine SOCS Box. Ainsi, en interagissant à la fois avec p53 et ATM, SOCS1 facilite la phosphorylation de p53 en sérine 15 par ATM et, par conséquent, elle contribue à sa stabilisation et à son activation.

L'importance du mécanisme d'activation de p53 par SOCS1 est mise en évidence dans le contexte de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A. En effet, l'inhibition de SOCS1 dans des fibroblastes humains normaux exprimant ca-STAT5A rend plus difficile leur entrée en sénescence et engendre une diminution de l'accumulation nucléaire de p53, de même qu'une baisse des niveaux de p53 phosphorylée en sérine 15. De la même façon, les cellules T provenant de souris *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}* sont moins aptes à déclencher une réponse apoptotique que celles provenant de souris *Socs1^{+/+}Ifn γ ^{+/+}* en réponse à des radiations. De plus, dans les cellules ca-STAT5A comme dans les cellules T des souris *Socs1^{-/-}Ifn γ ^{-/-}*, l'inhibition de SOCS1 conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle de p53.

En plus de contribuer à l'établissement de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A, SOCS1 est elle-même en mesure de provoquer l'entrée en sénescence de fibroblastes humains normaux. La sénescence induite par SOCS1 se caractérise par une activation de la voie du dommage à l'ADN et requiert l'activation de p53. En effet, la co-expression de SOCS1 avec un dominant négatif de p53 dans ces cellules empêche leur entrée en sénescence.

L'étude approfondie de l'interaction entre SOCS1 et p53 a permis d'identifier la région précise de p53 impliquée dans cette interaction. En fait, il apparaît que le TAD-II de p53 est suffisant pour interagir avec SOCS1. Plus précisément, les résidus W53 et F54 de cette région semblent particulièrement importants. Une analyse structurale d'une partie du TAD-II de p53 (acides aminés 41 à 56), laquelle contient les résidus W53 et F54, a permis d'identifier un motif conservé dans plusieurs autres facteurs de transcription, dont FOXM1 (en anglais, *forkhead box M1*), NFκB (en anglais, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), p63, p73 et E2F1. Ce motif contient une forte proportion de résidus acide glutamique et acide aspartique, ce qui contribue à en faire une région acide. De plus, ce motif se caractérise par la présence de trois résidus hydrophobes, lesquels sont déterminants pour la structure tridimensionnelle de cette région. SOCS1 est en mesure d'interagir avec plusieurs facteurs de transcription contenant ce motif, dont p63, p73 et E2F1. Ces résultats suggèrent que l'effet de SOCS1 sur p53 peut s'étendre à d'autres facteurs de transcription et, de ce fait, ils permettent de le qualifier de régulateur général des facteurs de transcription composés d'un domaine de transactivationn acide.

4.2 SOCS1, un nouveau régulateur de p53

Comme nous l'avons vu au premier chapitre, la principale fonction de SOCS1 est d'assurer la rétro-inhibition de la voie JAK/STAT en ciblant les JAKs vers la voie de la dégradation ^[233]. SOCS1 est également associée à la prévention du développement de certaines tumeurs et, de ce fait, elle agit comme un suppresseur de tumeur ^[233]. Bien que plusieurs études se soient intéressées à l'activité anti-tumorale de SOCS1, aucun

mécanisme précis expliquant comment elle agit en tant que suppresseur de tumeur n'a encore été décrit.

Les résultats présentés dans le premier article de cette thèse (chapitre 2) mettent en évidence un mécanisme d'activation de p53 par SOCS1 et, par conséquent, permettent d'expliquer comment elle est en mesure de contribuer à la prévention contre la transformation maligne. En effet, en reliant la voie JAK/STAT à celle de p53, SOCS1 facilite la réponse anti-tumorale suite à une activation aberrante de la signalisation par les cytokines. De ce fait, SOCS1 n'apparaît plus uniquement comme un régulateur négatif des JAKs, mais aussi comme un activateur de la voie de p53.

L'identification de SOCS1 en tant que régulateur de p53 contribue à la caractérisation de ce suppresseur de tumeur et, par le fait même, permet une meilleure compréhension des mécanismes anti-tumoraux. Impliquée dans une multitude de voies de signalisation, p53 est une protéine complexe capable d'induire diverses réponses cellulaires anti-prolifératives. L'étude de p53 dans différents contextes permet de mettre en évidence les différentes protéines responsables de sa régulation et, par le fait même, facilite le contrôle de son activité. De plus, la caractérisation de nouveaux régulateurs de p53 contribue à l'élaboration de nouvelles stratégies pour la prévention de la transformation maligne. Ainsi, l'identification de SOCS1 comme régulateur de p53 et la caractérisation du mécanisme par lequel elle est en mesure d'activer ce suppresseur de tumeur apparaît comme une avancée considérable pour la compréhension de la transformation maligne découlant d'une activation aberrante de la signalisation par les cytokines.

4.3 SOCS1 agit comme un interrupteur moléculaire

Le mécanisme d'activation de p53 par SOCS1 décrit dans cette thèse suggère que, selon le contexte dans lequel la cellule se trouve, SOCS1 est impliquée dans la régulation de différentes voies de signalisation. En effet, en réponse à une signalisation normale de la voie JAK/STAT, SOCS1 agit en tant que régulateur négatif de la voie en inhibant l'activité

des JAKs et en les ciblant pour la dégradation. Cependant, lorsque la signalisation par les cytokines devient aberrante, comme dans le cas d'une activation constitutive de STAT5A, SOCS1 est également en mesure de recruter ATM et p53 afin de faciliter la stabilisation et l'activation de cette dernière.

Le fait que SOCS1, selon le contexte cellulaire, puisse réguler deux voies de signalisation distinctes suggère qu'elle agit comme un interrupteur moléculaire. Plus précisément, on peut imaginer que SOCS1, en réponse à certains signaux (un stress oncogénique, par exemple), subisse une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation ou l'ubiquitination, lesquelles lui permettent alors de passer d'une fonction à l'autre.

Plusieurs groupes ont déjà démontré que SOCS1 peut être phosphorylée et, de façon générale, cette phosphorylation est associée à la transformation maligne. Par exemple, dans une de ces études, Limnander et al. montrent que la phosphorylation de SOCS1 vient perturber son interaction avec le complexe Elongin B/C et, par le fait même, qu'elle l'empêche de cibler les JAKs vers la voie de la dégradation^[301]. Cette inhibition de SOCS1 tend à expliquer le mécanisme par lequel l'expression de l'oncogène v-Abl dans des cellules pré-B de souris conduit à leur transformation. Dans une autre étude, Chen et al. montrent que la phosphorylation de SOCS1 est en partie assurée par les sérine/thréonine kinases PIM1 et PIM2, lesquelles sont requises pour la transformation de cellules pré-B de souris en réponse à l'oncogène v-Abl^[302]. Ainsi, il semble que la phosphorylation de SOCS1, laquelle l'empêche d'interagir avec l'Elongin B/C et d'agir comme rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT, facilite la transformation maligne par des oncogènes qui dépendent de l'activation des JAKs, tel v-ABL.

Les résultats présentés dans le premier article de cette thèse tendent à démontrer la capacité de SOCS1 à freiner la prolifération de cellules soumises à une activation constitutive de la voie JAK/STAT en facilitant la stabilisation et l'activation de p53 par ATM. En se basant sur les études de Limnander et al. et Chen et al., on peut supposer que

la phosphorylation de SOCS1 contribue à la transformation maligne non seulement en l'empêchant d'inhiber les JAKs, mais également en l'empêchant d'interagir avec p53 et ATM. De ce fait, la présence de kinases oncogéniques, comme PIM1 et PIM2, serait indispensable pour assurer la phosphorylation de SOCS1 et, par le fait même, pour assurer son inhibition.

Il semble donc peu probable que la phosphorylation de SOCS1 puisse être à l'origine de son rôle d'activateur de la voie de p53. Cependant, aucune des études sur la phosphorylation de SOCS1 n'a identifié les résidus précis de la protéine qui sont phosphorylés. On peut alors supposer que, selon le contexte cellulaire, différentes kinases capables de phosphoryler SOCS1 sont activées. Ces kinases, de par leur nature, cibleraient différents résidus dans la protéine, ce qui engendrerait des patrons de phosphorylation de SOCS1 distincts et, par le fait même, viendrait modifier sa fonction. Par exemple, certaines phosphorylations, comme celles effectuées par PIM1 et PIM2, provoquent une perte de fonction de SOCS1, tant au niveau de son rôle d'inhibiteur de la voie JAK/STAT que de celui d'activateur de p53. Cependant, d'autres phosphorylations, cette fois assurées par des kinases associées à une réponse anti-tumorale, comme dans le cas de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A, pourraient venir modifier SOCS1 de façon à la faire passer spécifiquement de la voie JAK/STAT vers la voie de p53.

Pour ce qui de l'acétylation et de l'ubiquitination potentielles de SOCS1, elles n'ont encore jamais vraiment été étudiées. Comme il l'a été mentionné au chapitre 1, SOCS1 est une protéine très instable ^[273] et, par le fait même, il est fort probable qu'elle soit ubiquitinée et dégradée par la voie du protéasome ^[274-277]. Cependant, on ne trouve qu'un seul résidu lysine dans les séquences de SOCS1 humaine et murine et, par conséquent, les possibilités d'ubiquitination et d'acétylation sont limitées.

Une étude approfondie des modifications post-traductionnelles de SOCS1 est donc de mise pour une meilleure compréhension de ces différentes fonctions. En fait, au cours de la dernière année de ce doctorat, une analyse par spectrométrie de masse a été entreprise

afin d'identifier des modifications post-traductionnelles potentielles auxquelles SOCS1 pourrait être sujette. Cependant, malgré plusieurs tentatives, il n'a jamais été possible d'obtenir SOCS1 purifiée en quantité suffisante pour ce genre d'analyse et, par conséquent, aucune modification post-traductionnelle n'a encore été identifiée par cette méthode. Il demeure que l'expérience est prometteuse pour la compréhension de la fonction de SOCS1 et, de ce fait, l'optimisation de sa purification s'impose.

4.4 Le complexe p53/SOCS1/ATM : cytoplasmique ou nucléaire ?

La nouvelle fonction de SOCS1 décrite dans cette thèse implique que cette dernière peut agir dans d'autres compartiments cellulaires que le cytoplasme. En effet, le fait que p53 et ATM soient des protéines nucléaires suggère que SOCS1 peut transloquer au noyau. D'ailleurs, les résultats présentés au chapitre 2 montrent clairement que SOCS1 se trouve au noyau et ce, dans différents contextes. Aussi, comme il l'a été mentionné au chapitre 1, ces résultats sont en accord avec ceux du groupe de Baetz et al., lequel a identifié un NLS dans SOCS1 [295].

Bien que la localisation nucléaire de SOCS1 ait été démontrée, le mécanisme par lequel cette translocation s'effectue n'a pas encore été mis en évidence. Aussi, même s'il est plus probable que SOCS1 interagisse avec ATM et p53 dans le noyau, il demeure possible que ces interactions se fassent plutôt dans le cytoplasme. Par exemple, SOCS1 pourrait faciliter l'importation nucléaire de p53 et, ainsi, favoriser son activation par ATM non seulement en facilitant l'interaction entre les deux protéines, mais aussi en induisant son accumulation nucléaire. La réalisation d'expériences permettant de séparer les noyaux et le cytoplasme démontrerait dans quel compartiment cellulaire, le cytoplasme ou le noyau, l'interaction entre SOCS1 et ATM et celle entre SOCS1 et p53 ont lieu. En effet, en effectuant des co-immunoprécipitations pour chacune de ces interactions à partir d'extraits

protéiques provenant uniquement du cytoplasme ou des noyaux, il serait possible de déterminer à la fois le lieu de ces interactions et la séquence des événements.

Comme il l'a été discuté plus tôt, il est probable que la capacité de SOCS1 de passer d'une fonction à une autre découle d'une modification post-traductionnelle. En fait, cette modification post-traductionnelle pourrait être à l'origine de la translocation nucléaire de SOCS1 et, par conséquent, elle pourrait expliquer comment SOCS1 est en mesure d'activer p53. Encore une fois, l'identification de l'événement responsable du changement de fonction de SOCS1 dans la cellule est requise pour une meilleure compréhension de son mécanisme d'activation de p53.

4.5 SOCS1 comme activateur de p53 : un rôle indépendant ou complémentaire de sa fonction de rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT ?

Les résultats présentés dans l'article 1 de cette thèse ne permettent pas de déterminer si les deux fonctions de SOCS1 (inhibiteur de la voie JAK/STAT et activateur de p53 et de la sénescence) peuvent se faire simultanément ou, au contraire, si elles sont mutuellement exclusives. Cependant, le fait que le mutant SOCS1R105E, lequel n'est plus en mesure d'interagir avec les JAKs ^[253, 255], interagisse avec p53 et induise un arrêt de prolifération indique que l'activation de p53 par SOCS1 est indépendante de la voie JAK/STAT. Toutefois, il demeure possible qu'en réponse à une activation constitutive de la signalisation par les cytokines, une certaine population de SOCS1 demeure active comme inhibiteur de la voie JAK/STAT, alors que le reste se mobilise pour le recrutement d'ATM et p53. Encore une fois, l'éventualité d'une modification post-traductionnelle dans SOCS1 qui lui permet d'interagir avec p53 et ATM est possible.

4.6 Le SOCS box : un domaine à plusieurs fonctions

Dans les dernières années, les études sur le SOCS box ont permis de démontrer sa capacité de recruter les complexes Elongin B/C et Cullin/RBX de façon à permettre aux protéines qui le contiennent de recruter la machinerie d'ubiquitination nécessaire à la dégradation de protéines cibles [235]. Cependant, le mécanisme décrit dans cette thèse porte à croire que le SOCS box n'est pas restreint à cette fonction. En effet, dans le contexte d'une activation aberrante de la signalisation par les cytokines, le SOCS box est en mesure d'interagir avec les kinases ATM et ATR, et ce, indépendamment de son interaction avec l'Elongin B/C et les Cullins. Une expérience dont les résultats n'apparaissent pas dans cette thèse a permis de démontrer que l'interaction entre SOCS1 et ATM requiert la région BC du SOCS box. De plus, l'Elongin C ne se trouve pas dans le complexe formé par SOCS1 et ATM, ce qui tend à démontrer qu'il y a une compétition entre l'Elongin C et ATM pour le SOCS box. Les éléments qui déterminent le choix de SOCS1 de former un complexe avec l'Elongin B/C et les Cullins ou, plutôt, avec ATM, ne sont pas clairs. Encore une fois, il est possible que, selon le contexte cellulaire, SOCS1 subisse des modifications post-traductionnelles en mesure de favoriser la formation d'un des deux complexes au détriment de l'autre. Cependant, il se peut également qu'en réponse à un signal oncogénique, l'accumulation d'ATM dans la cellule en vienne à compétitionner plus facilement contre l'Elongin C. Dans tous les cas, la mise en évidence du mécanisme par lequel SOCS1 passe d'un complexe d'E3 ligase à celui d'activateur de p53 s'impose.

4.7 L'implication de SOCS1 dans la voie du dommage à l'ADN

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que SOCS1, en plus d'interagir avec p53, est en mesure de recruter les kinases du dommage à l'ADN ATM et ATR. De cette façon, elle facilite la phosphorylation de p53 en sérine 15 par ATM et agit alors à titre de médiateur. De plus, SOCS1 co-localise avec ATM phosphorylée en S1981 aux sites de dommage à l'ADN lors de la sénescence induite par l'oncogène ca-STAT5A, ce qui tend à démontrer son implication dans la DDR.

Le fait que SOCS1 soit capable de recruter ATM afin de faciliter la phosphorylation de p53 suggère qu'elle pourrait interagir avec plusieurs autres substrats d'ATM et d'ATR. En accord avec cette hypothèse, une analyse par spectrométrie de masse effectuée suite à l'immunoprécipitation de SOCS1 surexprimée dans des cellules humaines a permis d'identifier plusieurs partenaires d'interaction potentiels impliqués dans la DDR, la réponse apoptotique et le contrôle du stress oxydatif (voir Tableau 4.1). Dans la dernière année, l'interaction entre SOCS1 et TRIM28 (en anglais, *tripartite motif containing 28*, aussi connue sous le nom de KAP1) a été validée par co-immunoprécipitation dans notre laboratoire. TRIM28 est un co-répresseur transcriptionnel qui agit en liant le domaine KRAB (en anglais, *Kruppel-associated box*) contenu dans plusieurs facteurs de transcription [303-305]. Récemment, il a été démontré qu'ATM phosphoryle TRIM28 au niveau de sa sérine 824 de façon à l'inhiber [306]. Cette inhibition de TRIM28 par ATM a pour but de favoriser la décondensation de la chromatine suite à un dommage à l'ADN de façon à ce que la machinerie de réparation ait facilement accès à l'ADN endommagé [306]. Bien que l'étude d'interaction entre SOCS1 et TRIM28 n'en soit encore qu'à ses débuts, elle laisse supposer que SOCS1 pourrait contribuer à la réparation de l'ADN en facilitant la phosphorylation de TRIM28 par ATM. Ainsi, SOCS1, en plus de contribuer à l'activation de p53 par ATM, serait en mesure de faciliter l'interaction entre ATM et plusieurs de ces substrats et, par le fait même, de participer à différentes étapes de la DDR.

Tableau 4.1 Identification, par spectrométrie de masse, de nouveaux partenaires d'interaction de SOCS1*.

Protéine	Fonction
SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (SHC1)	SHC1 est un membre de la famille des protéines Shc, des adaptateurs moléculaires. Elle favorise la réponse apoptotique grâce à son activité redox et elle est impliquée dans le contrôle du stress oxydatif et dans la régulation de la longévité chez les mammifères.
Tripartite motif-containing 28 (TRIM28 or KAP1)	TRIM28 est impliquée dans le contrôle de la transcription grâce à sa capacité d'interagir avec le domaine de répression transcriptionnelle <i>Kruppel-associated box</i> . TRIM28 est également impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN.
5'-nucleotidase, cytosolic II (NT5C2)	NT5C2 hydrolyse le 5-prime-monophosphate (IMP) et d'autres nucléotides purines. NT5C2 est impliquée dans le maintien d'une composition intracellulaire constante des nucléotides purines et pyrimidines.
BCL2-associated transcription factor 1 (BCLAF1)	BCLAF1, un répresseur transcriptionnel qui interagit avec les membres de la famille de protéines BCL2, favorise l'apoptose.

* L'analyse LC-MS/MS a été effectuée à partir de 3XFlag-SOCS1 surexprimé dans des cellules U2OS et immunoprécipité deux jours après la transfection à l'aide de l'ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma). La totalité de l'immunoprécipité a été envoyée à la plateforme de protéomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC, Montréal, Canada; www.irc.ca) pour l'analyse.

4.8 SOCS1, un régulateur commun à plusieurs facteurs de transcription

L'étude du mécanisme d'activation de p53 par SOCS1 a permis de démontrer que les deux protéines sont en mesure d'interagir de façon directe. En poussant davantage l'analyse de cette interaction, il a été possible d'identifier les domaines de chaque protéine impliqués, de même que certains acides aminés essentiels à l'interaction. Plus précisément, le TAD-II de p53 suffit pour interagir avec le domaine SH2 de SOCS1 et les résidus W53 et F54 de p53 semblent essentiels pour maintenir l'interaction.

Le fait que SOCS1 puisse interagir avec le TAD-II de p53 implique que l'interaction est indépendante de la présence de résidus tyrosine, comme c'est le cas pour son interaction avec VAV1 ^[266]. En effet, le TAD-II de p53 n'en contient aucun, ce qui suggère que l'interaction entre SOCS1 et p53 repose sur des bases moléculaires différentes de celles normalement observées entre SOCS1 et ses protéines cibles. En accord avec ces hypothèses, nous avons démontré que le mutant SOCS1R105E, lequel perd la capacité d'interagir avec JAK2, est en mesure d'interagir avec p53. Aussi, la mutation d'autres résidus arginine de SOCS1 normalement impliqués dans l'interaction avec ses protéines cibles, notamment les résidus R110 et R128, n'affecte elle non plus l'interaction avec p53.

Les expériences qui ont permis de démontrer l'importance des acides aminés hydrophobes W53 et F54 pour l'interaction entre SOCS1 et p53 ont conduit à la mise en évidence d'un motif dans le TAD-II de p53, lequel est conservé dans le TAD de plusieurs autres facteurs de transcription. Comme il a été démontré dans le deuxième article de cette thèse, SOCS1 est en mesure d'interagir avec au moins trois de ces facteurs, lesquels correspondent à p63, p73 et E2F1. Aussi, dans la dernière année, deux autres de ces facteurs de transcription, NFκB et Tax, ont été identifiés comme des nouveaux partenaires d'interaction de SOCS1. Plus précisément, Strebovsky et al. ont démontré que SOCS1 contribue à l'ubiquitination de la sous-unité p65 de NFκB afin qu'elle soit dégradée par la voie du protéasome ^[307], alors que Charoenthongtrakul et al. ont montré que l'interaction de l'oncoprotéine virale Tax avec SOCS1 engendre la stabilisation de cette dernière de façon à réduire la réponse cellulaire anti-virale suite à une infection par le virus T-lymphotropique humain-1 (HTLV-1, en anglais, pour *human T cell leukemia virus type 1*) ^[308].

NFκB est un facteur de transcription qui joue un rôle dans la réponse inflammatoire et dans la réponse immunitaire innée et acquise ^[309]. Son activation à long terme mène à une réponse immunitaire excessive et par le fait même, à une inflammation chronique des tissus ^[309]. NFκB est également impliquée dans le développement et la progression de plusieurs types de cancer ^[310]. Plus précisément, elle est activée dans les cellules qui en viennent à former des tumeurs malignes, de même que dans celles qui sont recrutées dans le

microenvironnement des tumeurs ^[310]. Le fait que SOCS1 inhibe NFκB concorde avec sa fonction anti-tumorale et apparaît comme un événement qui permet de bloquer la transformation maligne. De plus, dans l'étude de Strebovsky et al., il est démontré que l'interaction entre SOCS1 et p65 fait intervenir le domaine SH2 de SOCS1, comme pour l'interaction avec p53, et qu'elle a lieu dans le noyau. Cependant, l'inhibition de p65 par SOCS1 requiert son activité d'E3 ubiquitine ligase, ce qui, comme nous l'avons vu plus tôt, n'est pas le cas pour sa régulation de p53.

La protéine virale Tax, laquelle est encodée par le HTLV-1, est un facteur de transcription essentiel pour la pathogénèse induite par ce virus. Plus précisément, elle assure la dérégulation de plusieurs voies de signalisation afin d'empêcher la cellule infectée d'enclencher une réponse anti-virale ^[311, 312]. Il y a quelques années, il a été démontré que Tax induit l'activation constitutive de NFκB afin de faciliter la transformation des cellules T ^[313]. Ainsi, Tax, en plus de faciliter l'infection des lymphocytes T par le HTLV-1, contribue également à leur transformation maligne. Dans leur étude, Charoenthongtrakul et al. démontrent que, dans des cellules T transformées par le HTLV-1, Tax interagit avec SOCS1 de façon à prévenir sa dégradation. SOCS1 stabilisée par Tax inhibe la signalisation par les interférons et, par le fait même, contribue à l'inhibition de la réponse anti-virale. Ainsi, dans certains contextes, il semble que la stabilisation de SOCS1 puisse contribuer à la transformation maligne.

Le fait que SOCS1 interagisse avec p63, p73 et E2F1 permet de formuler de nouvelles hypothèses quant à la fonction anti-tumorale de SOCS1. Par exemple, selon certaines études, p63 serait un régulateur négatif de la sénescence cellulaire ^[314], ce qui tend à suggérer que SOCS1 pourrait favoriser sa dégradation, comme c'est le cas pour p65. Pour sa part, E2F1, bien qu'elle soit associée à la prolifération cellulaire, est également en mesure d'induire l'entrée des cellules en apoptose, et ce, de manière dépendante ou indépendante de p53 ^[315]. On peut donc imaginer que SOCS1, selon un mécanisme semblable à ce qui est démontré dans cette thèse, facilite l'activation de E2F1 de façon à déclencher une réponse anti-proliférative. Cependant, des expériences permettant

d'identifier les domaines précis impliqués dans chacune de ces interactions sont requises pour mieux comprendre de quelle façon SOCS1 régule ces facteurs de transcription. Aussi, afin de pouvoir affirmer avec certitude que le motif qu'elles partagent avec p53 est bien à la base de leur interaction avec SOCS1, des expériences démontrant une perte d'interaction suite à la mutation des acides aminés hydrophobes contenus dans ce motif sont nécessaires.

4.9 SOCS1 est impliquée dans le développement de maladies chroniques associées au vieillissement

Les résultats présentés dans cette thèse soutiennent que SOCS1 agit comme un suppresseur de tumeur capable d'activer la voie de p53 afin de déclencher une réponse cellulaire anti-proliférative comme la sénescence. Cependant, SOCS1 est également impliquée dans le développement de maladies chroniques associées au vieillissement, tel le diabète de type II et le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique résulte d'une accumulation de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles prédisposent à l'obésité, à une résistance à l'insuline, à l'hypertension et à une hyperlipidémie ^[316, 317]. L'expression de SOCS1 est augmentée par un bon nombre de ces cytokines et, par conséquent, ces niveaux sont élevés dans des souris obèses résistantes à l'insuline ^[318]. Aussi, sa suppression dans le foie de ces souris rétablit la sensibilité à l'insuline et réduit l'hyperlipidémie, ce qui tend à démontrer que l'expression constitutive de SOCS1 est néfaste pour la cellule ^[318].

L'implication de SOCS1 dans le développement du syndrome métabolique contraste avec son activité anti-tumorale. Cependant, sa capacité d'activer la voie de p53 et de contribuer à la DDR pourrait expliquer de quelle façon son expression constitutive peut nuire au fonctionnement normal d'un tissu. En effet, en favorisant l'entrée en sénescence des cellules, SOCS1 contribue au SASP et, par le fait même, à l'inflammation chronique des tissus. En fait, on peut imaginer que la fonction de SOCS1 en tant que régulateur de p53 peut avoir un effet bénéfique ou néfaste selon l'état de la cellule dans laquelle il agit, ce qui rejoint la théorie de la pléiotropie antagoniste dont nous avons déjà

parlé au chapitre 1. En effet, on peut supposer que, dans un jeune organisme, l'activation de la voie de p53 par SOCS1 a un effet anti-tumoral. Cependant, à mesure qu'un organisme vieillit, l'accumulation de facteurs pro-inflammatoires dans les tissus engendre l'expression constitutive de SOCS1, laquelle contribue alors à une dérégulation de la voie des cytokines. Ainsi, l'expression et la fonction de SOCS1 nécessitent d'être finement régulées afin d'éviter qu'elle ne contribue à certaines maladies chroniques associées au vieillissement.

Comme nous venons de le voir, SOCS1 est impliquée dans le développement de maladies associées au vieillissement, tel le syndrome métabolique. Afin de pouvoir traiter cette pathologie, il serait intéressant de concevoir un peptide capable de bloquer l'interaction entre SOCS1 et p53 de façon à empêcher l'accumulation de cellules sénescentes et, par le fait même, à réduire la détérioration des tissus atteints.

4.10 Conclusion générale

En terminant, les résultats présentés dans cette thèse mettent en évidence une nouvelle fonction de la protéine SOCS1, laquelle était jusqu'alors essentiellement connue comme rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT. Plus précisément, SOCS1, suite à l'activation constitutive de la voie JAK/STAT dans des cellules normales, est en mesure de former un complexe avec les protéines ATM et p53 afin de faciliter la stabilisation et l'activation de cette dernière. L'activation de la voie de p53 par SOCS1 signifie qu'elle contribue à l'entrée en sénescence de ces cellules de façon à ce qu'elles puissent se protéger contre la transformation maligne.

Ainsi, selon le contexte cellulaire, SOCS1 est en mesure de jouer des rôles distincts. En effet, en réponse à une signalisation par les cytokines normale, SOCS1 agit en tant que régulateur négatif des JAKs. Cependant, lorsque cette signalisation devient aberrante, comme dans le cas de l'expression de l'oncogène ca-STAT5A, SOCS1 est alors en mesure d'activer la voie de p53 (Figure 4.1).

Ces résultats sont significatifs puisque, d'une part, ils mettent en évidence un nouveau régulateur de la voie de p53 et, d'autre part, parce qu'ils viennent confirmer la fonction anti-tumorale de SOCS1. De plus, le mécanisme décrit dans cette thèse vient appuyer l'idée selon laquelle SOCS1 peut transloquer au noyau, et non uniquement dans le cytoplasme, ce qui suggère qu'elle pourrait réguler plusieurs protéines autres que celles impliquées dans la régulation de la voie JAK/STAT. En accord avec cette hypothèse, la dernière année a permis de démontrer la capacité de SOCS1 d'interagir avec d'autres facteurs de transcription, tels p63, E2F1, NFκB et Tax, de même que d'autres protéines impliquées dans la voie du dommage à l'ADN, tel TRIM28.

Enfin, le fait que SOCS1 puisse, selon l'état de la cellule, contribuer à la protection contre la transformation maligne ou, au contraire, favoriser le développement de maladies chroniques associées au vieillissement, tend à le considérer comme une protéine qui agit

selon la théorie de la pléiotropie antagoniste. De ce fait, l'étude approfondie de ses différentes fonctions est nécessaire afin d'en arriver à moduler son activité de façon à favoriser son rôle de suppresseur de tumeur ou, au contraire, à empêcher sa contribution au développement de maladies chroniques.

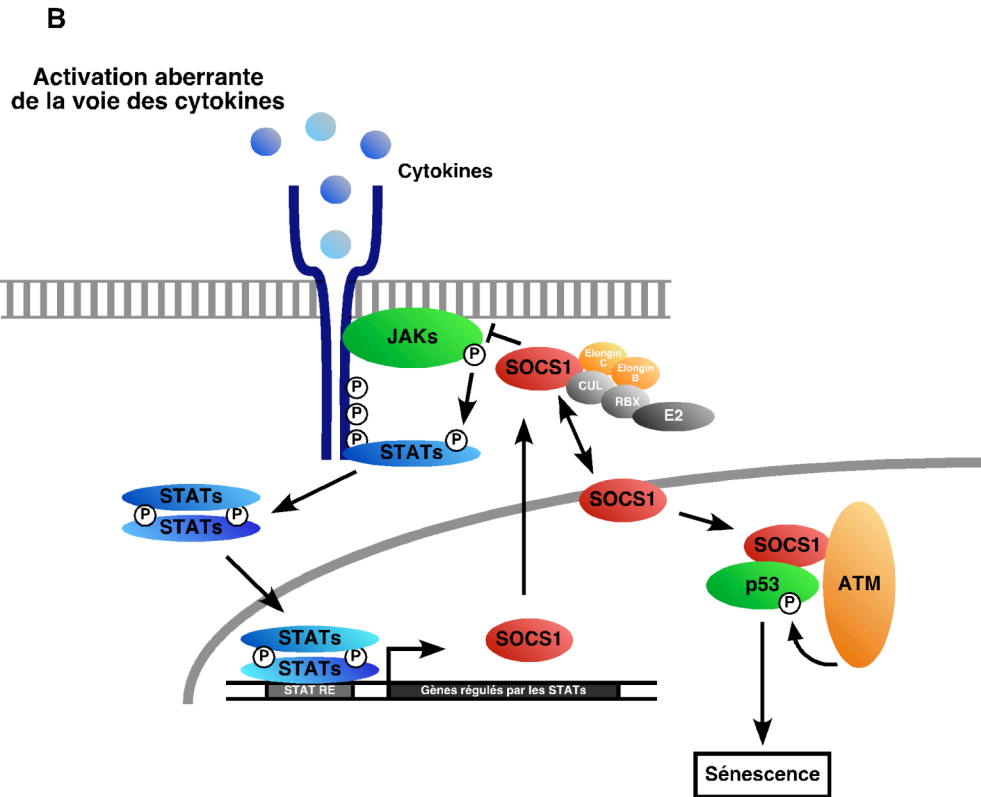
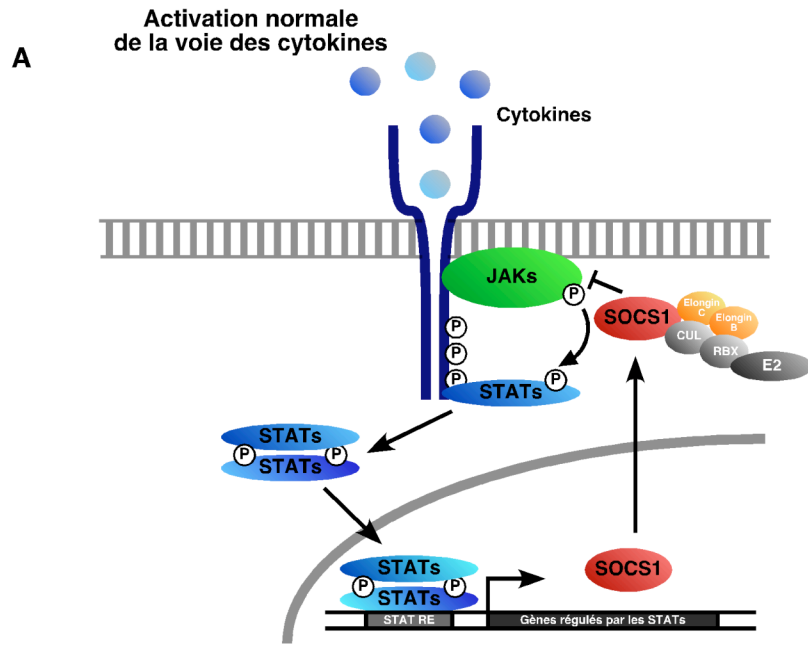


Figure 4.1 Modèle décrivant les différentes fonctions de SOCS1 selon le contexte cellulaire.

Lorsque la signalisation par les cytokines est normale, SOCS1 agit en tant que rétro-inhibiteur de la voie JAK/STAT (**A**). Cependant, lorsqu'une cellule est soumise à une activation aberrante ou constitutive de la signalisation par les cytokines, SOCS1 subit un changement moléculaire qui lui permet d'interagir avec ATM et p53 afin de faciliter l'activation de cette dernière et, par le fait même, de déclencher l'entrée en sénescence de la cellule (**B**).

Bibliographie

- [1] Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):307-15.
- [2] Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Nov;1(5):a001883.
- [3] Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J. Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice. *DNA repair*. 2006 Jan 5;5(1):52-60.
- [4] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
- [5] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.
- [6] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31.
- [7] Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Jun;2(6):a000919.
- [8] Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec;1(6):a000950.
- [9] Harms KL, Chen X. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell death and differentiation*. 2006 Jun;13(6):890-7.
- [10] Zhu J, Zhou W, Jiang J, Chen X. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 22;273(21):13030-6.
- [11] Zhu J, Zhang S, Jiang J, Chen X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Dec 22;275(51):39927-34.
- [12] Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*. May 13;145(4):571-83.

- [13] Gamper AM, Roeder RG. Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Molecular and cellular biology*. 2008 Apr;28(8):2517-27.
- [14] Hammond EM, Mandell DJ, Salim A, Krieg AJ, Johnson TM, Shirazi HA, et al. Genome-wide analysis of p53 under hypoxic conditions. *Molecular and cellular biology*. 2006 May;26(9):3492-504.
- [15] Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*. 2000;77:81-137.
- [16] Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science (New York, NY)*. 1994 Jul 15;265(5170):346-55.
- [17] Chene P. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. 2001 May 10;20(21):2611-7.
- [18] McLure KG, Lee PW. How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO journal*. 1998 Jun 15;17(12):3342-50.
- [19] Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N, Rabinovich D, Shaulov L, Haran TE, et al. Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Molecular cell*. 2006 Jun 23;22(6):741-53.
- [20] Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Aug;2(8):a000935.
- [21] el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*. 1992 Apr;1(1):45-9.
- [22] Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular and cellular biology*. 1992 Jun;12(6):2866-71.
- [23] Espinosa JM. Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene*. 2008 Jul 3;27(29):4013-23.
- [24] Espinosa JM, Verdun RE, Emerson BM. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Molecular cell*. 2003 Oct;12(4):1015-27.
- [25] Shaked H, Shiff I, Kott-Gutkowski M, Siegfried Z, Haupt Y, Simon I. Chromatin immunoprecipitation-on-chip reveals stress-dependent p53 occupancy in primary normal cells but not in established cell lines. *Cancer research*. 2008 Dec 1;68(23):9671-7.

- [26] Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol.* 1994 Oct 1;4(10):865-75.
- [27] Halazonetis TD, Kandil AN. Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *The EMBO journal.* 1993 Dec 15;12(13):5057-64.
- [28] McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Molecular cell.* 2004 Nov 5;16(3):413-24.
- [29] An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell.* 2004 Jun 11;117(6):735-48.
- [30] Gevry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes & development.* 2007 Aug 1;21(15):1869-81.
- [31] Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature.* 1997 Jun 19;387(6635):823-7.
- [32] Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell.* 1997 Jun 27;89(7):1175-84.
- [33] Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):595-606.
- [34] Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E, et al. CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer research.* 1997 Sep 1;57(17):3693-6.
- [35] Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, et al. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Molecular cell.* 2001 Dec;8(6):1243-54.
- [36] Candau R, Scolnick DM, Darpino P, Ying CY, Halazonetis TD, Berger SL. Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene.* 1997 Aug 14;15(7):807-16.
- [37] Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, et al. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992 Dec 15;89(24):12028-32.
- [38] Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science (New York, NY).* 1995 Jan 6;267(5194):100-4.

- [39] Chen X, Farmer G, Zhu H, Prywes R, Prives C. Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes & development*. 1993 Oct;7(10):1837-49.
- [40] Liu X, Miller CW, Koeffler PH, Berk AJ. The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighboring p53 domain inhibits transcription. *Molecular and cellular biology*. 1993 Jun;13(6):3291-300.
- [41] Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL, Prives C. Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Molecular and cellular biology*. 1996 Aug;16(8):4295-304.
- [42] Xing J, Sheppard HM, Corneillie SI, Liu X. p53 Stimulates TFIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Molecular and cellular biology*. 2001 Jun;21(11):3652-61.
- [43] Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development*. 1996 May 1;10(9):1054-72.
- [44] Li AG, Piluso LG, Cai X, Gadd BJ, Ladurner AG, Liu X. An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Molecular cell*. 2007 Nov 9;28(3):408-21.
- [45] Yaron I, Yaron R, Oluwole SF, Hardy MA. UVB irradiation of human-derived peripheral blood lymphocytes induces apoptosis but not T-cell anergy: additive effects with various immunosuppressive agents. *Cellular immunology*. 1996 Mar 15;168(2):258-66.
- [46] Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remele J, Toussaint O. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002 Nov;34(11):1331-9.
- [47] Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, NY)*. 1998 Sep 11;281(5383):1674-7.
- [48] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science (New York, NY)*. 1998 Sep 11;281(5383):1677-9.
- [49] Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & development*. 1999 Jan 15;13(2):152-7.
- [50] Lakin ND, Hann BC, Jackson SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*. 1999 Jul 8;18(27):3989-95.

- [51] Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Molecular and cellular biology*. 1992 Nov;12(11):5041-9.
- [52] Anderson CW. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences*. 1993 Nov;18(11):433-7.
- [53] Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2005 Apr 29;18(3):283-93.
- [54] Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997 Oct 31;91(3):325-34.
- [55] Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology*. 2000 Nov;20(22):8458-67.
- [56] Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):296-9.
- [57] Picksley SM, Vojtesek B, Sparks A, Lane DP. Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*. 1994 Sep;9(9):2523-9.
- [58] Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Molecular cell*. 1998 Oct;2(4):405-15.
- [59] Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science (New York, NY)*. 2003 Apr 11;300(5617):342-4.
- [60] Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, Brady JN. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Dec 4;273(49):33048-53.
- [61] Dumaz N, Meek DW. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO journal*. 1999 Dec 15;18(24):7002-10.
- [62] Dornan D, Hupp TR. Inhibition of p53-dependent transcription by BOX-I phosphopeptide mimetics that bind to p300. *EMBO reports*. 2001 Feb;2(2):139-44.

- [63] Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development*. 1998 Sep 15;12(18):2831-41.
- [64] Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Mar 31;275(13):9278-83.
- [65] Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, Noda Y, Lees-Miller SP, Appella E, et al. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Apr 12;277(15):12491-4.
- [66] Saito S, Yamaguchi H, Higashimoto Y, Chao C, Xu Y, Fornace AJ, Jr., et al. Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Sep 26;278(39):37536-44.
- [67] Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Molecular and cellular biology*. 2005 Jul;25(13):5389-95.
- [68] Polley S, Guha S, Roy NS, Kar S, Sakaguchi K, Chuman Y, et al. Differential recognition of phosphorylated transactivation domains of p53 by different p300 domains. *Journal of molecular biology*. 2008 Feb 8;376(1):8-12.
- [69] Jenkins LM, Yamaguchi H, Hayashi R, Cherry S, Tropea JE, Miller M, et al. Two distinct motifs within the p53 transactivation domain bind to the Taz2 domain of p300 and are differentially affected by phosphorylation. *Biochemistry*. 2009 Feb 17;48(6):1244-55.
- [70] Lee CW, Arai M, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Mapping the interactions of the p53 transactivation domain with the KIX domain of CBP. *Biochemistry*. 2009 Mar 17;48(10):2115-24.
- [71] Teufel DP, Bycroft M, Fersht AR. Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2. *Oncogene*. 2009 May 21;28(20):2112-8.
- [72] Di Lello P, Jenkins LM, Jones TN, Nguyen BD, Hara T, Yamaguchi H, et al. Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53. *Molecular cell*. 2006 Jun 23;22(6):731-40.
- [73] Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, et al. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 1999 Feb;19(2):1202-9.

- [74] Wang YH, Tsay YG, Tan BC, Lo WY, Lee SC. Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Jul 11;278(28):25568-76.
- [75] Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*. 2008 May 16;133(4):612-26.
- [76] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*. 2004 Mar 25;428(6981):431-7.
- [77] Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular cell*. 2006 Dec 28;24(6):827-39.
- [78] Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, et al. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Molecular cell*. 2006 Dec 28;24(6):841-51.
- [79] Lu X, Nguyen TA, Moon SH, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer metastasis reviews*. 2008 Jun;27(2):123-35.
- [80] Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, et al. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO journal*. 2002 Nov 15;21(22):6236-45.
- [81] Smith J. Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends in cell biology*. 2002 Sep;12(9):404-6.
- [82] Perry ME. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Jan;2(1):a000968.
- [83] Mendrysa SM, McElwee MK, Michalowski J, O'Leary KA, Young KM, Perry ME. mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology*. 2003 Jan;23(2):462-72.
- [84] Terzian T, Wang Y, Van Pelt CS, Box NF, Travis EL, Lozano G. Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Molecular and cellular biology*. 2007 Aug;27(15):5479-85.
- [85] Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO journal*. 1996 Oct 1;15(19):5349-57.

- [86] Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *The EMBO journal*. 1991 Jun;10(6):1565-9.
- [87] Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, et al. Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Molecular and cellular biology*. 2004 Jul;24(13):5835-43.
- [88] Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews*. 2006 Dec;6(12):909-23.
- [89] Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*. 1995 Nov 9;378(6553):203-6.
- [90] Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*. 1995 Nov 9;378(6553):206-8.
- [91] Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, Yan W, Reinke V, Jochemsen AG, et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nature genetics*. 2001 Sep;29(1):92-5.
- [92] Migliorini D, Lazzerini Denchi E, Danovi D, Jochemsen A, Capillo M, Gobbi A, et al. Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Molecular and cellular biology*. 2002 Aug;22(15):5527-38.
- [93] Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ, George DL. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Dec 31;274(53):38189-96.
- [94] Marine JC, Lozano G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell death and differentiation*. Jan;17(1):93-102.
- [95] Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, et al. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Feb 28;103(9):3232-7.
- [96] Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ, Jr., Vogelstein B, Kastan MB. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Mar 29;91(7):2684-8.
- [97] Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*. 1993 Dec;8(12):3411-6.

- [98] Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development*. 1993 Jul;7(7A):1126-32.
- [99] Pan Y, Chen J. MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Molecular and cellular biology*. 2003 Aug;23(15):5113-21.
- [100] Pereg Y, Lam S, Teunisse A, Biton S, Meulmeester E, Mittelman L, et al. Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylations of Hdmx in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 2006 Sep;26(18):6819-31.
- [101] Gu J, Kawai H, Nie L, Kitao H, Wiederschain D, Jochemsen AG, et al. Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *The Journal of biological chemistry*. 2002 May 31;277(22):19251-4.
- [102] Kawai H, Lopez-Pajares V, Kim MM, Wiederschain D, Yuan ZM. RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. *Cancer research*. 2007 Jul 1;67(13):6026-30.
- [103] Jackson MW, Lindstrom MS, Berberich SJ. MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 6;276(27):25336-41.
- [104] Barboza JA, Iwakuma T, Terzian T, El-Naggar AK, Lozano G. Mdm2 and Mdm4 loss regulates distinct p53 activities. *Mol Cancer Res*. 2008 Jun;6(6):947-54.
- [105] Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & development*. 2001 May 1;15(9):1067-77.
- [106] Chen L, Gilkes DM, Pan Y, Lane WS, Chen J. ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *The EMBO journal*. 2005 Oct 5;24(19):3411-22.
- [107] Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, et al. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *The EMBO journal*. 2002 Jul 15;21(14):3715-27.
- [108] Zuckerman V, Lenos K, Popowicz GM, Silberman I, Grossman T, Marine JC, et al. c-Abl phosphorylates Hdmx and regulates its interaction with p53. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Feb 6;284(6):4031-9.
- [109] Shinozaki T, Nota A, Taya Y, Okamoto K. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene*. 2003 Dec 4;22(55):8870-80.

- [110] Jin Y, Dai MS, Lu SZ, Xu Y, Luo Z, Zhao Y, et al. 14-3-3gamma binds to MDMX that is phosphorylated by UV-activated Chk1, resulting in p53 activation. *The EMBO journal*. 2006 Mar 22;25(6):1207-18.
- [111] Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer cell*. 2007 Oct;12(4):342-54.
- [112] Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO journal*. 1999 Jan 4;18(1):22-7.
- [113] Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Jun 8;96(12):6937-41.
- [114] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, NY)*. 2004 Feb 6;303(5659):844-8.
- [115] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.
- [116] Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell*. 1998 Sep;2(3):305-16.
- [117] Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Mar;2(3):a000927.
- [118] Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell death and differentiation*. 2006 Jun;13(6):962-72.
- [119] Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*. 2001 May 31;20(25):3193-205.
- [120] Wu G, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee CC, et al. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer research*. 2003 May 15;63(10):2351-7.
- [121] Liu G, Nozell S, Xiao H, Chen X. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Molecular and cellular biology*. 2004 Jan;24(2):487-501.

- [122] Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Human mutation*. 2003 Mar;21(3):182-91.
- [123] Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight RA. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2003 Dec;28(12):663-70.
- [124] Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nature cell biology*. 2002 Jun;4(6):462-7.
- [125] Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U, et al. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. 2002 Oct 3;21(44):6722-8.
- [126] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729-40.
- [127] Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*. 1965 Mar;37:614-36.
- [128] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):458-60.
- [129] Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*. 1999 Sep 9;9(17):939-45.
- [130] Chang BD, Swift ME, Shen M, Fang J, Broude EV, Roninson IB. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jan 8;99(1):389-94.
- [131] Zhang H, Pan KH, Cohen SN. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Mar 18;100(6):3251-6.
- [132] Yoon IK, Kim HK, Kim YK, Song IH, Kim W, Kim S, et al. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Experimental gerontology*. 2004 Sep;39(9):1369-78.
- [133] Mason DX, Jackson TJ, Lin AW. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene*. 2004 Dec 9;23(57):9238-46.
- [134] Trougakos IP, Saridaki A, Panayotou G, Gonos ES. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development*. 2006 Jan;127(1):88-92.

- [135] Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in cell biology*. 2001 Nov;11(11):S27-31.
- [136] Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer research*. 2006 Mar 15;66(6):2881-4.
- [137] Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):703-16.
- [138] Pang JH, Chen KY. Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *Journal of cellular physiology*. 1994 Sep;160(3):531-8.
- [139] Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR. Senescent cells fail to express *cdc2*, *cycA*, and *cycB* in response to mitogen stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991 Dec 15;88(24):11012-6.
- [140] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
- [141] Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*. 2006 Apr;5(2):187-95.
- [142] Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell*. 2004 May 21;14(4):501-13.
- [143] Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):633-7.
- [144] Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):638-42.
- [145] Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & development*. 2007 Jan 1;21(1):43-8.

- [146] Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Begin V, Saad F, et al. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes & development*. Jan 1;25(1):41-50.
- [147] Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & development*. 2000 Aug 15;14(16):2015-27.
- [148] Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental gerontology*. 2000 May;35(3):317-29.
- [149] Mallette FA, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007 Aug 1;6(15):1831-6.
- [150] Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006 Jan;21(1):3-9.
- [151] Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA repair*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1009-14.
- [152] Kondo T, Wakayama T, Naiki T, Matsumoto K, Sugimoto K. Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science (New York, NY)*. 2001 Oct 26;294(5543):867-70.
- [153] Melo JA, Cohen J, Toczyski DP. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes & development*. 2001 Nov 1;15(21):2809-21.
- [154] Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*. 2000 Dec 25;151(7):1381-90.
- [155] Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science (New York, NY)*. 2002 Nov 15;298(5597):1435-8.
- [156] DiTullio RA, Jr., Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, et al. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature cell biology*. 2002 Dec;4(12):998-1002.
- [157] Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J. p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and cellular biology*. 2003 Apr;23(7):2556-63.
- [158] Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature*. 2003 Feb 27;421(6926):952-6.

- [159] Lou Z, Minter-Dykhouse K, Wu X, Chen J. MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature*. 2003 Feb 27;421(6926):957-61.
- [160] Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*. 2003 Feb 27;421(6926):961-6.
- [161] Yamane K, Wu X, Chen J. A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Molecular and cellular biology*. 2002 Jan;22(2):555-66.
- [162] Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science (New York, NY)*. 1999 Jul 30;285(5428):747-50.
- [163] Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*. 2001 Sep 1;15(17):2177-96.
- [164] Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annual review of genetics*. 1997;31:635-62.
- [165] Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, Schreiber SL. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Apr 2;93(7):2850-5.
- [166] Bosotti R, Isacchi A, Sonnhammer EL. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in biochemical sciences*. 2000 May;25(5):225-7.
- [167] Bakkenist CJ, Kastan MB. Initiating cellular stress responses. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):9-17.
- [168] Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in biochemical sciences*. 2006 Jul;31(7):402-10.
- [169] Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends in cell biology*. 2002 Nov;12(11):509-16.
- [170] Kumagai A, Dunphy WG. How cells activate ATR. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2006 Jun;5(12):1265-8.
- [171] Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007 Feb 15;6(4):414-7.
- [172] Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development*. 2000 Feb 15;14(4):397-402.

- [173] Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, NY)*. 2001 Nov 23;294(5547):1713-6.
- [174] Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*. 2003 May;3(5):421-9.
- [175] Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug;9(8):616-27.
- [176] Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.
- [177] Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science (New York, NY)*. 2004 Apr 2;304(5667):93-6.
- [178] Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*. 2006 Jan;8(1):37-45.
- [179] Myers JS, Cortez D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Apr 7;281(14):9346-50.
- [180] Cuadrado M, Martinez-Pastor B, Murga M, Toledo LI, Gutierrez-Martinez P, Lopez E, et al. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Feb 20;203(2):297-303.
- [181] Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, Lakin ND. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene*. 2006 Jun 29;25(28):3894-904.
- [182] d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes & development*. 2004 Aug 1;18(15):1781-99.
- [183] Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol*. 2003 Sep 2;13(17):1549-56.
- [184] d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):194-8.
- [185] Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *The EMBO journal*. 2004 Jul 7;23(13):2554-63.

- [186] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):593-602.
- [187] Mallette FA, Goumard S, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Ferbeyre G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene*. 2004 Jan 8;23(1):91-9.
- [188] Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science (New York, NY)*. 1997 Aug 8;277(5327):831-4.
- [189] Obaya AJ, Sedivy JM. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jan;59(1):126-42.
- [190] Tront JS, Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer research*. 2006 Sep 1;66(17):8448-54.
- [191] de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, et al. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Molecular cell*. 2004 Feb 27;13(4):523-35.
- [192] Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nature cell biology*. 2006 Aug;8(8):877-84.
- [193] Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2007 Jul;46(7):617-34.
- [194] Dimaras H, Khetan V, Halliday W, Orlic M, Prigoda NL, Piovesan B, et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Human molecular genetics*. 2008 May 15;17(10):1363-72.
- [195] Bookstein R, Lee WH. Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene. *Critical reviews in oncogenesis*. 1991;2(3):211-27.
- [196] Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986 Oct 16-22;323(6089):643-6.
- [197] Deshpande A, Hinds PW. The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Current molecular medicine*. 2006 Nov;6(7):809-17.
- [198] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41.

- [199] Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical pathology*. 2006 May;59(5):445-53.
- [200] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
- [201] Riley DJ, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annual review of cell biology*. 1994;10:1-29.
- [202] Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature cell biology*. 2000 Apr;2(4):E65-7.
- [203] Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):667-77.
- [204] Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology*. 1999 Apr 16;287(5):821-8.
- [205] Lu X. Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. May;2(5):a000984.
- [206] Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Nov;114(9):1299-307.
- [207] Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mechanisms of ageing and development*. 2007 Jan;128(1):36-44.
- [208] Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *Faseb J*. 2001 Feb;15(2):458-66.
- [209] Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donnell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging cell*. 2002 Oct;1(1):57-65.
- [210] Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):642.
- [211] Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):660-5.

- [212] Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):725-30.
- [213] Castro P, Giri D, Lamb D, Ittmann M. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*. 2003 Apr 1;55(1):30-8.
- [214] Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):720-4.
- [215] Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*. 2008 Dec 2;6(12):2853-68.
- [216] Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine*. May;16(5):238-46.
- [217] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1019-31.
- [218] Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1006-18.
- [219] Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):363-74.
- [220] Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):656-60.
- [221] Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *British medical bulletin*. 1995 Apr;51(2):368-84.
- [222] Brod SA. Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflamm Res*. 2000 Nov;49(11):561-70.
- [223] Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Dec;1028:1-13.

- [224] Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000 Jun;908:244-54.
- [225] Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mechanisms of ageing and development*. 2007 Jan;128(1):83-91.
- [226] Young AR, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO reports*. 2009 Mar;10(3):228-30.
- [227] Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*.5:99-118.
- [228] Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Oct 9;98(21):12072-7.
- [229] Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Oct 6;281(40):29568-74.
- [230] Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer research*. 2007 Apr 1;67(7):3117-26.
- [231] Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):233-8.
- [232] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
- [233] Ilangumaran S, Rottapel R. Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1. *Immunological reviews*. 2003 Apr;192:196-211.
- [234] Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-3.
- [235] Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends in biochemical sciences*. 2002 May;27(5):235-41.
- [236] O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S121-31.

- [237] Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000 Nov 20;19(49):5662-79.
- [238] Naka T, Fujimoto M, Kishimoto T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends in biochemical sciences*. 1999 Oct;24(10):394-8.
- [239] Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annual review of immunology*. 2000;18:143-64.
- [240] Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jun;2(6):410-6.
- [241] Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Jan 6;95(1):114-9.
- [242] Pawson T. SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Advances in cancer research*. 1994;64:87-110.
- [243] Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 1994 Sep 22;371(6495):297-300.
- [244] Ponting C, Schultz J, Bork P. SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺)-release channels). *Trends in biochemical sciences*. 1997 Jun;22(6):193-4.
- [245] Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins*. 1993 Dec;17(4):363-74.
- [246] Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends in immunology*. 2003 Dec;24(12):659-66.
- [247] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO journal*. 1995 Jun 15;14(12):2816-26.
- [248] Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):917-21.
- [249] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):921-4.

- [250] Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):924-9.
- [251] Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Oct 27;95(22):13130-4.
- [252] Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, et al. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *The EMBO journal*. 1999 Jan 15;18(2):375-85.
- [253] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal*. 1999 Mar 1;18(5):1309-20.
- [254] Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, et al. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Apr 20;276(16):12530-8.
- [255] De Sepulveda P, Okkenhaug K, Rose JL, Hawley RG, Dubreuil P, Rottapel R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *The EMBO journal*. 1999 Feb 15;18(4):904-15.
- [256] Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes & development*. 2004 Dec 15;18(24):3055-65.
- [257] Bradsher JN, Tan S, McLaury HJ, Conaway JW, Conaway RC. RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. *The Journal of biological chemistry*. 1993 Dec 5;268(34):25594-603.
- [258] Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DY, Garrett KP, et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science (New York, NY)*. 1995 Sep 8;269(5229):1402-6.
- [259] Guardavaccaro D, Pagano M. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene*. 2004 Mar 15;23(11):2037-49.
- [260] Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, et al. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. 1996 Jul 26;86(2):263-74.

- [261] Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):209-19.
- [262] Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):221-30.
- [263] Kamura T, Burian D, Yan Q, Schmidt SL, Lane WS, Querido E, et al. Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Aug 10;276(32):29748-53.
- [264] Frantsve J, Schwaller J, Sternberg DW, Kutok J, Gilliland DG. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology*. 2001 May;21(10):3547-57.
- [265] Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C, La Rose J, Ho JM, Nguyen MH, et al. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene*. 2002 Jun 27;21(28):4351-62.
- [266] De Sepulveda P, Ilangumaran S, Rottapel R. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2000 May 12;275(19):14005-8.
- [267] Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Nov 1;277(44):42394-8.
- [268] Zhang JG, Metcalf D, Rakar S, Asimakis M, Greenhalgh CJ, Willson TA, et al. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Nov 6;98(23):13261-5.
- [269] Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5833-43.
- [270] Jegalian AG, Wu H. Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jan 18;277(3):2345-52.
- [271] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature genetics*. 2001 May;28(1):29-35.

- [272] Gregorieff A, Pyronnet S, Sonenberg N, Veillette A. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jul 14;275(28):21596-604.
- [273] Siewert E, Muller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999 Oct 1;265(1):251-7.
- [274] Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Mar 2;96(5):2071-6.
- [275] Hanada T, Yoshida T, Kinjyo I, Minoguchi S, Yasukawa H, Kato S, et al. A mutant form of JAB/SOCS1 augments the cytokine-induced JAK/STAT pathway by accelerating degradation of wild-type JAB/CIS family proteins through the SOCS-box. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Nov 2;276(44):40746-54.
- [276] Chen XP, Losman JA, Cowan S, Donahue E, Fay S, Vuong BQ, et al. Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Feb 19;99(4):2175-80.
- [277] Toniato E, Chen XP, Losman J, Flati V, Donahue L, Rothman P. TRIM8/GERP RING finger protein interacts with SOCS-1. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Oct 4;277(40):37315-22.
- [278] Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Jr., Conaway RC, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes & development*. 1998 Dec 15;12(24):3872-81.
- [279] Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):80-91.
- [280] Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer research*. Apr 15;70(8):3119-27.
- [281] Metcalf D, Mifsud S, Di Rago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jan 22;99(2):943-8.
- [282] Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, Ross TS, et al. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of

a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *The EMBO journal*. 1998 Sep 15;17(18):5321-33.

[283] Danial NN, Losman JA, Lu T, Yip N, Krishnan K, Krolewski J, et al. Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation. *Molecular and cellular biology*. 1998 Nov;18(11):6795-804.

[284] Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2523-31.

[285] Simon AR, Takahashi S, Severgnini M, Fanburg BL, Cochran BH. Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *American journal of physiology*. 2002 Jun;282(6):L1296-304.

[286] Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:227-64.

[287] Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Tanimura S, Sasaki A, Yuge K, et al. A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1668-76.

[288] Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Nov 24;95(24):14395-9.

[289] Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Dec 25;273(52):35056-62.

[290] O'Keefe GM, Nguyen VT, Ping Tang LL, Benveniste EN. IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2260-9.

[291] Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Albanesi C. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation. *Faseb J*. 2008 Sep;22(9):3287-97.

[292] Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, Fujimoto M, Morita Y, Ohsawa Y, et al. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Dec 22;95(26):15577-82.

[293] Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*. 1999 Sep 3;98(5):597-608.

- [294] Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*. 1999 Sep 3;98(5):609-16.
- [295] Baetz A, Koelsche C, Strebovsky J, Heeg K, Dalpke AH. Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *Faseb J*. 2008 Dec;22(12):4296-305.
- [296] Onishi M, Nosaka T, Misawa K, Mui AL, Gorman D, McMahon M, et al. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Molecular and cellular biology*. 1998 Jul;18(7):3871-9.
- [297] Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer research*. 2004 Jul 15;64(14):4774-82.
- [298] Xi S, Zhang Q, Dyer KF, Lerner EC, Smithgall TE, Gooding WE, et al. Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Aug 22;278(34):31574-83.
- [299] Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Huot G, Ferbeyre G. Myc down-regulation as a mechanism to activate the Rb pathway in STAT5A-induced senescence. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Nov 30;282(48):34938-44.
- [300] Calabrese V, Mallette FA, Deschenes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, et al. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Molecular cell*. 2009 Dec 11;36(5):754-67.
- [301] Limnander A, Danial NN, Rothman PB. v-Abl signaling disrupts SOCS-1 function in transformed pre-B cells. *Molecular cell*. 2004 Aug 13;15(3):329-41.
- [302] Chen JL, Limnander A, Rothman PB. Pim-1 and Pim-2 kinases are required for efficient pre-B-cell transformation by v-Abl oncogene. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1677-85.
- [303] Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, et al. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & development*. 1996 Aug 15;10(16):2067-78.
- [304] Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, et al. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology*. 1999 Jun;19(6):4366-78.

- [305] O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, et al. Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS genetics*. 2007 Jun;3(6):e89.
- [306] Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, et al. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature cell biology*. 2006 Aug;8(8):870-6.
- [307] Strebosky J, Walker P, Lang R, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *Faseb J*. Mar;25(3):863-74.
- [308] Charoenthongtrakul S, Zhou Q, Shembade N, Harhaj NS, Harhaj EW. Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS1. *Journal of virology*. Jul;85(14):6955-62.
- [309] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005 May;446(5):475-82.
- [310] Cortes Sempere M, Rodriguez Fanjul V, Sanchez Perez I, Perona R. The role of the NFkappaB signalling pathway in cancer. *Clin Transl Oncol*. 2008 Mar;10(3):143-7.
- [311] Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6948-58.
- [312] Ng PW, Iha H, Iwanaga Y, Bittner M, Chen Y, Jiang Y, et al. Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Oncogene*. 2001 Jul 27;20(33):4484-96.
- [313] Sun SC, Yamaoka S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene*. 2005 Sep 5;24(39):5952-64.
- [314] Guo X, Mills AA. p63, cellular senescence and tumor development. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007 Feb 1;6(3):305-11.
- [315] Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nature reviews*. 2009 Oct;9(10):738-48.
- [316] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science (New York, NY)*. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.
- [317] Potenza MV, Mechanick JI. The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr Clin Pract*. 2009 Oct-Nov;24(5):560-77.

[318] Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Jul 13;101(28):10422-7.