

# Crisi evitada: caracterització d'una nova màquina d'ATP nuclear

Premi SCB Nit: Article Científic

Roni H. G. Wright

Totes les cèl·lules tenen la capacitat fonamental de respondre contínuament, ràpidament i dinàmicament a les pautes externes del medi, modificant la seva taxa de creixement cel·lular, l'expressió gènica, l'excreció de molècules i el metabolisme per adaptar-se i sobreviure. La resposta als estímuls externs depèn tant de la transmissió del senyal a través de vies de senyalització d'acció ràpida com dels canvis d'expressió gènica riu avall facilitades pel reclutament de factors de transcripció i remodeladors de cromatina que comporten la modificació de la cromatina i de l'estructura 3D del nucli. La nostra investigació se centra en la comprensió d'aquests mecanismes després de l'estimulació hormonal en cèl·lules de càncer de mama. Hem descrit una nova via induïda per progesterona en cèl·lules de càncer de mama on els requeriments energètics, en forma d'ATP requerits per provocar els canvis massius en la cromatina i l'expressió gènica, es veuen parcialment satisfets per la pirofosforilació d'ADPR per part de l'enzim nuclear NUDIX5 (Wright *et al.*, 2016a). NUDIX5 és essencial per als canvis d'expressió gènica, de la remodelació de la cromatina i de la proliferació cel·lular induïts per progesterona, i pot proporcionar una diana nova per a la teràpia del càncer i el descobriment de biomarcadors.

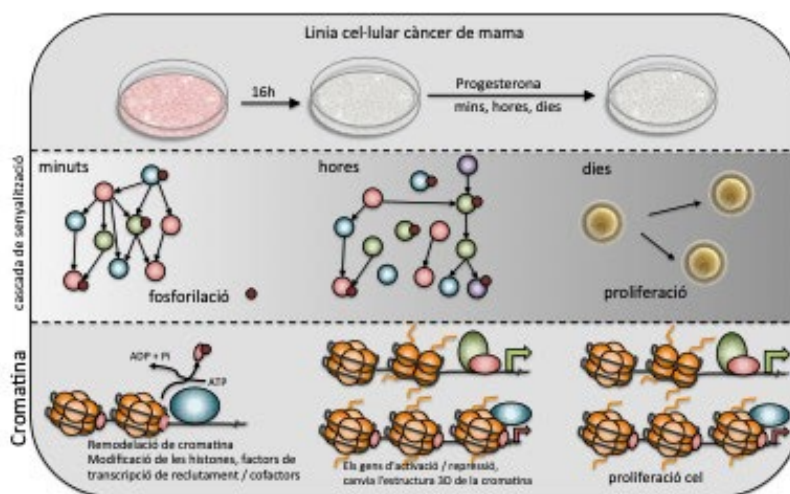
## Creixement de cèl·lules de càncer de mama induït per hormones

La capacitat de les cèl·lules per respondre a senyals externs dins del seu entorn és imprescindible per a la supervivència i forma la base de la fisiologia cel·lular normal. Un exemple

d'aquest sistema és la resposta de cèl·lules de mama epitelials a les hormones progesterona i estradiol. Aquestes hormones alliberades a la circulació sistèmica s'uneixen als receptors hormonals units i expressats sobre la membrana cel·lular dels teixits diana, incloent-hi el pit. Aquesta unió del lligand activa el receptor hormonal, que induïx una cascada d'esdeveniments cel·lulars essencials durant el desenvolupament del pit i l'embaràs. Encara que la proliferació de cèl·lules de mama induïda per hormones forma part de la biologia normal del teixit mamari, també juga un paper important en la progressió del càncer de mama. Per tant, una comprensió concreta dels mecanismes cel·lulars implicats en la resposta de les cèl·lules del càncer de mama a les hormones és de vital importància per impulsar el descobriment de nous biomarcadors i teràpies anticanceroses amb l'objectiu final de millorar l'atenció al pacient.

## Senyalització de la progesterona en càncer de mama

Al laboratori de Miguel Beato (CRG, Barcelona), la nostra recerca se centra en la comprensió de l'activació i els mecanismes iniciats per la progesterona en la línia cel·lular de càncer de mama epitelial T47D, positiva per als receptors de progesterona i d'estrògens. Per obtenir una població síncrona, les cèl·lules de càncer de mama són privades d'hormones abans de la inducció hormonal. La posterior estimulació amb progesterona es pot dividir en tres fases diferents segons el moment en què es produeixen (Figura 1). En primer lloc, la progesterona s'uneix al seu receptor cognat, exposat a la superfície de les cèl·lules, i produeix la ràpida activació de les cascades de senyalització per quinases. Les quinases activades produeixen la fosforilació de proteïnes efectores, inclosa la fosforilació del mateix receptor



↑ Figura 1. Resposta hormonal en cèl·lules de càncer de mama. Estratègia experimental i privació hormonal en cultiu cel·lular (a dalt). La resposta de les cèl·lules de càncer de mama a hormona es pot dividir en tres fases; una resposta ràpida en qüestió de minuts d'estímul per la qual s'activen les cascades de senyalització, que provoquen una càrrega inicial de factors de transcripció i remodeladors de la cromatina. Una segona onada de senyalització (hores) que ocorre durant el temps dels canvis en l'expressió gènica i produeix, finalment, la proliferació cel·lular en un termini de dies.

de progesterona. El receptor de progesterona activat, juntament amb altres factors de transcripció, cofactors i remodeladors de cromatina, s'uneixen als llocs d'unió dels receptors d'hormones (HRE) dins de la cromatina. La unió d'aquests factors es tradueix en la remodelació de la cromatina dependent d'ATP, una estructura de cromatina local més oberta, canvis estructurals globals en 3D i la iniciació de la transcripció genètica dependent de progesterona que es produeix en qüestió d'hores d'estimulació (Beato *et al.*, 2012). Aquesta reprogramació global del patró d'expressió genòmica i de l'estructura nuclear 3D governa les vies necessàries per a la proliferació cel·lular que es produeixen 24 hores després de l'estimulació.

## Generació ATP nuclear en resposta a l'hormona

Durant la fase de senyalització inicial i posterior expressió genètica d'aquest procés, es requereix una remodelació massiva de la cromatina. Moltes d'aquestes maquinàries utilitzen energia en forma d'ATP per al desplaçament i el canvi de contingut dels nucleosomes dins de la cromatina. Aquests requisits energètics de la cèl·lula es mantenen a través de l'entrada d'ATP de les mitocondries. No obstant això, fa més de seixanta anys, es va detectar ATP al nucli i es va plantejar la hipòtesi que es pogués estar sintetitzant en aquest compartiment (Allfrey *et al.*, 1957). A partir d'aquí, ens vam plantejar d'investigar els nivells d'ATP i els canvis d'aquests en resposta a l'hormona en diferents compartiments cel·lulars. Vam transfectar en cèl·lules de càncer de mama construccions de luciferasa destinades al nucli, la mitocondria o el citoplasma, i vam usar la bioluminescència detectada com a mesura d'ATP en resposta a la progesterona (Figura 2). Vam trobar que l'ATP nuclear incrementava específicament en resposta a l'hormona. Posteriorment, en experiments amb cèl·lules *in vivo* es va confirmar l'augment de l'ATP nuclear i, de fet, vam poder demostrar que l'augment no es devia a la participació mitocondrial, ja que la inhibició de la mitocondria no afectava l'augment d'ATP nuclear observat entre 34 minuts després de l'estímul. Aquests experiments inicials

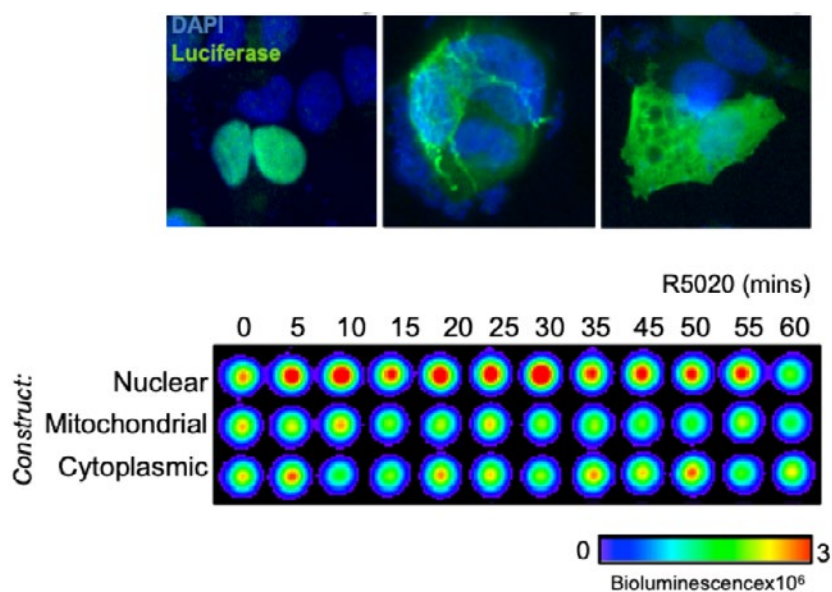
ens van portar a investigar la font, la via i el mecanisme de generació d'ATP nuclear en cèl·lules de càncer de mama.

## Energètica i PARilació induïda per l'hormona

Com s'ha comentat anteriorment, l'hormona induïx la ràpida modificació posttranslacional de les proteïnes diana, inclosa la fosforilació. Una de les modificacions posteriors a la translació, anteriorment descrita ser induïda per hormones, és la poli-ADP-ribosilació (PARilació). La PARilació (addició de cadenes d'ADP-ribose) a les proteïnes diana catalitzades per la polimerasa Poly-ADP-ribose 1 (PARP1) augmenta dramàticament en resposta a la progesterona en cèl·lules de càncer de mama (Wright *et al.*, 2012). PARP1 s'activa, augmentant la seva capacitat de PARilació, a través de la fosforilació dins del domini catalític mitjançant la quinasa CDK2 que respon a la progesterona. Les dianes de PARilació inclou-

en la mateixa PARP1, a més de factors de transcripció, remodeladors de la cromatina i histones. L'addició de PAR a les proteïnes diana té efectes dramàtics sobre aquestes, ja que n'afecten l'activitat, les interaccions proteïna-proteïna i les interaccions entre proteïnes i ADN, i, per tant, sobre l'estructura de la cromatina. Com vam descriure anteriorment, la generació de PAR és essencial per als canvis d'expressió genètica i la proliferació cel·lular, induïts per hormones (Wright *et al.*, 2012). La generació de PAR és un procés energèticament costós, i si es desregula provoca la mort cel·lular a causa d'un dèficit energètic (ATP i NAD). Per evitar la mort cel·lular i controlar els nivells de PAR, aquest és escindit per l'enzim PARG en monòmers d'ADPR, resultant en un pic transitori característic de la formació i posterior degradació de PAR. Vam provar si la degradació de PAR per a l'enzim PARG també era essencial.

En experiments en resposta a l'hormona utilit-



↑ Figura 2: Augment de l'ATP en resposta a l'hormona. Expressió de construccions de luciferasa nuclears, mitocondrials o citoplasmàtiques visualitzades per immunofluorescència en cèl·lules de càncer de mama transfectades (a dalt). Imatge bioluminiscent amb els canvis en els nivells d'ATP detectats a partir de cèl·lules transfectades amb cadascuna d'aquestes construccions en resposta a l'hormona en qüestió de minuts (a baix). Adaptat de Wright *et al.*, 2016a.

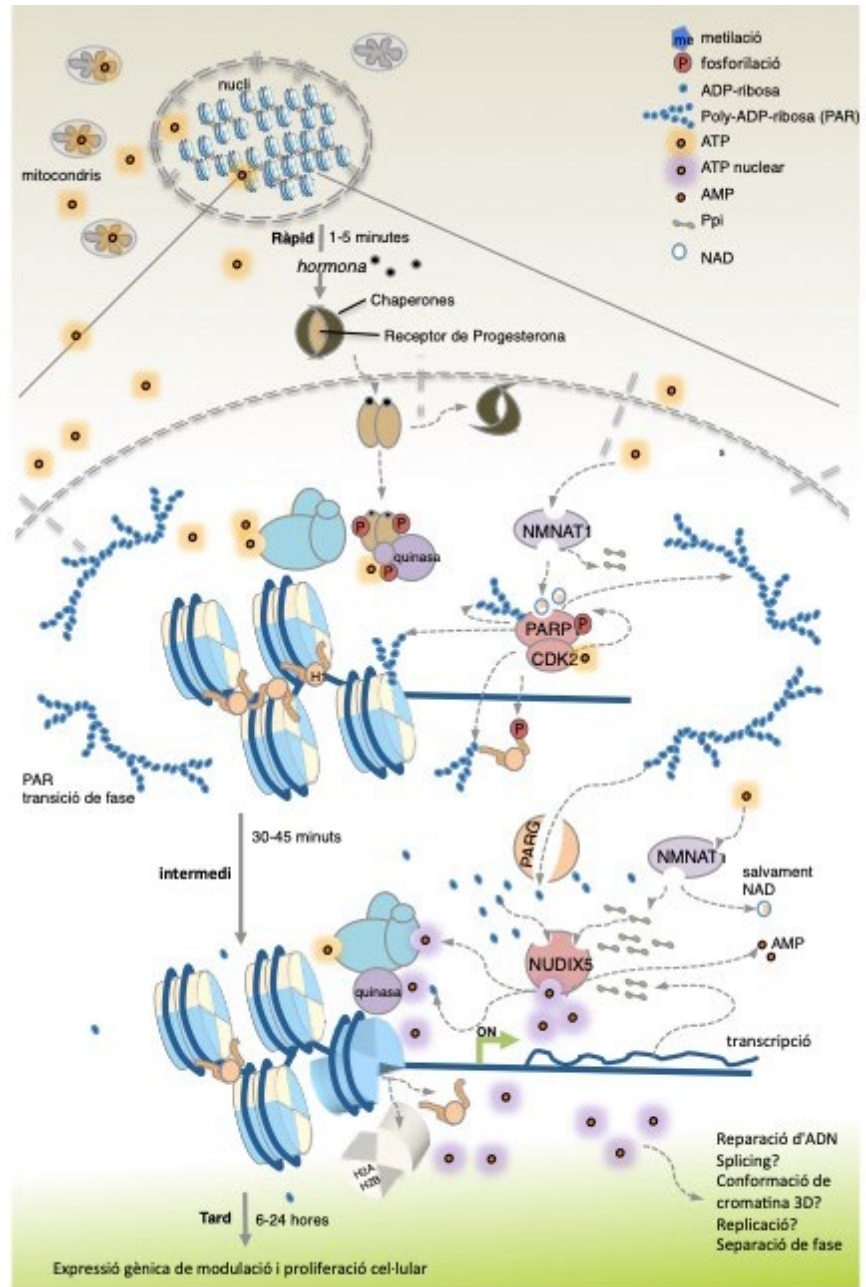
zant siRNAs o inhibidors, vam trobar que tant la generació (per PARP1) com la degradació (per PARG) eren essencials per a la remodelació de cromatina, els canvis d'expressió gènica i la proliferació cel·lular induïdes per hormones (Figura 3, a dalt).

El descobriment que l'ATP nuclear augmentava i que tant la generació com la degradació de PAR era essencial per a la resposta hormonal ens va portar a desxifrar que hi havia una relació entre aquestes dues troballes. El laboratori de Mathias Ziegler (Oei *et al.*, 2000) havia publicat prèviament una prova clau que unia PAR i ATP, en què van descobrir que l'ATP requerit per a la reparació de la ruptura de la cadena de DNA era dependent de la síntesi i degradació de PAR, postulant per primera vegada que es podria generar ATP a partir d'ADPR. A mesura que s'acumula PAR dins del nucli, després de la seva degradació, ADPR també s'acumula. Podria l'ADPR ser una font d'ATP específicament dins del nucli?

## NUDIX5 genera ATP dins del nucli de cèl·lules de càncer de mama

Basant-nos en el supòsit que PARP1 genera PAR a partir de NAD, i que és hidrolitzada a ADPR per part de PARG, vam realitzar proteòmica *shotgun* en cèl·lules de càncer de mama per identificar totes les proteïnes que interactuen amb PAR, amb l'objectiu de descobrir el següent enzim en la via, capaç de convertir ADPR a ATP. De totes les proteïnes identificades, NUDIX5 ens va cridar l'atenció, en gran mesura perquè havia estat descrita anteriorment per hidrolitzar ADPR a AMP i ribosa-5-fosfat. A més, estudis fosfoproteòmics en resposta a l'hormona van revelar la desfosforilació dinàmica de NUDIX5 a la treonina 45 (T45) en els primers minuts de l'estímul hormonal. El *knockdown* de NUDIX5 bloquejava els canvis d'expressió gènica i la proliferació cel·lular en resposta a la progesterona, suggerint que NUDIX5 podia jugar un paper important en la generació d'ATP a través de l'ADPR (Figura 3).

L'ATP es va detectar mitjançant assajos de lu-



† Figura 3. Esdeveniments centrats en l'energia després de la inducció hormonal en cèl·lules de càncer de mama. Inducció hormonal separada en tres fases. i) Estat basal; es manté l'activació o la repressió dels gens de l'estat estable i es compleixen els requisits energètics per difusió d'ATP a partir dels mitocondris. ii) Esdeveniments ràpids; minuts després de l'exposició a l'hormona, el PAR unit al lligand, en complex amb les quinases ERK/MSK, és reclutat a gens diana. CDK2 fosforila PARP1, que condueix a la PARilació local. La histona H1 fosforilada per CDK2 i PARilada és desplaçada de la cromatina. L'ATP consumit durant aquest període inicial és d'origen mitocondrial i és utilitzat per NMNAT1 per fer NAD i PPI. iii) Estat intermedi; l'augment de PAR activa PARG, augmentant la concentració d'ADPR. NUDIX5 utilitza ADPR i PPI per generar ATP. Adaptat de Wright *et al.*, 2016b.

# Crisi evitada: caracterització d'una nova màquina d'ATP nuclear

miniscència *in vitro* i espectrometria de masses després de la incubació de NUDIX5 recombinant amb ADPR i pirofosfat (PPi), que confirmaven que NUDIX5 generava ATP a partir d'ADPR. La modelització estructural va suggerir que la fosforilació en T45 de NUDIX5 podria resultar en un lloc actiu més rígid, on no es permetria l'entrada de PPi per a la generació d'ATP, d'aquí el requisit de desfosforilar ràpidament NUDIX5 en resposta a l'hormona. Les mutacions fosfomimètiques de NUDIX5 provades *in vitro* van confirmar que la fosforilació bloqueja la síntesi d'ATP i que aquest mutant actua com un dominant negatiu en les cèl·lules canceroses de mama, suprimint la remodelació de la cromatina i la proliferació cel·lular.

## Fer un pas enrere per anar endavant

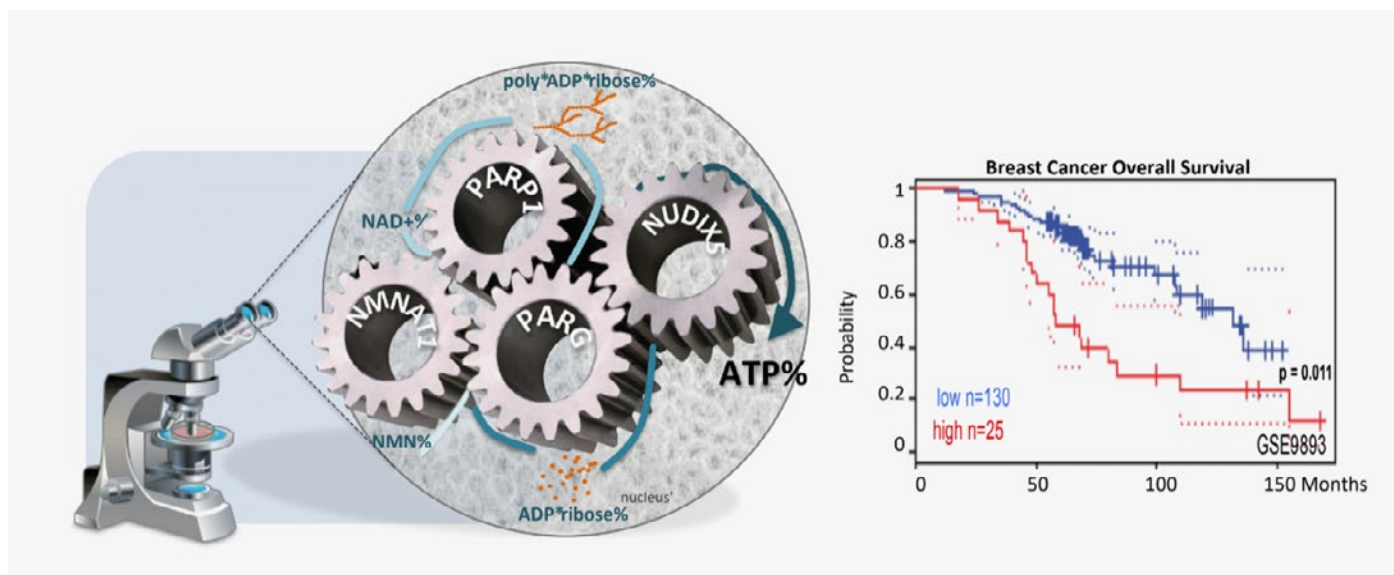
Una de les moltes preguntes que van sorgir després del descobriment de NUDIX5 i la generació d'ATP dins del nucli de cèl·lules de càncer de mama va ser la font de l'altre substrat requerit, el pirofosfat (PPi). ¿Hi ha d'haver un enzim responsable del subministrament del PPi dins d'aquesta via o es fa servir el PPi generat durant el procés de transcripció? A través d'aquestes línies d'investigació, vam descobrir que la sintasa nuclear NMNAT1, un conegut interactor de PARP1, és essencial per a la remodelació de cromatina, els canvis d'expressió gènica induïts per hormones i la proliferació cel·lular en cèl·lules de càncer de mama. NMNAT1 no només interacciona amb PARP1 sinó que també s'ha identificat com un interactor de NUDIX5 en resposta a l'hormona. El nostre treball ara se centra en la com-

prensió de les relacions d'interacció exactes, la transferència de substrats i l'estructura 3D d'aquests diferents enzims per obtenir informació sobre aquesta màquina molecular única (Figura 4, esquerra).

NUDIX5 està sobreexpressat en càncer de mama i altres càncers, i nivells més alts s'associen amb un pronòstic més precari en el càncer de mama (Figura 4, dreta). Esperem que els estudis estructurals en curs puguin proporcionar una nova visió de les estratègies terapèutiques del càncer de mama, en combinació amb els inhibidors de PARP1 ja existents que s'estan provant en assajos clínics.

## Agraïments

Gràcies a Jofre Font-Mateu per l'excel·lent traducció de l'anglès al català, que fa que l'article sigui llegible.



← Figura 4. Modelització d'una màquina en càncer. (Esquerra): Representació de la ruta de síntesi d'ATP a través de les accions combinades de NMNAT1, PARP1, PARG i NUDIX5. (Dreta): Les dades de supervivència general del càncer de mama estratifiquen els pacients basant-se en nivells elevats o disminuïts de NUDIX5. Wright *et al.*, 2016a.

## Bibliografia

- ALLFREY, V.; MIRSKY, A. E. (1957) «The Role of Deoxyribonucleic Acid and Other Polynucleotides in Atp Synthesis by Isolated Cell Nuclei». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43: 589–598.
- BEATO, M.; VICENT, G. P. (2012) «Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357: 37–42.
- OEI, S.; ZIEGLER, M. (2000) «ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose)». *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 23234–23239.
- WRIGHT, R. H. [et al.] (2012) «CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells». *Genes & Development*, 26: 1972–1983.
- WRIGHT, R. H. [et al.] (2016a) «ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling». *Science*, 352: 1221–1225.
- WRIGHT, R. H. [et al.] (2016b) «Insight into the machinery that oils chromatin dynamics: Nuclear ATP synthesis by NUDIX5». *Nucleus*.



**Roni Wright** (Escòcia, 1981) es va graduar a la Universitat de Strathclyde amb una llicenciatura en Bioquímica i Immunologia. El 2008 va obtenir el doctorat a la Universitat de Glasgow, i es va centrar

en el paper de la proteïna de resposta a danys de l'ADN TopBP1. Des de llavors ha treballat com a postdoc al laboratori de Miguel Beato al Centre de Regulació Genòmica (CRG), i ha enfocat la seva tasca en el paper de les hormones esteroidees en cromatina i càncer. El seu treball sobre la generació d'ATP al nucli, publicat a la revista *Science*, va rebre el Premi SCB a l'Article Científic 2017.