

REMODELATGE DE LA CROMATINA DURANT LA INDUCCIÓ PER PROGESTERONA DEL PROMOTOR DE L'MMTV

GUILLERMO P. VICENT, A. SILVINA NACHT, JAUME CLAUSELL, THOMAS BECHTOLD,
CECILIA BALLARÉ I MIGUEL BEATO

*Centre de Regulació Genòmica (CRG), Universitat Pompeu Fabra (UPF),
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).*

Adreça per a la correspondència: Miguel Beato. Centre de Regulació Genòmica (CRG),
Universitat Pompeu Fabra (UPF), Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).
Passeig Marítim, 37-49. 08005 Barcelona. Adreça electrònica: miguel.beato@crg.es.

RESUM

Per a comprendre els mecanismes que governen l'expressió dels gens inclosos en els genomes eucariòtics és necessari prendre en consideració la manera en què les regions reguladores d'aquests gens estan organitzades en la cromatina. Les diferències en l'organització de la cromatina i en les modificacions químiques dels components de la cromatina expliquen els diferents patrons de l'expressió gènica en diversos tipus de cèl·lules i la seva resposta específica a senyals externs. Basant-nos en els nostres estudis sobre la inducció hormonal del promotor del *mouse mammary tumour virus* (MMTV), podem concloure que la seqüència nucleotídica primària determina no solament la manera en què la doble hèlix de DNA envolta l'octàmer d'histona, i així l'accessibilitat de punts d'unió per als factors de transcripció, sinó també la manera en què aquests factors estableixen sinergismes i la naturalesa del remodelatge de la cromatina dependent d'ATP. A més, la senyalització via *crosstalk* amb cascades de cinases citoplasmàtiques canvia l'estructura de la cromatina en els gens diana i és fonamental per a la correcta regulació a través de receptors d'hormones esteroidees.

Paraules clau: MMTV, cromatina, receptor de progesterona, remodelatge de la cromatina, senyalització Erk.

SUMMARY

Understanding the mechanisms governing the expression of the genes encompassed in the eukaryotic genomes requires a careful consideration of the way regulatory regions of these genes are packaged in chromatin. Differences in the chromatin organization and in the chemical modifications of chromatin components account for the different patterns of gene expression in various cell types and for their specific response to external signals. Based on our studies

on the hormonal induction of mouse mammary tumour virus (MMTV) promoter we conclude that the primary nucleotide sequence determines not only the way the DNA double helix wraps around the histone octamer, and so the accessibility of binding sites for transcription factors, but also the way these factors synergize and the nature of the ATP-dependent chromatin remodeling. Moreover, signalling via crosstalk with cytoplasmic kinase cascades changes the chromatin structure of target genes and is essential for proper regulation by steroid hormone receptors.

Keywords: MMTV, chromatin, progesterone receptor, chromatin remodelling, Erk signalling.

La disponibilitat de la seqüència completa del genoma humà és només el punt de partida per a la gran comesa d'entendre el funcionament de les instruccions genòmiques. Això vol dir desxifrar quins tipus d'informació abasta el genoma, com és codificada i, el més important, com són implementades aquestes instruccions d'una manera interactiva durant el desenvolupament embrionari i postnatal per a donar lloc a un organisme en funcionament. Aquest darrer aspecte, que ara atrau l'atenció d'un gran nombre de científics, constitueix el que coneixem com a *epigenòmica*, i inclou moltes de les àrees de recerca més punyents, com són ara cèl·lules mare, reprogramació cel·lular i diferenciació, desenvolupament, impressió allèlica, senescència cel·lular i regulació gènica. Tots aquests processos són finalment controlats, encara que no exclusivament, al nivell d'organització de la cromatina, per exemple, mitjançant modificacions en la manera com el genoma és empaquetat amb histones i altres proteïnes cromosòmiques dins el nucli cel·lular. L'epigenètica ens recorda que el que heretem de cèl·lula a cèl·lula durant la divisió cel·lular no és solament DNA, sinó també cromatina amb totes les modificacions químiques sofertes durant el desenvolupament embrionari i la diferenciació cel·lular. La transmissió d'aquestes marques epigenètiques, que determinen la diferència entre una cèl·lula del fetge, del múscul o de la pell, assegura la continuïtat de la identitat cel·lular durant el creixement de l'òrgan o la regeneració del teixit. Sota determinades condicions fisiològiques aquestes marques epigenètiques són establertes progressivament durant el procés

de diferenciació cel·lular. Les alteracions en l'establiment o la transmissió de les marques epigenètiques menen a canvis patològics en la identitat cel·lular, com són ara la pèrdua del fenotip diferenciat o un creixement cel·lular descontrolat, tal com observem en el càncer.

Només la comprensió dels mecanismes involucrats en l'establiment, descodificació i transmissió de la informació epigenètica ens permetrà obtenir bon profit en biologia i medicina d'haver desxifrat la seqüència completa del genoma humà.

INDUCCIÓ DE LA REGULACIÓ HORMONAL DEL PROMOTOR DE L'MMTV

L'organització dels promotors eucariòtics i de les regions estimuladores en cromatina té un paper important en tots els processos que requereixen interaccions de proteïnes amb la informació reguladora codificada al DNA. La participació de la dinàmica de la cromatina en la regulació gènica ha estat estudiada en gran detall. Un dels sistemes model més ben caracteritzats és la regulació hormonal de l'expressió del *mouse mammary tumour virus* (MMTV). Durant la inducció hormonal del promotor de l'MMTV hi ha canvis ràpids de l'estructura de la cromatina, tal com ho prova l'aparició d'un lloc hipersensitiu de DNAasa I en una regió que conté els elements de resposta a l'hormona (hormone responsive elements, HRE) (Zaret i Yamamoto, 1984). Aquests HRE foren identificats per primer cop en experiments amb el receptor de glucocorticoides

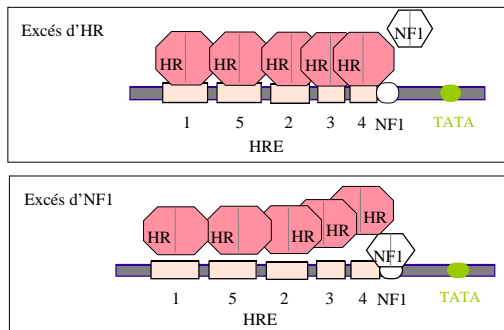


FIGURA 1. Unió de receptors hormonals (HR) i el factor nuclear 1 (NF1) al DNA promotor de l'MMTV. En presència d'un excés d'HR, NF1 no pot accedir al seu lloc d'unió (plafó de dalt), mentre que, en presència de concentracions equimolars o superiors de NF1, els HR no es poden unir eficientment als elements de resposta a l'hormona (HRE) en el promotor (plafó de sota) (Brüggemeier *et al.*, 1990).

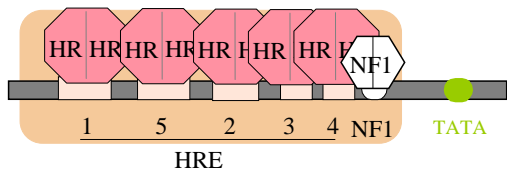


FIGURA 2. En cèl·lules en cultiu que contenen una sola còpia cromosòmica del promotor de l'MMTV tots els elements cis-reguladors són ocupats en la superfície de la partícula nucleosòmica. El rectangle mostra la posició translacional del nucleosoma deduïda a partir dels patrons de digestió de la nucleasa en cèl·lules intactes (Truss *et al.*, 1995). Els símbols són equivalents als de la figura 1.

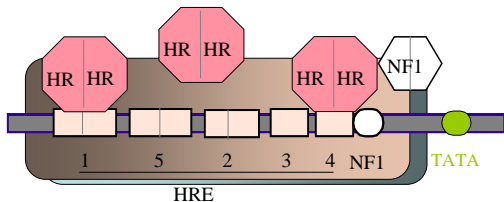


FIGURA 3. La unió de factors al promotor de l'MMTV acoblat en forma de nucleosomes *in vitro*. Les posicions dels marcs translacionals de les dues classes principals de nucleosomes s'indiquen mitjançant els rectangles. Els HR es poden unir a l'HRE1 i a l'HRE4, però no als HRE centrals 2, 3 i 5. NF1 no pot accedir al seu lloc d'unió (Piña *et al.*, 1990). Els símbols són equivalents als de la figura 1.

(GR) (Chandler *et al.*, 1983; Payvar *et al.*, 1983; Scheidreit *et al.*, 1985), però després es veié que també uneixen el receptor de progesterona (PR) amb gran afinitat. (Chalepakis *et al.*, 1988; Ahe *et al.*, 1985) i mitjanen l'activació de la transcripció per progesterona. (Cato *et al.*, 1987).

El promotor de l'MMTV s'organitza en nucleosomes posicionats, amb un nucleosoma que cobreix els HRE i el lloc d'unió de NF1 (Richard-Foy i Hager, 1987). L'activació hormonal completa del promotor requereix no solament els HRE, sinó també el lloc d'unió de NF1, cosa que indica que els dos factors sineritzen *in vivo* (Brüggemeier *et al.*, 1990; Chalepakis *et al.*, 1988). Tanmateix, en experiments de transcripció *in vitro* amb el promotor de l'MMTV, els receptors de l'hormona activen la transcripció (Kalff *et al.*, 1990), però no es detecta sinerisme amb l'NF1 (vegeu la figura 1). En lloc d'això l'NF1 competeix amb els receptors hormonals per la unió i transactivació en DNA nu (Brüggemeier *et al.*, 1990). No obstant això, en cèl·lules intactes tant els receptors hormonals com l'NF1 ocupen els seus llocs d'unió simultàniament després de la inducció hormonal a la superfície d'una partícula nucleosòmica (vegeu la figura 2) (Truss *et al.*, 1995). Aquests resultats suggereixen un paper important de l'organització nucleosòmica del promotor per a una inducció eficient.

Quan el DNA del promotor de l'MMTV és acoblat en nucleosomes *in vitro*, adopta una orientació rotacional precisa en la superfície de l'octàmer d'histones que exposa els HRE externs 1 i 4 però deixa inaccessible els HRE centrals 2, 3 i 5, que són essencials per a la inducció hormonal (vegeu la figura 3) (Piña *et al.*, 1990). Tanmateix, l'NF1 no es pot lligar a seqüències promotores de l'MMTV acoblades en nucleosomes regulars, perquè envolta completament la doble hèlix de DNA (Einsfeld *et al.*, 1997; Piña *et al.*, 1990). Per tant, vam concloure que el nucleosoma ha d'experimentar canvis durant la inducció que permetin la

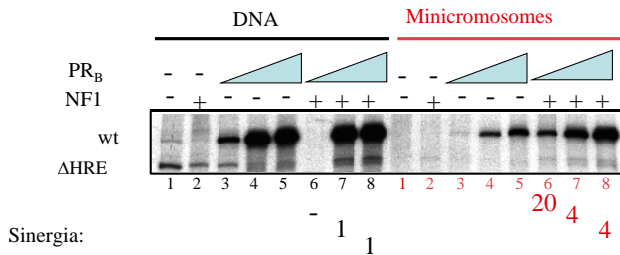


FIGURA 4. Transcripció *in vitro* a partir del promotor de l'MMTV com a DNA nu o com a minicromosomes acoblats en extractes embrionaris de *Drosophila*. El plasmidi MMTV-CAT (bé com a DNA nu o després d'acoblar-se en forma de minicromosomes en extracte d'embrions preblastodèrmics de *Drosophila*) fou usat com a font per a la transcripció amb extractes nuclears de cèl·lules HeLa, en presència dels factors de transcripció indicats (Di Croce *et al.*, 1999). Com a control es va fer servir la mateixa construcció amb els HRE eliminats (Δ HRE). Encara que PR_B activa de manera eficient la transcripció a partir de DNA lliure, NF1 no és gaire actiu i no pot sinergitzar amb PR_B en DNA nu (carrils 1 a 8 negres). En minicromosomes el PR_B sol no és gaire efectiu, però sinergitza de manera efectiva amb NF1 (carrils 1 a 8 grisos). L'extensió de la sinergia s'indica per sota de l'autoradiograma.

unió simultània dels receptors i l'NF1 i el sinergisme funcional.

Pocs minuts després del tractament amb progesterona de cèl·lules de càncer de mama que contenen una còpia del promotor de l'MMTV integrada en els seus cromosomes, un lloc hipersensitiu a DNAasa I característic i definit apareix a prop de l'eix de simetria del nucleosoma que abasta els HRE (Truss *et al.*, 1995). El mateix lloc hipersensitiu es pot induir mitjançant tractament a concentracions moderades d'inhibidors de desacetilases d'histones (HDAC), com són ara el butiric de sodi o la tricostatina A (Bartsch *et al.*, 1996), fet que suggereix que reflecteix una «obertura» de la cromatina a causa de l'augment en l'acetilació de les histones. Durant els darrers deu anys hem dedicat la nostra atenció a entendre la naturalesa del canvi induït per aquesta hormona en l'estructura de la cromatina i com es produeix.

LES LLIÇONS APRESES DELS MINICROMOSOMES ACOBLATS *IN VITRO*

Per a estudiar la bioquímica de la interacció entre els receptors hormonals i el promotor de l'MMTV organitzat en cromatina organitzada hem fet servir sistemes d'acoblament de cromatina que generen cadenes de nucleosomes que mimetitzen el comportament de la cromatina natural. Els millors resultats els vam obtenir amb extractes d'embrions preblastodèrmics de *Drosophila*, que contenen abundants histones nucleosòmiques (histones *core*) i el mecanisme necessari per a un acoblament eficient de la cromatina (Venditti *et al.*, 1996). Els minicromosomes acoblats en aquests extractes mostren el mateix posicionament translacional i rotacional de nucleosomes sobre el promotor de l'MMTV que el que ha estat detectat en la cromatina de cèl·lules de càncer de mama intactes, amb un nucleosoma que ocupa els HRE i els llocs d'unió de NF1. En absència dels factors de transcripció específics de seqüència, aquests minicromosomes de MMTV són silenciats transcripcionalment.

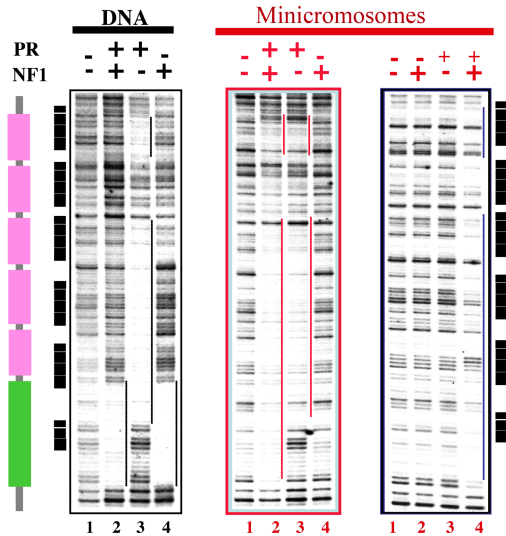


FIGURA 5. Unió de factors al promotor de l'MMTV com a DNA nu o acoblat en forma de minicromosomes. Els experiments de protecció a la DNAasa I foren utilitzats per a detectar l'unió de PR_B i NF1 al promotor de l'MMTV com a DNA lliure (plafó esquerre) o després de l'acoblament en forma de minicromosomes, a concentracions altes de PR_B (plafó central) i a concentracions baixes de PR_B (plafó dret) (Di Croce *et al.*, 1999). S'indiquen les posicions dels HRE i dels llocs d'unió a NF1 i es mostra a l'esquerra un esquema del promotor.

L'addició d'aquests factors de manera individual produeix una estimulació feble per part del PR, i molt poca o gens d'activació per part de NF1. Tanmateix, l'addició dels dos factors junts produeix una forta activació transcripcional sinèrgica (vegeu la figura 4), que és dependent de la preincubació dels minicromosomes amb PR en presència d'ATP, cosa que suggereix que cal un procés remodelador de la cromatina dependent d'ATP (Di Croce *et al.*, 1999). Els experiments preliminars indiquen que el complex responsable d'aquest episodi de remodelatge en extractes embrionaris és NURF (Tsukiyama i Wu, 1995), el qual és reclutat cap als minicromosomes per part de PR (Di Croce *et al.*, 1999).

En experiments de protecció i empremta de DNA a altes concentracions de PR es detecta la unió dependent d'ATP dels receptors als HRE, a la vegada que NF1 és incapaç d'unir-se

al promotor de MMTV en minicromosomes. Tanmateix, la preincubació dels minicromosomes amb PR i ATP facilita la unió de NF1 al promotor i genera una empremta contínua sobre els HRE i el lloc NF1 (vegeu la figura 5, al mig del plafó) (Di Croce *et al.*, 1999), tal com s'ha vist *in vivo* (Truss *et al.*, 1995). Així, en extractes que acoblen cromatina dinàmica es pot reproduir el comportament fisiològic del promotor de l'MMTV.

A concentracions més baixes i fisiològiques de PR no s'observa empremta en el DNA, fins i tot en presència d'ATP, però els nivells baixos de receptor són suficients per a sineritzar amb l'NF1 i generar una empremta contínua sobre els HRE i l'NF1 (vegeu el plafó de la dreta de la figura 5). Aquests resultats indiquen que sota condicions fisiològiques no solament el PR ajuda l'NF1 a unir-se, sinó que també es necessita NF1 per a una unió òptima (Di Croce *et al.*, 1999). És interessant veure com no es necessita el domini de transactivació de NF1 per a aquesta sinergia recíproca amb PR, cosa que suggereix que l'única funció de NF1 és establir la conformació «oberta» del nucleosoma i, d'aquesta manera, facilitar l'accés de PR als HRE ocults.

SORTIDA DELS DÍMERS H2A/H2B *IN VIVO* I *IN VITRO*

Per a identificar l'activitat remodeladora dependent d'ATP involucrada en l'obertura de la cromatina de l'MMTV i definir la naturalesa de la conformació nucleosòmica «oberta», s'han realitzat experiments d'immunoprecipitació de cromatina en cèl·lules T47D de càncer de mama que portaven una sola còpia del promotor de l'MMTV (Truss *et al.*, 1995). Trenta minuts després del tractament amb l'anàleg sintètic de la progesterona R5020, s'ha pogut detectar PR unit al promotor de l'MMTV, juntament amb el coactivador Src-1 i els complexos remodeladors de cromatina Brg1 i SNF2h (vegeu la figura 6) (Vicent *et al.*, 2004). D'a-

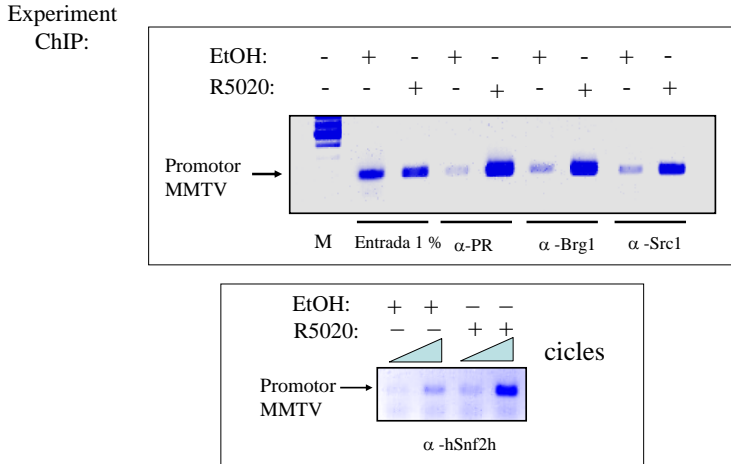


FIGURA 6. Experiments d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) en cèl·lules T47D-ML: segrest de PR, coactivadors i complexos remodeladors de cromatina dependents d'ATP. Les cèl·lules MMTV-ML foren tractades amb el progestàgen sintètic R5020 o amb el vehicle (etanol, EtOH) durant 30 min i sotmeses a experiments ChIP amb la utilització d'anticossos contra PR, el coactivador Src-1, l'ATPasa Brg1 (plafó central) o l'ATPasa hSnf2h (plafó de sota). El control de DNA introduït (1%) i el precipitat foren amplificats mitjançant PCR amb la utilització d'oligos específics per al nucleosoma B del promotor de l'MMTV (Vicent *et al.*, 2004).

questa manera, aquestes dues ATPases remodeladores podrien formar part del complex responsable dels canvis dependents d'ATP en la sensibilitat de la cromatina a nucleases detectades trenta minuts abans de l'exposició a les hormones (Truss *et al.*, 1995). Al mateix temps, hi ha una pèrdua selectiva d'histones H2A i H2B des del nucleosoma B del promotor, però no des dels nucleosomes adjacents C o D (vegeu la figura 7) (Vicent *et al.*, 2004).

Per a provar si els complexos remodeladors dependents d'ATP poden desplaçar les histones H2A i H2B dels nucleosomes de l'MMTV s'han realitzat experiments *in vitro* amb nucleosomes acoblats i el complex γ Swi/Snf aïllat de *Saccharomyces cerevisiae*. Sorprenentment, es va trobar que, en presència d'ATP, γ Swi/Snf podia desplaçar H2A i H2B dels nucleosomes del promotor de l'MMTV, però no dels nucleosomes acoblats del promotor ribosòmic del ratolí en fragments de DNA de la mateixa llargària (vegeu la figura 8) (Vicent *et al.*, 2004). Com que les proteïnes que es van

fer servir en aquest experiment eren altament purificades o recombinants, hem de concloure que la seqüència nucleotídica determina el resultat del procés de remodelatge.

La distinció entre nucleosomes també s'observa en una cadena de nucleosomes. Quan un xip linear de quatre nucleosomes de l'MMTV s'incuba amb γ Swi/Snf i ATP només el nucleosoma B perd H2A i H2B. El nucleosoma C adjacent és remodelat, tal com es demostra amb l'alta accessibilitat a l'enzim de restricció *RsaI*, però conserva els dímers H2A/H2B (vegeu la figura 9) (Vicent *et al.*, 2004).

ELS RECEPTORS HORMONALS I L'NF1 PODEN UNIR-SE AL PROMOTOR DE L'MMTV EN TETRÀMERS H3/H4 POSICIONATS

El desplaçament de tots dos dímers H2A/H2B és un model raonable per a explicar la

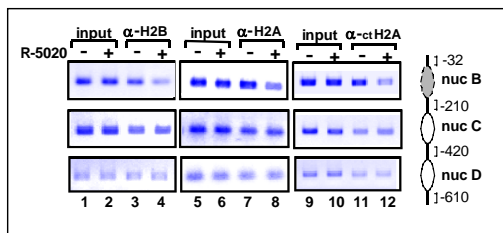


FIGURA 7. Experiments de CHIP en cèl·lules T47D-ML: sortida de H2A i H2B del promotor de l'MMTV a conseqüència de la inducció hormonal. Les cèl·lules MMTV-ML foren tractades amb el progestàgen sintètic R5020 o amb el vehicle dissolvent durant 30 min i sotmeses als experiments de CHIP amb la utilització d'anticossos contra la histona H2B (plafó esquerre), el domini globular de la histona H2A (plafó central) o l'extrem carboxiterminal de la H2A (plafó dret). El control de DNA incorporat i el DNA precipitat foren amplificats amb encebadors específics del nucleosoma B de l'MMTV (fila de dalt), del C (fila del mig) o del D (fila de sota). H2A i H2B només foren desplaçades del nucleosoma B però no dels adjacents C i D (Vicent *et al.*, 2004).

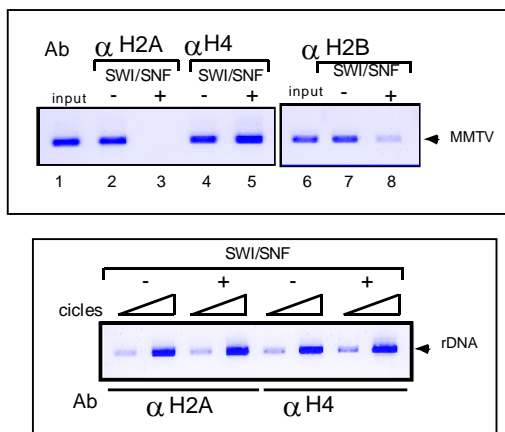


FIGURA 8. Experiments de CHIP amb nucleosomes acoblats *in vitro*: desplaçament de H2A i H2B de l'MMTV però no de nucleosomes rDNA. Els octàmers recombinants d'histona foren usats per a acoblar nucleosomes mitjançant diàlisi salina en fragments de DNA de la mateixa llargària (210 pb), derivats del promotor de l'MMTV o del promotor de l'rDNA del ratolí. Les dues seqüències posicionen el nucleosoma en dos marcs principals de translació. Després de la incubació amb γ SWI/Snf purificat en presència d'ATP, H2A i H2B es perden dels nucleosomes de l'MMTV (plafó central), però no dels nucleosomes rDNA (no es mostren les dades) (Vicent *et al.*, 2004).

sap que un tetràmer d'histones H3 i H4 es posiciona en la seqüència del promotor de l'MMTV d'una manera semblant a l'octàmer d'histones, i que l'NF1 es pot unir a una partícula d'un tetràmer H3/H4 amb una afinitat relativament alta (Spangerberg *et al.*, 1998). La qüestió és si PR pot accedir als HRE centrals en la seqüència de l'MMTV organitzada al voltant d'un tetràmer H3/H4. Per respondre aquesta pregunta, vam realitzar experiments de retardament en gel amb DNA lliure i amb DNA reconstituït al voltant d'un octàmer d'histones o d'un tetràmer d'H3/H4. Els resultats mostren que, mentre que el PR només pot unir-se als HRE exposats en la partícula de l'octàmer, també pot accedir als HRE centrals en la partícula del tetràmer (vegeu la figura 10). Per tant, un tetràmer d'histones H3 i H4 representa un model plausible per a l'estructura de la conformació del nucleosoma «obert» detectat en la inducció hormonal.

LA HISTONA H1 PARTICIPA EN L'OPTIMITZACIÓ DE LA INDUCCIÓ HORMONAL

Els experiments descrits fins ara no tenen en compte les histones internucleosòmiques (histona H1), un component estructural molt important de la cromatina dels metazous. Les histones internucleosòmiques constitueixen una família àmplia de proteïnes que comparteixen un domini globular comú i mostren extensions variables N i C-terminals, amb residus bàsics i llocs de fosforilació per a diverses cinases. El domini globular s'uneix al DNA en el lloc d'entrada i a la pseudodíade, mentre que el domini C-terminal es posa en contacte amb el DNA al lloc de sortida i imposa un canvi en la seva direcció (vegeu la figura 11). L'estructura de l'extensió N-terminal unida no ha estat esbrinada. Un cop vistes aquestes interaccions, es considera que les histones internucleosòmiques segellen el DNA nucleosòmic i, per tant, limiten la di-

unió de PR i NF1 a la cromatina del promotor de l'MMTV en la inducció hormonal? Se

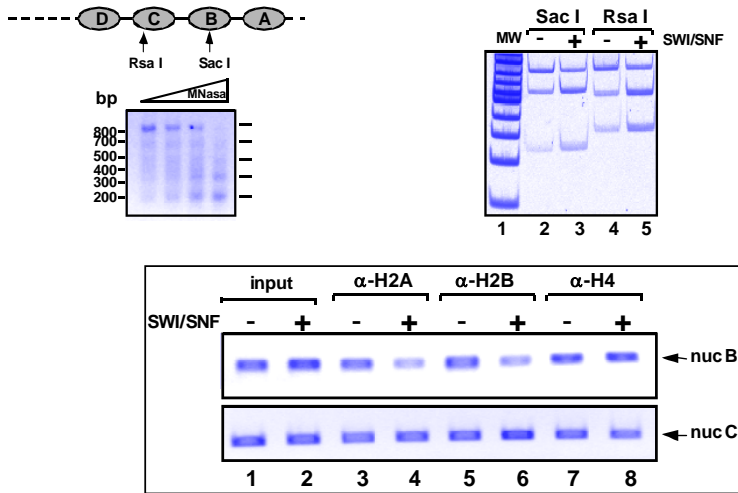


FIGURA 9. Remodelament *in vitro* d'una cadena de nucleosomes mitjançant ySwi/Snf. La meitat 3'-terminal de l'MMTV-LTR fou usada per a generar una cadena de quatre nucleosomes amb la utilització d'histones recombinants i diàlisi salina (plafó esquerre de dalt). La incubació amb ySwi/Snf purificat i ATP va portar al remodelatge dels nucleosomes C i B, tal com es demostra mitjançant una digestió major amb SacI i RsaI, respectivament (plafó dret de dalt). Els experiments de ChIP mostraren que H2A i H2B es perden del nucleosoma B remodelat, però no del C (plafó de sota) (Vicent *et al.*, 2004).

nàmica del nucleosoma. De fet, s'ha vist que en presència de la histona H1 unida, el complex ySwi/Snf no pot remodelar nucleosomes (Horn *et al.*, 2002). A més a més, s'ha investigat el paper de la histona H1 en la inducció hormonal del promotor de l'MMTV. Fent servir mononucleosomes acoblats mitjançant diàlisi salina, s'ha trobat que la histona H1 s'uneix de manera asimètrica als nucleosomes de l'MMTV, amb una preferència clara per l'extrem distal 5' del DNA nucleosòmic (Vicent *et al.*, 2002). D'acord amb el model acceptat, es va trobar que la incorporació de H1 als minicromosomes de l'MMTV augmenta l'espaiament dels nucleosomes i redueix l'accés dels factors generals de transcripció al promotor, tot inhibint d'aquesta manera la transcripció basal (Koop *et al.*, 2003). Tanmateix, els valors absoluts de transcripció i inducció mitjançant una combinació de PR i NF1 foren augmentats en minicromosomes que contenen H1 (Koop *et al.*, 2003).

Aquest efecte inesperat fou degut a un millor posicionament dels nucleosomes en presència de H1 (Vicent *et al.*, 2002) i, com a conseqüència, a una millor unió del PR (Koop *et al.*, 2003; Vicent *et al.*, 2002) *core* i a una proporció més alta de promotors que participaven en la transcripció (Koop *et al.*, 2003). A més, en presència de PR unit, H1 fou fosforilada i, conseqüentment, eliminada del promotor a l'inici de la transcripció (Koop *et al.*, 2003). Llavors, un component estructural de la cromatina que funciona com un repressor general de la transcripció contribueix a una millor regulació d'un promotor induïble mitjançant la reducció de la transcripció basal i la millora de la transcripció induïda.

CROSSTALKS DE SENYALITZACIÓ AMB CASCADES DE CINASES

A part dels efectes nuclears en la trans-

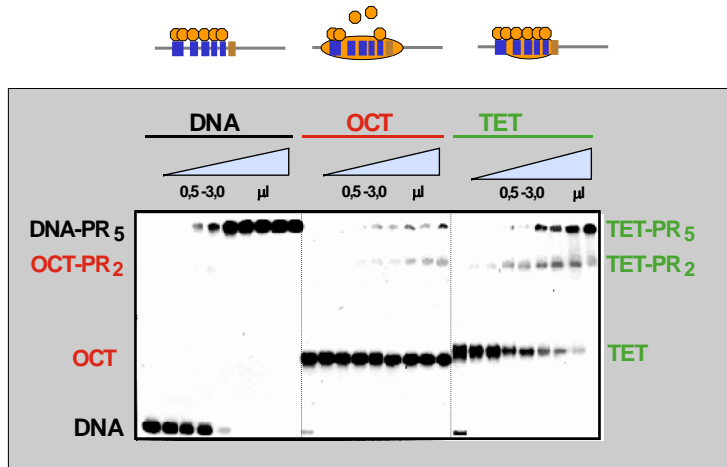


FIGURA 10. El receptor de la progesterona s'uneix a tots els HRE en la superfície del tetràmer de les histones H3 i H4. Els experiments de retardament amb gel amb PR_B i un fragment de DNA corresponen al nucleosoma B del promotor de l'MMTV com a DNA nu (plafó esquerre), com a un octàmer d'histones nucleosòmiques (plafó central) o com a tetràmer d'histones H3 i H4 (plafó dret) (Spangenberg *et al.*, 1998). En DNA lliure es forma una banda migratòria molt lenta ja a baixes concentracions, que correspon a l'ocupació simultània de tots els HRE (DNA-PR₅). En la partícula de l'octàmer es troba molt menys d'aquesta banda migratòria lenta, i es detecta una altra banda de migració ràpida (OCT-PR₂), que correspon a l'ocupació de HRE1 i HRE4; la unió a l'octàmer és de baixa afinitat, tal com es demostra amb la gran quantitat d'octàmer no ocupat (OCT). En el tetràmer H3/H4 la banda de migració més ràpida apareix a concentracions més baixes de PR (TET-PR₂), i s'hi troba una quantitat més elevada de la banda migradora lenta (TET-PR₅); la unió al tetràmer H3/H4 té afinitat més alta que la unió a l'octàmer, tal com es veu amb la gairebé completa desaparició del tetràmer lliure (TET). L'esquema de dalt ofereix una representació gràfica de l'ocupació dels HRE.

cripció, les hormones esteroidees també tenen influència en les rutes de senyalització citoplasmàtiques, particularment en les cascades de cinases. Per exemple, els estrògens que actuen mitjançant el seu receptor nuclear normal, ER α , activen de manera ràpida i transitòria les rutes Src/Ras/Erk (Migliaccio *et al.*, 1996) i PI3K/AKT (Castoria *et al.*, 2001), i aquestes activacions són essencials per a la resposta proliferativa de les cèl·lules de càncer de mama. S'ha vist que la progesterona pot provocar una resposta proliferativa en les cèl·lules de càncer de mama mitjançant un *crossstalk* semblant, però aquest efecte no solament requereix el receptor de progesterona PR_B, sinó que és mitjançat per una interacció amb l'ER α lliure (Migliaccio *et al.*, 1998). L'efecte dels progestàgens en les cascades de

senyalització és inhibit per antiprogestàgens i també per antiestrògens, que són essencials per a la inducció de la proliferació cel·lular (Castoria *et al.*, 1999). Dues regions a la meitat N-terminal del PR_B, l'ERID-I i l'ERID-II, interactuen amb el domini d'unió de lligand d'ER α , i són necessàries per a l'activació de la ruta Src/Ras/Erk (vegeu la figura 12) (Ballare *et al.*, 2003). El PR_B també pot interactuar directament amb el c-Src mitjançant una regió rica en prolina localitzada entre l'ERID-I i l'ERID-II (vegeu la figura 12), però aquesta interacció no és necessària per a l'activació de la cascada Src/Ras/Erk en les cèl·lules de càncer de mama que disposen d'ER α (Ballare *et al.*, 2003). Recentment hem vist que una interacció semblant entre PR_B i Er β és necessària per a la resposta proliferativa a progestàgens

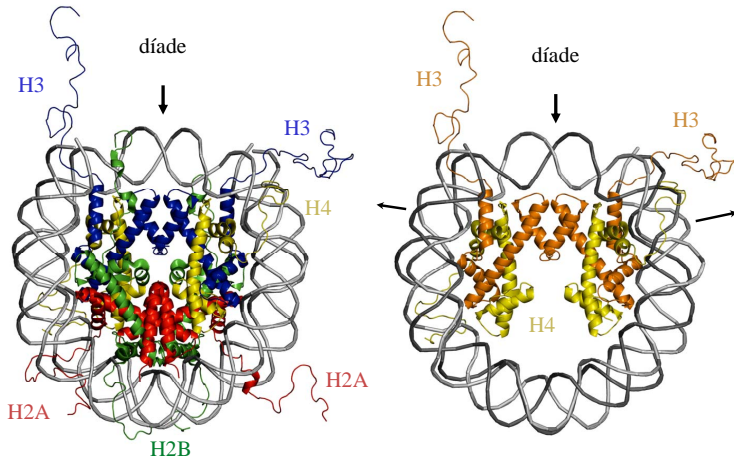


FIGURA 11. Model de la partícula de l'octàmer (plafó esquerre) i del tetràmer H3/H4 (plafó dret), amb el DNA corresponent. La major accessibilitat de la doble hèlix de DNA del tetràmer H3/H4 és evident. A més, la manca de dímers H2A/H2B pot portar a l'estirament dels extrems del DNA nucleosòmic, tal com s'indica amb les fletxes.

en cèl·lules de l'estroma d'endometri, les quals contenen concentracions molt baixes de receptors d'hormona esteroidea, insuficients per a la regulació transcripcional de l'expressió dels gens nuclears (Vallejo *et al.*, 2005).

En experiments pendents de publicar s'ha vist que blocar l'activació per progestàgens de la cascada Src/Ras/Erk no solament inhibeix la proliferació cel·lular, sinó que també té una influència destacada en l'activació dels promotors dels gens reporters clàssics que contenen PRE. Així, el *crossstalk* entre receptors nuclears i rutes de senyalització de cinases té un paper essencial en el control de la resposta cel·lular a les hormones esteroidees gràcies a la connexió de les rutes de senyalització controlades per altres hormones o els factors de creixement que afecten la membrana cel·lular. Resta per esbrinar la influència final de l'activació d'aquestes cascades de senyalització en l'expressió dels gens sensibles a les hormones, però un mecanisme plausible podria implicar la modificació posttraduccional dels elements estructurals de la cromatina.

CONCLUSIONS PRINCIPALS

A partir dels experiments esmentats en aquesta revisió podem concloure que la seqüència nucleotídica del DNA en el promotor de l'MMTV conté informació que determina:

- La posició translacional i rotacional del nucleosoma.
- La resposta del nucleosoma al remodelatge dependent d'ATP mitjançant Swi/Snf.
- La unió asimètrica de la histona H1 al DNA internucleosòmic 5'.

Aquesta influència estructural de la seqüència nucleotídica en l'organització de la cromatina té efecte en la sinergia funcional entre els factors de transcripció específics de seqüència i, així, en la resposta transcripcional del promotor a l'administració de progesterona.

AGRAÏMENTS

El treball experimental esmentat a dalt ha estat finançat mitjançant beques de la Generalitat de Catalunya, el Ministeri d'Educació i Ciència i la Fundació Científica de l'Asociación Española Contra el Cáncer. GPV és un

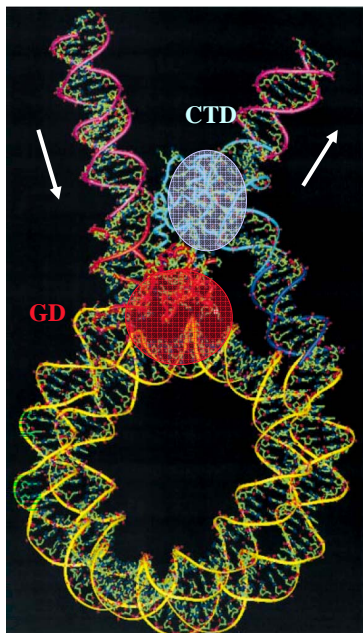


FIGURA 12. Localització de la histona H1 en el DNA nucleosòmic. El domini globular de H1 (a sota) i el domini C-terminal (a dalt) contacten amb el DNA d'entrada, l'eix de simetria i el DNA de sortida, respectivament (Bharath *et al.*, 2003).

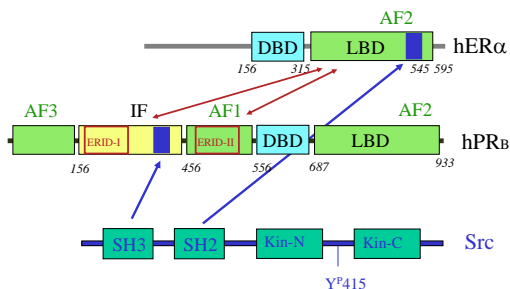


FIGURA 13. Interaccions entre ER α , PR β i c-Src. Representació esquemàtica de l'estructura del domini d'ER α (dalt), PR β (mig) i c-Src (sota). Les interaccions entre ER α i PR β es mostren amb fletxes vermelles, i les interaccions d'ambdós receptors amb c-Src es mostren amb fletxes blaves (Ballare *et al.*, 2003).

membre postdoctoral del Programa Ramón y Cajal.

BIBLIOGRAFIA

- AHE, D. von der; JANICH, S.; SCHEIDERREIT, C.; RENKAWITZ, R.; SCHÜTZ, G.; BEATO, M. (1985). «Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters». *Nature*, 313: 706-709.
- BALLARE, C.; UHRIG, M.; BECHTOLD, T.; SANCHO, E.; DI DOMENICO, M.; MIGLIACCIO, A.; AURICCHIO, F.; BEATO, M. (2003). «Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells». *Mol. Cell. Biol.*, 23: 1994-2008.
- BARTSCH, J.; TRUSS, M.; BODE, J.; BEATO, M. (1996). «Moderate increase in histone acetylation activates the mouse mammary tumor virus promoter and remodels its nucleosome structure». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10741-10746.
- BHARATH, M. M.; CHANDRA, N. R.; RAO, M. R. (2003). «Molecular modeling of the chromatosome particle». *Nucleic Acids Res.*, 31: 4264-4274.
- BRÜGGEMEIER, U.; ROGGE, L.; WINNACKER, E. L.; BEATO, M. (1990). «Nuclear factor I acts as a transcription factor on the MMTV promoter but competes with steroid hormone receptors for DNA binding». *EMBO J.*, 9: 2233-2239.
- CASTORIA, G.; BARONE, M. V.; DI DOMENICO, M.; BILANCIO, A.; AMETRANO, D.; MIGLIACCIO, A.; AURICCHIO, F. (1999). «Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis». *EMBO J.*, 18: 2500-2510.
- CASTORIA, G.; MIGLIACCIO, A.; BILANCIO, A.; DI DOMENICO, M.; DE FALCO, A.; LOMBARDI, M.; FIORENTINO, R.; VARRICCHIO, L.; BARONE, M. V.; AURICCHIO, F. (2001). «PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells». *EMBO J.*, 20: 6050-6059.
- CATO, A. C. B.; HENDERSON, D.; PONTA, H. (1987). «The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region». *EMBO J.*, 6: 363-368.
- CHALEPAKIS, G.; ARNEMANN, J.; SLATER, E. P.; BRÜLLER, H.; GROSS, B.; BEATO, M. (1988). «Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus». *Cell*, 53: 371-382.
- CHANDLER, V. L.; MALER, B. A.; YAMAMOTO, K. R. (1983). «DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo». *Cell*, 33: 489-499.
- DI CROCE, L.; KOOP, R.; VENDITTI, P.; WESTPHAL, H. M.; NIGHTINGALE, K.; BECKER, P.; BEATO, M. (1999). «Two-steps synergism between progesterone receptor and the DNA binding domain of NF1 on MMTV minichromosomes». *Mol. Cell*, 4: 45-54.
- EISFELD, K.; CANDAU, R.; TRUSS, M.; BEATO, M. (1997).

- «Binding of NF1 to the MMTV promoter in nucleosomes: Influence of rotational phasing, translational positioning and histone H1». *Nucleic Acids Res.*, 25: 3733-3742.
- HORN, P. J.; CARRUTHERS, L. M.; LOGIE, C.; HILL, D. A.; SOLOMON, M. J.; WADE, P. A.; IMBALZANO, A. N.; HANSEN, J. C.; PETERSON, C. L. (2002). «Phosphorylation of linker histones regulates ATP-dependent chromatin remodeling enzymes». *Nat. Struct. Biol.*, 9: 263-267.
- KALFF, M.; GROSS, B.; BEATO, M. (1990). «Progesterone receptor stimulates transcription of mouse mammary tumour virus in a cell-free system». *Nature*, 344: 360-362.
- KOOP, R.; DI CROCE, L.; BEATO, M. (2003). «Histone H1 enhances synergistic activation of the MMTV promoter in chromatin». *EMBO J.*, 22: 588-599.
- MIGLIACCIO, A.; DI, D. M.; CASTORIA, G.; DE, F. A.; BONTEMPO, P.; NOLA, E.; AURICCHIO, F. (1996). «Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol- receptor complex in MCF-7 cells». *EMBO J.*, 15: 1292-1300.
- MIGLIACCIO, A.; PICCOLO, D.; CASTORIA, G.; DI DOMENICO, M.; BILANCIO, A.; LOMBARDI, M.; GONG, W.; BEATO, M.; AURICCHIO, F. (1998). «Activation of the *src/p21^{ras}/erk* pathway by progesterone receptor via a crosstalk with estrogen receptor». *EMBO J.*, 17: 2008-2018.
- PAYVAR, F.; DEFRANCO, D.; FIRESTONE, G. L.; EDGAR, B.; WRANGE, Ö.; OKRET, S.; GUSTAFSSON, J. A.; YAMAMOTO, K. R. (1983). «Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region». *Cell*, 35: 381-392.
- PIÑA, B.; BRÜGGEMEIER, U.; BEATO, M. (1990). «Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter». *Cell*, 60: 719-731.
- RICHARD-FOY, H.; HAGER, G. L. (1987). «Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter». *EMBO J.*, 6: 2321-2328.
- SCHEIDEREIT, C.; GEISSE, S.; WESTPHAL, H. M.; BEATO, M. (1983). «The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus». *Nature*, 304: 749-752.
- SPANGENBERG, C.; EISEL, K.; STÜNKEL, W.; LUGER, K.; FLAUS, A.; RICHMONDS, T. J.; TRUSS, M.; BEATO, M. (1998). «The MMTV promoter positioned on a tetramer of histones H3 and H4 binds nuclear factor 1 and OTF1». *J. Mol. Biol.*, 278: 725-739.
- TRUSS, M.; BARTSCH, J.; SCHELBERT, A.; HACHÉ, R. J. G.; BEATO, M. (1995). «Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*». *EMBO J.*, 14: 1737-1751.
- TSUKIYAMA, T.; WU, C. (1995). «Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodelling factor». *Cell*, 83: 1011-1020.
- VALLEJO, G.; BALLARÉ, C.; BARAÑAO, L.; BEATO, M.; SARAGÜETA, P. (2005). «Progesterone activation of non-genomic pathways via crosstalk of PR with ER induces proliferation of endometrial stromal cells». *Mol. Endocrinol.*, publicat el 14 de juny de 2005 com a doi:10.1210/me.2005-0016.
- VENDITTI, P.; DI CROCE, L.; KAUER, M.; BLANK, T.; BECKER, P. B.; BEATO, M. (1998). «Assembly of the MMTV promoter in minichromosomes with positioned nucleosomes precludes NF1 binding but not restriction enzyme cleavage». *Nucleic Acids Res.*, 26: 3657-3666.
- VICENT, G. P.; MELIÀ, M. J.; BEATO, M. (2002). «Asymmetric binding of histone H1 stabilizes MMTV nucleosomes and the interaction of progesterone receptor with the exposed HRE». *J. Mol. Biol.*, 324: 501-517.
- VICENT, G. P.; NACHT, A. S.; SMITH, C. L.; PETERSON, C. L.; DIMITROV, S.; BEATO, M. (2004). «DNA instructed displacement of H2A and H2B at an inducible promoter». *Mol. Cell*, 16: 439-452.
- ZARET, K. S.; YAMAMOTO, K. R. (1984). «Reversible and persistent changes in chromatin structure accompanying activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element». *Cell*, 38: 29-38.