



***Dottorato di Ricerca in
Genetica e Biologia Cellulare - XVIII ciclo***

***IL FATTORE DI RIMODELLAMENTO DELLA
CROMATINA BRM
HA UN RUOLO SPECIFICO NEL CORSO DEL
DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE***

s.s.d.: BIO-11

Sonia Albini
***Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare
CNR, Roma***

Coordinatore: Prof. Luigi Bosco

Docenti guida: Dr. Armando Felsani e Dr.ssa Maurizia Caruso

INDICE

INDICE.....	1
INTRODUZIONE	3
IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE.....	3
I mioblasti come sistema modello per lo studio dei meccanismi che controllano la proliferazione ed il differenziamento cellulare.....	3
I fattori regolatori miogenici	6
Espressione dei fattori regolatori miogenici e loro ruolo durante l'embriogenesi	6
Struttura e funzione dei fattori regolatori miogenici	7
I regolatori negativi della miogenesi	8
Domini funzionali di MyoD	9
I fattori MEF2: MEF2C ha un ruolo specifico nel differenziamento muscolare scheletrico.....	12
RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA	14
Complessi di rimodellamento della cromatina e loro ruolo nella regolazione della miogenesi.....	14
Acetiltrasferasi e deacetilasi	14
Complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti	16
Specificità funzionali dei complessi SWI/SNF	20
Rimodellamento della cromatina e controllo della proliferazione cellulare.....	24
RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE	27
Premessa	27
Regolazione di cicline e Cdk durante la miogenesi.....	27
Il differenziamento muscolare è caratterizzato dall'induzione di regolatori negativi della proliferazione	28
pRb controlla l'arresto del ciclo cellulare ed il differenziamento muscolare.....	29
Considerazioni finali	33
Scopo del lavoro	34
RISULTATI	35
Il differenziamento miogenico è associato ad un incremento dei livelli di espressione di Brm.....	35
Caratterizzazione del ruolo delle regioni funzionali di Brm nel corso del differenziamento muscolare	38
L'attività miogenica di MyoD è compromessa in assenza di Brm.....	42
La reintroduzione di Brm in cellule Brm ^{-/-} ripristina l'espressione dei fattori miogenici	45
Cloni derivati da MEFs Brm ^{-/-} che esprimono stabilmente Brm recuperano le capacità differenziali.....	47
Analisi del reclutamento dei complessi Swi/Snf e di attivatori trascrizionali sui promotori muscolo-specifici nei cloni che esprimono stabilmente la proteina Brm...	49
Analisi delle interazioni tra Brm e i fattori miogenici.....	52
Mioblasti Rb ^{-/-} esprimono bassi livelli della proteina Brm	54
Metodo sperimentale in corso per lo studio di BRG1	58
DISCUSSIONE	61
MATERIALI E METODI	71
Linee cellulari e condizioni di coltura	71
Trasfezioni e saggi luciferasici	72
Costrutti plasmidici	73

Infezione delle cellule con Retrovirus	74
Infezione delle cellule con Adenovirus	74
Immunorecipitazione e Western blot.....	75
Immunofluorescenza	76
Immunoprecipitazione della cromatina	77
Estrazione di RNA da colture cellulari e RT-PCR.....	79
BIBLIOGRAFIA	81

INTRODUZIONE

IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

I mioblasti come sistema modello per lo studio dei meccanismi che controllano la proliferazione ed il differenziamento cellulare

La proliferazione ed il differenziamento sono due processi cellulari strettamente collegati, posti sotto il controllo di specifiche categorie di geni regolatori. In molti tipi cellulari i programmi genetici che regolano l'espressione genica durante la proliferazione ed il differenziamento si escludono a vicenda. L'antagonismo tra i suddetti processi è evidente durante lo sviluppo, quando molti tipi di cellule non differenziano terminalmente se non dopo essere uscite dal ciclo cellulare in maniera irreversibile. La controparte di tale situazione si riscontra invece nelle cellule tumorali, nelle quali la proliferazione incontrollata è associata alla perdita delle caratteristiche cellulari tipiche del differenziamento terminale.

Lo studio dei meccanismi d'azione dei fattori di crescita e degli oncogeni cellulari e virali nella regolazione del ciclo cellulare ha dato un forte contributo alla comprensione dei meccanismi che governano l'esclusione reciproca tra proliferazione e differenziamento terminale. In particolare, sono stati ben caratterizzati alcuni meccanismi molecolari che inibiscono i segnali differenziativi nelle cellule proliferanti e, viceversa, altri che impediscono la proliferazione delle cellule differenziate (Maione and Amati, 1997; Kitzmann and Fernandez, 2001). In questo ambito, uno dei sistemi cellulari che ha fornito maggiori informazioni è quello delle cellule muscolari scheletriche, per vari motivi: 1) sono disponibili varie linee cellulari miogeniche capaci di differenziare terminalmente in vitro, 2) sono stati identificati molti geni codificanti proteine muscolo-specifiche, espresse nei miociti differenziati, 3) sono stati identificati elementi regolativi in cis (promotori ed enhancers) che controllano la loro espressione tessuto-specifica, 4) sono stati identificati i geni codificanti per una famiglia di fattori regolatori muscolo specifici (il cui capostipite è il fattore trascrizionale MyoD), che determinano l'identità delle cellule muscolari scheletriche e che inducono la trascrizione dei geni del differenziamento terminale.

Il nostro principale modello sperimentale è rappresentato dalla linea miogenica murina C2, il cui processo differenziativo è illustrato schematicamente in Figura 1. I mioblasti C2 possono essere mantenuti nella loro forma non differenziata se coltivati in

terreno contenente una alta concentrazione di siero (terreno di crescita: GM). Nei mioblasti proliferanti il fattore regolatore MyoD è espresso, ma la sua funzione transattivante è controllata negativamente dai fattori di crescita del siero tramite vari meccanismi. Per indurre il differenziamento terminale i mioblasti vengono trasferiti in terreno contenente bassa concentrazione di siero (terreno di differenziamento: DM); in queste condizioni l'attività di MyoD viene derepressa ed i mioblasti escono dal ciclo cellulare, si orientano e fondono per dare origine a miotubi multinucleati. Contemporaneamente agli evidenti cambiamenti morfologici, si verifica l'espressione dei geni specifici del differenziamento terminale. La transizione da mioblasto precursore a fibra muscolare multinucleata è accompagnata da notevoli cambiamenti nella sintesi e nell'accumulo di proteine specifiche.

In particolare durante il differenziamento si osserva:

1. aumento della sintesi di proteine miofibrillari, come l'actina muscolare scheletrica, le catene pesanti e leggere della miosina, le isoforme muscolari della tropomiosina e della troponina.
2. aumento dell'attività di enzimi intracellulari come la creatina fosfochinasi muscolare, e la glicogeno fosforilasi.
3. sintesi de novo di acetilcolinesterasi e del recettore per l'acetilcolina.

Lo stadio finale della miogenesi è la maturazione della fibra muscolare: nei miotubi contenenti centinaia di nuclei compaiono striature trasversali dovute all'assemblaggio delle miofibrille e alla formazione dei sarcomeri; dopo pochi giorni in coltura in condizioni di differenziamento, i miotubi diventano eccitabili e capaci di contrarsi spontaneamente.

Tale tipo di differenziamento è irreversibile, infatti i miotubi differenziati non possono essere indotti né a rientrare nel ciclo cellulare né a proliferare se posti nuovamente in presenza di fattori di crescita.

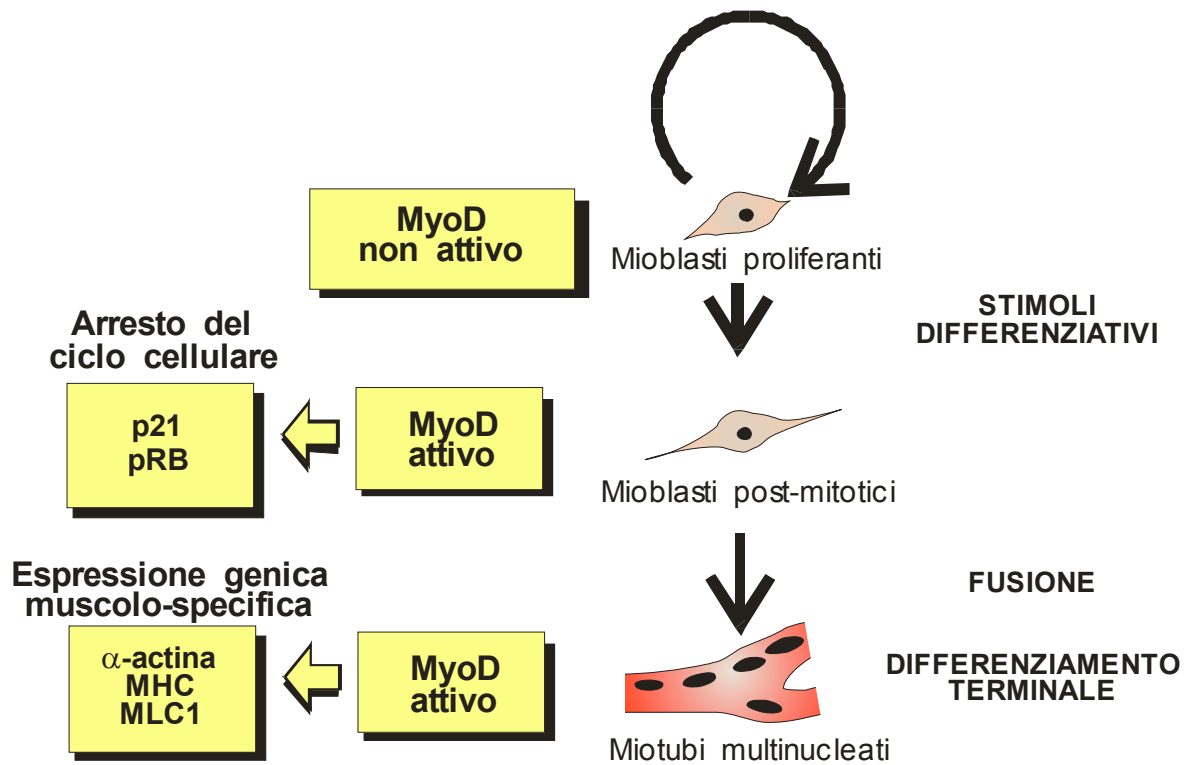


Figura 1. Differenziamento delle cellule miogeniche C2.

Rappresentazione schematica del processo di differenziamento terminale dei mioblasti scheletrici della linea C2. Come indicato, stimoli pro-differenziativi attivano il fattore miogenico MyoD che agisce da regolatore bifunzionale, promuovendo l'arresto proliferativo dei mioblasti e attivando la trascrizione dei geni strutturali muscolo-specifici.

I fattori regolatori miogenici

Espressione dei fattori regolatori miogenici e loro ruolo durante l'embriogenesi

La famiglia di fattori regolatori miogenici (Muscle Regulatory Factors: MRFs) include quattro membri (Figura 2): MyoD (il capostipite della famiglia), miogenina, Myf5 e MRF4, identificati sulla base della loro capacità di convertire fibroblasti embrionali ed altre cellule non muscolari in mioblasti scheletrici (Davis et al., 1987; Wright et al., 1989; Edmondson and Olson, 1989; Braun et al., 1989; Rhodes and Konieczny, 1989; Miner and Wold, 1990; Braun et al., 1990).

L'espressione dei fattori regolatori miogenici è limitata alle cellule muscolari scheletriche. I mioblasti della linea C2 esprimono, in condizioni di proliferazione sia MyoD che Myf5. Recentemente è stato evidenziato che i livelli di questi due fattori miogenici oscillano in maniera opposta nel corso del ciclo cellulare: MyoD è assente in G0, raggiunge un picco di espressione durante la fase G1, diminuisce durante la transizione G1/S; Myf-5, invece, è altamente espressa in fase G0, diminuisce durante la fase G1 e poi risale alla fine della G1 per rimanere stabile fino alla mitosi. (Kitzmann et al., 1998). Per quanto riguarda gli altri due fattori regolatori miogenici, miogenina viene indotto nella fase iniziale del differenziamento, non appena i mioblasti vengono trasferiti in terreno di differenziamento, ed i trascritti di MRF4 in genere si accumulano più tardivamente nei miotubi differenziati (Smith et al., 1994; Cornelison and Wold, 1997).

I fattori regolatori miogenici possono sia autoregolarsi che transattivare l'espressione degli altri geni della famiglia, questo complesso circuito regolatorio sembra essere necessario, almeno in vitro, per l'induzione ed il mantenimento dell'espressione degli MRF durante la determinazione ed il differenziamento muscolare (Weintraub, 1993). L'esistenza di circuiti auto- e cross-regolatori tra gli MRF rende certamente complessa l'identificazione della loro funzione specifica. Alcuni chiarimenti al riguardo sono stati forniti dall'analisi dei topi knock-out per ciascun fattore e dai reciproci incroci; il quadro che emerge da questi studi è che MyoD e Myf5 svolgono un ruolo essenziale nella specificazione del fenotipo muscolare, cioè nella generazione e nel mantenimento dell'identità dei mioblasti scheletrici (Rudnicki et al., 1992; Rudnicki et al., 1993). Infatti, nei topi doppi mutanti (MyoD^{-/-} Myf5^{-/-}) mancano completamente sia fibre muscolari

scheletriche che mioblasti e le cellule progenitrici restano multipotenti, cioè capaci di adottare destini cellulari diversi da quello muscolare. Miogenina e MRF4, invece, sono coinvolti rispettivamente nell'attivazione di geni del differenziamento terminale e nella formazione e maturazione di fibre muscolari funzionali (Hasty et al., 1993; Olson et al., 1996). I risultati di un recente lavoro mettono in discussione questo paradigma perché dimostrano che il muscolo scheletrico può svilupparsi in assenza di MyoD e Myf5 se l'espressione di MRF4 non viene compromessa. È stato infatti dimostrato che MRF4 viene espresso transientemente nelle cellule progenitrici muscolari prima che venga espresso MyoD e può quindi istruire queste cellule ad adottare il destino muscolare anche in assenza di MyoD e Myf5 (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Come spiegare la discrepanza di questi risultati recenti con quelli ottenuti in passato in topi $MyoD^{-/-}$ $Myf5^{-/-}$? Il gene MRF4 è adiacente al gene Myf5, quindi è possibile che l'inserzione di sequenze estranee nel genoma dei topi $MyoD^{-/-}$ $Myf5^{-/-}$ generati in precedenza abbia compromesso sequenze endogene che regolano l'espressione di MRF4 localizzate in vicinanza del locus Myf5

Struttura e funzione dei fattori regolatori miogenici

I fattori regolatori miogenici sono dei fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia “basic helix-loop-helix” (bHLH), in quanto contengono un dominio basico coinvolto nel legame al DNA ed un dominio HLH, necessario per formare omodimeri o eterodimeri con altre proteine contenenti domini HLH. Il motivo bHLH è presente in molti altri fattori trascrizionali sia espressi ubiquitariamente che in maniera tessuto-specifica (Murre et al., 1989; Jan and Jan, 1993). Affinchè le proteine della famiglia MyoD acquisiscano attività transattivante in vivo è necessaria la loro eterodimerizzazione con le proteine bHLH ubiquitarie E12 ed E47 (Lassar et al., 1991). In generale, i dimeri formati dalle proteine bHLH differiscono nelle loro capacità di legare il DNA; ad esempio gli eterodimeri MyoD/E47 legano fortemente il DNA, mentre gli omodimeri MyoD/MyoD legano il DNA solo in maniera debole. La regione basica dei fattori bHLH miogenici riconosce specificamente la sequenza consenso CANNTG, denominata E-box. Sequenze E-Box sono state identificate nelle regioni promotore ed enhancer di diversi geni muscolo-specifici, quali i geni della catena leggera della miosina, dell' α -actina cardiaca, della troponina, della subunità α del recettore dell'acetilcolina, della creatina chinasi muscolare (Li and Olson, 1992). La specificità di legame dei fattori miogenici per le sequenze E-box presenti

nelle regioni regolative dei geni muscolari dipende non solo dalla sequenza nucleotidica specifica delle E-box ma anche da sequenze adiacenti (Weintraub et al., 1994) (vedi oltre).

Il dominio basico di tutti i fattori regolatori miogenici contiene alcuni amminoacidi altamente conservati che sono invece assenti nell'analogo dominio basico di proteine bHLH non miogeniche. La sostituzione di questi amminoacidi nelle posizioni corrispondenti del dominio basico di proteine bHLH ubiquitarie conferisce a queste ultime specificità miogenica (Davis et al., 1990; Davis and Weintraub, 1992). È stato proposto che il legame del dominio basico al DNA induca un cambiamento conformazionale che permette agli MRF di interagire tramite il loro dominio transattivante con fattori co-regolatori che ne promuovono l'attività transattivante tessuto-specifica (Ma et al., 1994). Inoltre, gli MRF possono interagire e sinergizzare con i fattori trascrizionali della famiglia MEF2, che legano specificamente siti adiacenti alle sequenze E-Box nelle regioni regolative di molti geni muscolo-specifici. I fattori MEF2 da soli non possono attivare i geni muscolari ma potenziano l'attività trascrizionale dei fattori bHLH e sono indispensabili per il differenziamento muscolare in vivo e in vitro (Black and Olson, 1998).

I regolatori negativi della miogenesi

L'attività trascrizionale dei fattori miogenici è inibita da una famiglia di proteine, denominate proteine Id, contenenti un dominio helix-loop-helix ma prive di un dominio basico. Queste proteine eterodimerizzano con le proteine miogeniche bHLH e ancor più specificamente con le proteine E, ma tali eterodimeri non sono in grado di legare il DNA. La loro presenza, quindi, interferisce con la formazione di eterodimeri funzionali MRF/proteine E. Dato che la trascrizione delle proteine Id è indotta da fattori di crescita, esse sono espresse ad alti livelli nei mioblasti proliferanti dove agiscono sequestrando E12 ed E47 e impedendo così la formazione del complesso eterodimerico con MyoD, evento cruciale per l'inizio del differenziamento muscolare. Quando i mioblasti sono trasferiti in terreno di differenziamento, l'espressione delle proteine Id è inibita e ciò consente quindi l'interazione tra i fattori miogenici bHLH e le proteine E e il legame al DNA bersaglio con conseguente avvio del programma differenziativo (Zhu et al., 1995).

Twist, è un'altra proteina inibitoria della miogenesi (Rohwedel et al., 1995; Hebrok et al., 1997). Essa si lega ai fattori bHLH e alle proteine E, ma a differenza di Id, è ancora capace di legare il DNA. L'eterodimero Twist/proteina E compete con i complessi

bHLH/proteina E per le E-Box. Inoltre, è stato visto che Twist interagisce con MEF2 bloccando il sinergismo tra i fattori MEF2 e MyoD.

Domini funzionali di MyoD

L'attività trascrizionale di MyoD e la sua capacità di legame al DNA sono processi finemente e altamente regolati; come è ovvio per un fattore trascrizionale, che una volta espresso, attiva l'intero programma del differenziamento muscolare.

Come detto precedentemente, MyoD forma eterodimeri con le proteine ubiquitarie E attraverso il suo dominio bHLH a livello delle E-box dei geni muscolo-specifici. Eppure le sequenze E-box si trovano frequentemente nel genoma e non solo nelle regioni regolatorie dei geni muscolari. È stato determinato che MyoD forma dei complessi stabili col DNA quando sono presenti due E-box adiacenti ed è quindi probabile che entrino in gioco alcune interazioni intermolecolari che permettono la stabilizzazione del legame di MyoD, probabilmente attraverso cambiamenti conformazionali. Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che alcuni fattori, quali MEF2, Sp1, Pbx e Meis, possono sostituire funzionalmente una seconda E-box stabilendo un'interazione con MyoD; queste interazioni di MyoD con fattori adiacenti sembra cruciale per la formazione di un complesso trascrizionale stabile (Biesiada et al., 1999; Knoepfler et al., 1999). Oltre al legame cooperativo, l'interazione tra i cofattori e le interazione tra proteine e sequenze di DNA specifiche possono alterare la conformazione del complesso di MyoD e alla conseguente esposizione della sua regione transattivante. Infatti, MyoD, così come le altre proteine bHLH, possiedono un set conservato di amminoacidi nella regione basica che influenza la sua attività trascrizionale quando è legato al DNA, piuttosto che la sua specificità di legame; questo cosiddetto "codice" miogenico potrebbe essere coinvolto nell'interazione con i cofattori miogenici come è stato visto con i fattori MEF2??? (Molkentin et al., 1995).

I domini fiancheggianti la regione bHLH sono responsabili dell'attivazione trascrizionale dei fattori regolatori miogenici e sono le sequenze meno conservate nella famiglia. È stato infatti dimostrato che l'attivazione trascrizionale iniziale dei geni muscolo-specifici da parte di MyoD richiede due domini della proteina: un dominio di attivazione trascrizionale (AD) e una regione ricca in cisteine ed istidine (dominio HC), importante per l'interazione col complesso Pbx/Meis.

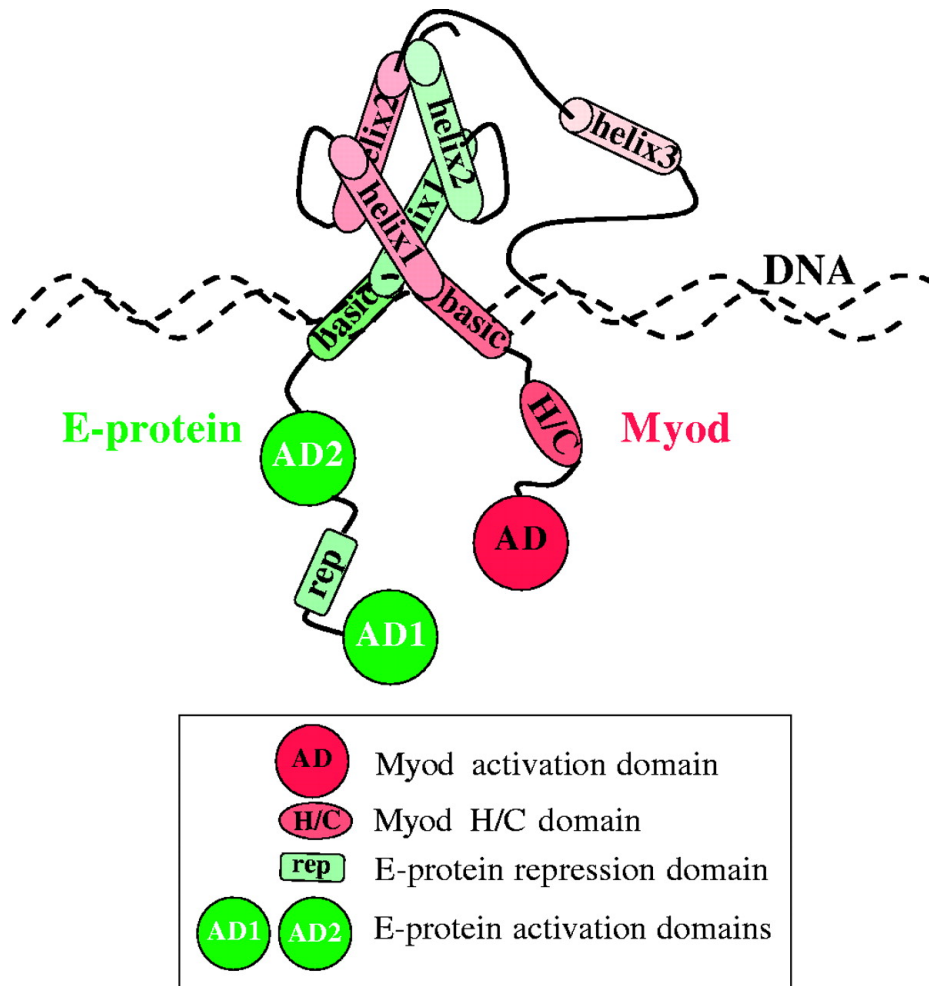


Figura 2. I domini funzionali di MyoD.

MyoD e le proteine E formano eterodimeri attraverso i rispettivi domini elica-ansa-elica (helix 1 e helix 2). Le regioni basiche adiacenti legano il DNA e possiedono una sub-regione costituita da tre residui, conservati in tutte le proteine bHLH, chiamata “myogenic code”. Tale regione non serve a legare il DNA ma è necessaria per attivare la trascrizione dei geni muscolari interagendo con co-fattori e/o inducendo cambiamenti conformazionali. MyoD ha un singolo dominio di attivazione (AD) e una regione ricca di istidina e cisteina (H/C) necessaria per il legame di MyoD al complesso Pbx/Meis. Oltre a questi domini, è richiesta anche la regione helix 3 per il legame di MyoD al complesso Pbx/Meis presente sul promotore della miogenina. Le proteine E hanno due domini di attivazione indipendenti (AD1 e AD2) ed un dominio che può reprimere la funzione di tali domini (rep).

Studi recenti hanno messo in luce che MyoD per essere reclutato sul promotore del gene miogenina necessita di un secondo dominio distinto dalla regione basica, situato al C-terminale (dominio helix III). Tramite questi domini, MyoD interagisce con un complesso contenente le proteine homeobox Pbx e Meis che è legato costitutivamente al promotore di miogenina. Questa interazione consentirebbe il reclutamento di MyoD su una E-box non-canonica adiacente al sito di legame del complesso Pbx-Meis. (Berkes et al., 2004). Le regioni funzionali di MyoD sono schematizzate nella figura 2.

Studi mirati a comprendere come MyoD possa accedere alla cromatina nativa hanno dimostrato che MyoD è in grado di iniziare un rimodellamento della cromatina sui loci dei geni miogenina, Mck e MyoD stesso (Gerber et al., 1997). Successivamente è stato anche visto che tale rimodellamento è solo parziale e che altri fattori indotti da MyoD cooperano a indurre alterazioni più estese della configurazione cromatinica nel corso del differenziamento. Le acetiltrasferasi p300 e P/CAF contribuiscono all'attività di rimodellamento della cromatina esplicita da MyoD. Infatti, è stato dimostrato che l'acetilazione di MyoD è richiesta per la piena attivazione della proteina; MyoD si lega direttamente a p300 che, a sua volta, recluta P/CAF fino a formare un complesso con due distinte attività acetiltrasferiche. (Puri et al., 1997b; Puri et al., 1997a; Sartorelli et al., 1997; Sartorelli et al., 1999). Studi in vitro hanno dimostrato che p300 acetila gli istoni mentre P/CAF acetila i residui di lisina su una regione di MyoD adiacente al suo dominio di legame al DNA; entrambe queste attività sono necessarie per la piena attivazione trascrizionale da parte di MyoD (Dilworth et al., 2004).

E' stato recentemente dimostrato che, per iniziare la trascrizione dei geni muscolari, MyoD necessita, oltre che delle acetiltrasferasi, anche dei complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti SWI/SNF (vedi oltre). Infatti, l'inibizione dell'attività dei complessi SWI/SNF compromette l'abilità di MyoD di iniziare la trascrizione dei geni muscolari (de la Serna et al., 2001a). Come è stato accennato sopra, sono richiesti due domini funzionali di MyoD (dominio H/C e helix 3) per il reclutamento del complesso SWI/SNF, infatti mutazioni in questi due domini impediscono l'inizio del rimodellamento della cromatina sui promotori target.

Infine, MyoD appare coinvolto nella regolazione dei geni muscolari durante tutte le fasi del programma differenziativo, dalla determinazione della cellula in senso muscolare fino al differenziamento terminale. Infatti, MyoD si lega sia ai promotori dei geni precoci che a quelli dei geni tardivi del differenziamento e recentemente è stato proposto un

modello secondo il quale MyoD regola la sua stessa attività attraverso un circuito definito “feed-forward” (Penn et al., 2004). In questo modello, la regolazione temporale dell’espressione genica sarebbe determinata dalla richiesta di fattori regolati da MyoD, a livello dei promotori specifici. Ciò equivale a dire che il momento in cui MyoD può attivare i geni tardivi è imposto dalla disponibilità di fattori che sono indotti da MyoD in un tempo precedente. Questo modello riflette meglio il ruolo di MyoD come fattore attivo per tutto il differenziamento muscolare e supererebbe il modello riduttivo secondo cui l’attività di MyoD è un evento iniziale che, a cascata, porterebbe all’attivazione di altri eventi chiave per il raggiungimento del fenotipo terminalmente differenziato.

I fattori MEF2: MEF2C ha un ruolo specifico nel differenziamento muscolare scheletrico

Un’altra famiglia di fattori di trascrizione che svolge un ruolo importante nella regolazione del differenziamento muscolare è rappresentata dai fattori MEF2 (myocyte enhancer factor 2), caratterizzate da un dominio detto MADS box (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor). Nei vertebrati sono stati identificati quattro geni *mef2*, denominati *mef2a*, *-b*, *-c*, e *d* (Black and Olson, 1998). Le isoforme muscolo-specifiche delle proteine MEF2, che vengono indotte durante il differenziamento dei mioblasti, o in seguito all’espressione ectopica di MyoD o miogenina (Cserjesi and Olson, 1991), riconoscono una sequenza specifica ricca in A/T presente nella regione regolativa di molti geni muscolo-specifici (Olson et al., 1995). Siti MEF2 sono presenti anche nella regione regolativa dei geni MRF; ad esempio le proteine MEF2 sono necessarie per l’espressione di miogenina e MRF4 (Cheng et al., 1993). Questo suggerisce che MEF2 ed i regolatori miogenici bHLH sono coinvolti in un circuito di regolazione reciproca a feed-back positivo. L’interazione funzionale tra queste due famiglie di fattori di trascrizione è, in realtà più complessa; infatti, i fattori MRF e MEF2 possono attivare promotori muscolo-specifici in maniera sinergica. Questa cooperazione dipende dall’interazione diretta tra le due classi di proteine e permette l’attivazione di promotori contenenti siti E-box e/o MEF2 (Kaushal et al., 1994; Molkentin et al., 1995).

L’attività trascrizionale dei fattori MEF2 è modulata tramite vari meccanismi, tra cui modificazioni post-traduzionali della proteina; ad esempio, la fosforilazione della regione transattivante di MEF2 mediata dalla MAP chinasi p38 ne promuove l’attività trascrizionale (Han et al., 1997). L’attività di MEF2 è anche controllata tramite interazione

con cofattori dotati di attività enzimatica. È stato infatti dimostrato che MEF2 può associarsi sia alla acetiltrasferasi p300/CBP che alla arginina-metiltrasferasi CARM1 e che queste interazioni inducono l'attività trascrizionale di MEF2 (Sartorelli et al., 1997; Chen et al., 2002). Inoltre, MEF2 interagisce fisicamente con le iston-deacetilasi, che ne modulano negativamente l'attività (vedi oltre).

I fattori MEF2 sono bersaglio di segnali di crescita e differenziamento, infatti oltre a regolare il differenziamento muscolare scheletrico, sono anche implicati nella morfogenesi cardiaca, nello sviluppo vascolare e nel differenziamento neurale (Edmondson et al., 1994; Lyons et al., 1995; Ticho et al., 1996; Lin et al., 1997). E' stato inoltre visto i fattori MEF2 sono implicati nella sopravvivenza neuronale e nell'apoptosi dei timociti, e che queste attività di MEF2 sono regolate da segnali calcio-dipendenti (Mao and Wiedmann, 1999; Youn et al., 1999).

Recenti lavori hanno contribuito ad identificare MEF2C come il fattore MEF2 cruciale nel differenziamento muscolare scheletrico (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). Tra i geni della famiglia *mef2*, *mef2c* è il primo gene ad essere espresso all'inizio del differenziamento cardiaco e muscolare scheletrico in vivo, seguito successivamente dall'espressione degli altri geni *mef2* (Edmondson et al., 1994). L'espressione di *mef2c* è mantenuta poi attraverso tutto il programma del differenziamento muscolare ed è stato dimostrato che *mef2c* è un bersaglio trascrizionale delle proteine bHLH e dei fattori MEF2 stessi (Wang et al., 2001).

Myf5 e risultano essere potenti induttori della trascrizione del gene *mef2c*, mentre il fattore miogenico MRF4 contribuisce al mantenimento della sua espressione durante il differenziamento muscolare post-natale. Inoltre, è stato visto che la proteina MEF2C, una volta espressa, agisce sul suo stesso promotore per amplificare e mantenere la sua espressione nel corso del differenziamento terminale dei mioblasti. Quindi i fattori regolatori miogenici bHLH sono richiesti per l'iniziale trascrizione di *mef2c*, dopodiché i fattori MEF2 cooperano con le proteine bHLH per mantenere l'espressione della proteina MEF2C durante lo sviluppo muscolare pre - e post-natale. Recentemente è stata identificata la regione regolativa in cis del gene *mef2c* necessaria per il legame dei fattori MEF2 e bHLH. Questa regione di controllo risulta essere specificamente attiva nella linea muscolare scheletrica, ma non nel cuore o in altri organi. (Wang et al., 2001).

RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA

Complessi di rimodellamento della cromatina e loro ruolo nella regolazione della miogenesi

Molti studi negli ultimi anni hanno dimostrato che l'attività dei fattori regolatori miogenici e dei fattori MEF2 è regolata da cofattori trascrizionali dotati di attività enzimatiche coinvolte nel rimodellamento della cromatina.

Nei nuclei delle cellule eucariotiche il DNA è strettamente associato a proteine istoniche e non-istoniche in una struttura detta cromatina, il cui modulo base è il nucleosoma. L'impaccamento del DNA nei nucleosomi e nelle strutture di ordine superiore costituisce un ostacolo al legame delle proteine coinvolte nella trascrizione. I cambiamenti dinamici della struttura della cromatina rappresentano quindi importanti meccanismi regolativi in quanto possono facilitare o impedire l'accesso dei fattori trascrizionali al DNA nucleosomale. Sono state identificate due classi principali di complessi enzimatici che modificano la cromatina. La prima classe è costituita dalle acetilasi e dalle deacetilasi, che modificano covalentemente gli istoni introducendo o rimuovendo, rispettivamente, gruppi acetile sui residui di lisina presenti all'estremità N-terminale degli istoni. La seconda classe è costituita da complessi enzimatici che idrolizzando l'ATP modificano la struttura della cromatina in maniera non-covalente.

Acetiltrasferasi e deacetilasi

Le iston-acetilasi e -deacetilasi catalizzano l'introduzione o la rimozione, rispettivamente, di gruppi acetile nel dominio N-terminale degli istoni ricco in lisine. L'acetilazione degli istoni risulta in un rilassamento della struttura nucleosomale indebolendo l'interazione dei domini N-terminali degli istoni, carichi positivamente, con i gruppi fosfato del DNA carichi negativamente. Una aumentata acetilazione è associata all'attivazione dell'espressione genica, e viceversa, una diminuzione dell'acetilazione è associata con la repressione dell'espressione genica (Kingston and Narlikar, 1999; Kadonaga, 1998).

Recentemente è stato osservato che numerosi coattivatori trascrizionali, quali CBP, p300 e PCAF possiedono un'attività iston-acetiltrasferasica intrinseca che non è diretta

esclusivamente sulle proteine istoniche ma può anche esplicarsi su substrati differenti (Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996; Bannister and Kouzarides, 1996)

L'effetto stimolatorio delle acetilasi è controbilanciato dalle iston-deacetilasi (Histone Deacetylases: HDAC). Nell'uomo sono state identificate otto HDACs e assegnate a due classi definite in base all'omologia con due differenti HDACs del lievito, Rdp3p e Hda1p. Le HDACs di classe I (-1, -2, -3 e -8) sono espresse in modo ubiquitario, mentre quelle di classe II (-4, -5, -6 e -7) sono presenti principalmente nel cuore, nel muscolo scheletrico e nel cervello (Gray and Ekstrom, 2001).

Nel differenziamento muscolare le acetiltrasferasi CBP/p300 e PCAF svolgono un ruolo fondamentale fungendo da coattivatori trascrizionali di MyoD (Eckner et al., 1996; Yuan et al., 1996; Puri et al., 1997a). Mediante esperimenti d'immunoprecipitazione è stata evidenziata l'associazione di p300 e PCAF con MyoD; complessi p300-PCAF-MyoD sono stati individuati sulle sequenze E-box e vengono destabilizzati dalle oncoproteine virali, E1A di Adenovirus e large TAg di SV40, che reprimono la trascrizione miogenica. Tuttavia, PCAF e p300 sembrano avere ruoli diversi; infatti, l'attività acetiltrasferasica di PCAF è necessaria nella fase precoce del differenziamento, mentre quella di CBP/p300 è richiesta durante la fase tardiva del differenziamento e la fusione cellulare (Polesskaya et al., 2001b). Una spiegazione di questa diversità potrebbe essere dovuta alla capacità di PCAF e di p300 di acetilare in maniera selettiva specifici residui di lisina degli istoni. Inoltre, è stato dimostrato che sia PCAF che CBP/p300 acetilano MyoD e che questa modificazione post-traduzionale di MyoD ne aumenta sia l'affinità di legame al DNA che l'interazione con CBP/p300 (Sartorelli et al., 1999; Polesskaya et al., 2000; Polesskaya et al., 2001a). Infine, è stato dimostrato che, oltre a MyoD, p300 lega anche MEF2 e ne stimola l'attività trascrizionale (Sartorelli et al., 1997). Ovviamente l'attività delle acetiltrasferasi su MyoD e MEF2 deve essere finemente regolata, in modo da prevenire l'attivazione precoce di geni coinvolti nel differenziamento. Uno dei meccanismi di controllo appare essere la regolazione diretta dell'attività enzimatica acetiltrasferasica; ad esempio è stato visto che E1A di adenovirus e la proteina bHLH TWIST, entrambi potenti inibitori della miogenesi, legano e reprimono i domini catalitici di p300 e PCAF (McKinsey et al., 2001).

Recentemente è stato dimostrato che anche le deacetilasi sono implicate nel controllo del differenziamento muscolare. Le deacetilasi di classe II interagiscono con MEF2 e agiscono da potenti inibitori dell'attività transattivante di MEF2 (Miska et al., 1999; Wang

et al., 1999). Nei mioblasti proliferanti MEF2 è espresso a bassi livelli e il reclutamento delle HDACs potrebbe garantire il blocco della sua attività. Un ruolo chiave nel controllo della miogenesi è svolto dall'esportazione delle HDACs di classe II dal nucleo al citoplasma in seguito a fosforilazione mediata dalle chinasi CAMK. In particolare, HDAC5 e HDAC7 sono localizzate nei nuclei dei mioblasti e sono esportate nel citoplasma nella fase iniziale del differenziamento. Una forma attivata di CAMK, che stimola la miogenesi, è sufficiente a mediare l'esporto di queste HDAC dal nucleo, lasciando MEF2 libero di interagire con le HATs e attivare i geni miogenici (McKinsey et al., 2001).

Anche le deacetilasi di classe I svolgono un ruolo di controllo dell'attività dei fattori miogenici. In particolare, HDAC1 lega direttamente MyoD nei mioblasti proliferanti ma non nei miotubi differenziati e questa associazione porta alla deacetilazione di MyoD con la conseguente inibizione della sua attività trascrizionale (Mal et al., 2001).

Complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti

I complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti alterano la struttura della cromatina cambiando la localizzazione o la conformazione dei nucleosomi senza introdurre modificazioni covalenti ma utilizzando l'ATP come fonte di energia. Essi agiscono idrolizzando l'ATP e generando intermedi ad alta energia in grado di spostare i nucleosomi attraverso scivolamento e riposizionamento traslazionale rispetto all'ottamero istonico (Meersseman et al., 1992). Lo scivolamento degli istoni non è l'unico sistema per il rimodellamento; è stato proposto che anche le altre subunità possono modulare l'attività di rimodellamento della cromatina e indirizzare i complessi ai specifici promotori (Narlikar et al., 2002). I cambiamenti strutturali della cromatina indotti da questi complessi possono essere coinvolti sia nell'attivazione che nella repressione genica in base ai partners di interazione molecolare (co-attivatori o co-repressori rispettivamente).

A questa classe di enzimi appartengono i complessi SWI/SNF. Il complesso multiproteico SWI/SNF, costituito da circa 12 subunità, è stato identificato per la prima volta nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* ed è altamente conservato negli eucarioti (Peterson and Workman, 2000). In lievito l'attività catalitica risiede nella subunità SWI2/SNF2 che contiene un ampio dominio elicasi con funzione di ATPasi DNA-dipendente. La subunità SWI2/SNF2 contiene un secondo dominio specifico, detto

bromodominio, che interagisce con gli istoni acetilati coordinando così l'attività del complesso SWI/SNF e quella delle iston-acetilasi nella regolazione dell'espressione genica. Nelle cellule di mammifero sono state identificate due proteine strettamente correlate entrambe omologhe a SWI2/SNF2, denominate Brm (Brahma) e BRG1 (Brahma related gene). I complessi SWI/SNF dei mammiferi contengono in maniera alternativa Brm o BRG1 quale subunità ATPasica. Per quanto riguarda le altre subunità, i complessi SWI/SNF hanno una composizione biochimica variabile. Alcune subunità sono comuni a tutti i complessi, come ad esempio SNF5/INI1, e costituiscono il nucleo base del complesso, ed altre o sono uniche o sono isoforme tessuto-specifiche di subunità comuni. Questa diversificazione nella composizione dei complessi SWI/SNF suggerisce funzioni cellulari specializzate per ciascun tipo di complesso (Wang et al., 1996).

È stato dimostrato che gli enzimi SWI/SNF facilitano il legame di TBP e di altri fattori coinvolti nella formazione del complesso di pre-inizio della polimerasi II e promuovono l'elongazione trascrizionale sia in vitro che in vivo (Corey et al., 2003; Imbalzano et al., 1994; Salma et al., 2004; Soutoglou and Talianidis, 2002). Sono stati proposti vari modelli per spiegare il reclutamento degli enzimi SWI/SNF a specifiche sequenze regolative: l'interazione con la polimerasi II o l'enzima (Wilson et al., 1996), il legame dei bromodomini agli istoni acetilati (Hassan et al., 2002), il reclutamento tramite attivatori trascrizionali sequenza-specifici (Cosma, 2002). Nelle cellule di mammifero componenti dei complessi SWI/SNF possono interagire con vari attivatori trascrizionali, alcuni dei quali probabilmente reclutano SWI/SNF su promotori specifici (Cheng et al., 1999; Kadam et al., 2000; Liu et al., 2002; Ma et al., 2004). Ad esempio, è stato dimostrato che SWI/SNF coadiuva l'attività trascrizionale dei recettori dei glucocorticoidi (Fryer and Archer, 1998). Un effetto coattivatorio è stato anche riportato per altri recettori nucleari, incluso il recettore dell'acido retinoico e i recettori degli estrogeni (Muchardt and Yaniv, 1993; Chiba et al., 1994). Inoltre, è stato visto che C/EBP β può reclutare SWI/SNF sui promotori dei geni mieloidi (Kowenz-Leutz and Leutz, 1999) e che C/EBP α è coinvolto nel reclutamento di SWI/SNF sui promotori dei geni che controllano il differenziamento adipocitario (Pedersen et al., 2001).

Per quanto riguarda il differenziamento muscolare, è stato dimostrato che l'attivazione trascrizionale mediata da MyoD è associata al rimodellamento della cromatina nelle regioni regolative dei geni muscolo-specifici e che i complessi SWI/SNF svolgono un ruolo essenziale in questo processo (Gerber et al., 1997; de la Serna et al., 2001a). Difatti, durante l'embriogenesi e la rigenerazione del muscolo scheletrico adulto,

l'induzione di MyoD è critica per la specificazione delle cellule muscolari, un processo che comporta cambiamenti nella struttura della cromatina che permettono l'espressione di geni precedentemente silenti perchè organizzati in una struttura cromatinica compatta. Il ruolo chiave degli enzimi SWI/SNF nell'attivazione genica mediata da MyoD è stato dimostrato usando come sistema modello la transdifferenziazione miogenica indotta da MyoD in fibroblasti, un modello che ha inizialmente consentito l'identificazione di MyoD quale regolatore del differenziamento muscolare (Davis et al., 1987). L'espressione di mutanti dominanti-negativi di BRG1 o Brm, mancanti dell'attività ATPasica, inibisce drasticamente la capacità di MyoD di indurre la transdifferenziazione miogenica in fibroblasti NIH3T3 (de la Serna et al., 2001a). E' noto che MyoD è in grado di convertire fibroblasti in mioblasti terminalmente differenziati andando ad agire su due set di geni. Da una parte MyoD attiva la trascrizione dei geni muscolo-specifici, dall'altra promuove l'arresto proliferativo dei mioblasti inducendo l'espressione di regolatori negativi del ciclo cellulare, quali l'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21 e il gene oncosoppressore RB (Halevy et al., 1995; Martelli et al., 1994). Queste due funzioni di MyoD sono strettamente correlate ma geneticamente separabili (Sorrentino et al., 1990; Crescenzi et al., 1990). È stato visto che enzimi SWI/SNF dominanti negativi non influenzano la normale induzione di p21 e di RB da parte di MyoD, nè l'arresto proliferativo dei mioblasti, mentre inibiscono l'espressione di molti marcatori del differenziamento terminale, quali la catena pesante della miosina (MHC), la troponina T, l' α -actina scheletrica, la desmina e la miogenina. Sembra quindi che durante il differenziamento miogenico l'attività dei complessi SWI/SNF sia necessaria per l'induzione di geni regolatori e di geni strutturali muscolo specifici, ma non per l'induzione di geni regolatori del ciclo cellulare associati con l'arresto della crescita. Una possibile spiegazione risiede nel fatto che i geni regolatori del ciclo cellulare, essendo ubiquitari ed espressi a livello basale anche in assenza di MyoD, si trovano in una struttura cromatinica rilassata, mentre i geni muscolo specifici sono silenti e organizzati in una struttura della cromatina estremamente compatta prima che MyoD venga espresso (de la Serna et al., 2001b).

Essendo stato dimostrato che i complessi di rimodellamento SWI/SNF sono necessari per l'attivazione trascrizionale dei geni muscolo-specifici, è stato successivamente verificato che BRG1 viene reclutato sul promotore del gene miogenina e che l'associazione stabile di MyoD a questo promotore è inibita da un mutante dominante-negativo di BRG1. Il rimodellamento della cromatina sembrerebbe quindi precedere il legame di MyoD al promotore; infatti, MyoD si associa stabilmente al promotore solo

dopo acetilazione dell'istone H4 e dopo reclutamento del complesso SWI/SNF (de la Serna et al., 2005). Nello stesso lavoro è stato d'altronde dimostrato che l'espressione di MyoD è necessaria per l'acetilazione degli istoni e il reclutamento di SWI/SNF al promotore di miogenina. Il modello proposto per spiegare questo apparente paradosso è che MyoD si associ inizialmente al promotore di miogenina indirettamente tramite interazione con le proteine Pbx/Meis che legano costitutivamente questo promotore. Dato che MyoD interagisce anche con le iston-acetilasi p300 e PCAF, queste acetiltrasferasi verrebbero così reclutate sul promotore di miogenina e acetilerebbero gli istoni; l'associazione dei complessi SWI/SNF potrebbe essere facilitata dall'interazione con la cromatina acetilata, è infatti nota la capacità dei complessi SWI/SNF di prendere contatti con gli istoni acetilati mediante il bromodominio delle subunità ATPasiche BRG1 e Brm. Il successivo rimodellamento della cromatina mediato da SWI/SNF rilasserebbe la cromatina dalla sua struttura compatta permettendo a MyoD e ai fattori MEF2 di interagire stabilmente con rispettivi siti di legame presenti sul promotore di miogenina (de la Serna et al., 2005). In accordo con questo modello, è stato visto che durante il differenziamento di mioblasti C2C12, MyoD è reclutato sul promotore di miogenina e induce l'acetilazione degli istoni. Il rimodellamento della cromatina su questo promotore richiede il successivo reclutamento degli enzimi SWI/SNF (Simone et al., 2004). È inoltre stato dimostrato che il reclutamento e l'attività di SWI/SNF sul promotore della miogenina è dipendente dall'attività della p38 chinasi che è in grado di fosforilare la subunità BAF60. Questo mette in relazione il reclutamento del complesso SWI/SNF su particolari promotori con specifici segnali cellulari promossi da cascate di eventi fosforilativi (Simone et al., 2004).

Come accennato all'inizio del paragrafo, i cambiamenti strutturali della cromatina indotti da questi complessi possono portare all'attivazione o alla repressione genica legandosi ad attivatori o repressori trascrizionali. Non è però chiaro il meccanismo con cui diversi modificatori della cromatina portano alla formazione di complessi trascrizionali attivatori o repressori. La metilazione del DNA, ad esempio, fornisce un segnale per il reclutamento delle HDACs e sembra agire in maniera simultanea con i complessi SWI/SNF. Osservazioni sperimentali suggeriscono che l'attività dei complessi ATP-dipendenti precede l'azione delle HATs (Kingston and Narlikar, 1999). Invece, in alcuni casi è stato dimostrato che gli enzimi di rimodellamento della cromatina sono reclutati sui geni bersaglio attraverso la loro interazione con i fattori di trascrizione legati al DNA. Ciò richiederebbe che i fattori di trascrizione debbano avere accesso al DNA prima dell'azione

dei complessi di rimodellamento e che quindi la struttura iniziale della cromatina deve avere un qualche grado di accessibilità.

Specificità funzionali dei complessi SWI/SNF

Come accennato precedentemente, nei mammiferi i complessi SWI/SNF possono diversificarsi riguardo alla loro composizione biochimica, indicando che i vari tipi di complesso possono avere funzioni nucleari specializzate (Wang et al., 1996). Ognuno di questi complessi contiene BRG1 o Brm come subunità ATPasica e una composizione variabile di altre subunità, dette BAF (BRG1-associated factors). Varie evidenze sperimentali indicano che le ATPasi BRG1 e Brm, pur essendo altamente omologhe, posseggono distinte proprietà funzionali.

Studi di inattivazione genica, hanno dimostrato che mutazioni omozigoti nel gene BRG1 sono letali in stadi molto precoci dell'embriogenesi nel topo. I topi eterozigoti per BRG1 sono sottorapresentati alla nascita e circa il 15-30% di questi mutanti mostra segni di esencefalia in utero. Dopo la nascita, gli eterozigoti sono vitali e fertili, ma intorno a 16 mesi di età, alcuni topi sviluppano grossi tumori sottocutanei (Bultman et al., 2000a). L'inattivazione del gene BRM ha invece dimostrato che questo non è essenziale per la vitalità e la fertilità del topo (Reyes et al., 1998). Tuttavia, gli animali mutanti esibiscono un incremento dal 10 al 15% nella massa corporea rispetto ai topi wild type e un aumento della proliferazione delle cellule epatiche. Fibroblasti isolati dai topi mutanti presentano una deregolazione della crescita cellulare, in quanto non mostrano un normale arresto proliferativo una volta a confluenza o se privati di fattori di crescita. Inoltre i topi knock out per BRM mostrano un incremento di 2-6 volte nell'espressione di BRG1 in vari tessuti. È probabile che l'induzione dell'espressione di BRG1 compensi la mancanza di Brm.

Dato l'alto grado di omologia tra i geni BRG1 e BRM (simili all'86% e identici al 75%), fenotipi così diversi associati alle rispettive delezioni omozigotiche o a mutazioni inattivanti risultano piuttosto sorprendenti. Le funzioni delle proteine BRG1 e Brm potrebbero potenzialmente compensarsi l'un l'altra, tranne nei casi in cui presentassero una diversa espressione nel tempo o una diversa distribuzione cellulare. Difatti è stato dimostrato che i livelli di Brm aumentano gradualmente durante lo sviluppo embrionale del topo per raggiungere un massimo nei tessuti adulti post-mitotici. D'altro canto BRG1

sembra essere espressa in tutte le fasi dello sviluppo (Reyes et al., 1998). È quindi possibile che BRG1 svolga il ruolo principale nell'attività di SWI/SNF durante lo sviluppo e non possa essere sostituita da Brm a causa di una insufficiente espressione di quest'ultima. L'analisi dei topi knock out per Brm farebbe pensare ad un ruolo essenziale di Brm nel controllo della proliferazione cellulare che non può essere vicariato da BRG1. In colture cellulari di fibroblasti, i livelli della proteina BRG1 restano relativamente costanti nelle varie fasi del ciclo cellulare, mentre l'espressione della proteina Brm aumenta nelle cellule quiescenti, ma è down-regolata quando le cellule vengono indotte a rientrare nel ciclo cellulare. Inoltre, la trasformazione di fibroblasti con un oncogene ras costitutivamente attivo risulta in un forte decremento dei livelli di espressione del gene BRM, mentre i livelli di BRG1 non sono influenzati dalla trasformazione con ras. La reintroduzione di un gene BRM costitutivamente espresso in cellule trasformate con ras porta ad una parziale reversione del fenotipo trasformato. Questo effetto di Brm viene abolito da una mutazione puntiforme nel sito di legame per l'ATP nel dominio elicasi di Brm (Muchardt et al., 1998; Reyes et al., 1998). Prese nel loro insieme queste osservazioni suggeriscono che un alto livello di espressione della proteina Brm costituisce uno dei fattori che favoriscono l'entrata nella fase G₀, e che la down-regolazione di Brm è un evento necessario in alcuni pathways che portano alla trasformazione cellulare.

La persistenza di BRG1 in cellule proliferanti e l'accumulo di Brm in cellule che hanno rallentato la crescita o si sono arrestate, suggerisce la possibilità che in queste condizioni vi sia un parziale sostituzione di Brm a BRG1 nei complessi SWI/SNF. Parte dei siti della cromatina occupati dai complessi contenenti BRG1 potrebbero così essere rimpiazzati da complessi contenenti Brm. Inoltre nuovi siti potrebbero essere occupati dai complessi contenenti Brm. Questi differenti target potrebbero essere caratterizzati da una diversa struttura dei promotori o da proteine che legano il DNA con differente affinità per BRG1 o Brm. Infine, gli aumentati livelli della proteina Brm potrebbero portare ad un incremento della quantità totale dei complessi SWI/SNF funzionalmente attivi. Questo dovrebbe facilitare l'espressione di geni che sono importanti per il mantenimento della quiescenza o per il differenziamento terminale, un processo che è spesso associato all'arresto del ciclo cellulare. Il complesso SWI/SNF contenente Brm potrebbe quindi avere una funzione specifica nell'attivazione di geni correlati con l'arresto della proliferazione e il differenziamento, così come di geni che mediano l'interazione cellula-cellula, i contatti con la matrice cellulare e la stabilizzazione del citoscheletro.

Sulla base delle osservazioni sopra esposte, appare chiaro che la comprensione di come BRG1 e Brm dirigano distinte attività dei complessi SWI/SNF e l'identificazione di geni regolati specificamente da ciascuna delle due ATPasi, costituiscono importanti campi di studio. In un recente lavoro è stato determinato che i complessi SWI/SNF contenenti BRG1 o Brm interagiscono specificamente con differenti classi di fattori trascrizionali (Kadam and Emerson, 2003). BRG1, ma non Brm, possiede una regione N-terminale specifica capace di riconoscere e legare proteine contenenti domini "zinc-finger". Questi fattori rappresentano la classe più comune di fattori trascrizionali i cui membri controllano svariati processi cellulari, quali proliferazione, differenziamento, apoptosi e metabolismo. Brm interagisce invece in maniera preferenziale con CBF-1 e ICD22, due proteine che regolano la via di traduzione del segnale iniziata dal recettore Notch. Le diverse preferenzialità di legame di BRG1 e Brm per proteine regolative consentirebbero a questi enzimi di essere reclutati selettivamente su distinti promotori per facilitare il rimodellamento della cromatina e l'espressione genica. Tramite questo meccanismo le due categorie di complessi SWI/SNF potrebbero regolare programmi di espressione genica differenti.

Un altro studio in cui è stata determinata un ruolo differenziale dei complessi SWI/SNF contenenti BRG1 o Brm è stato condotto sui recettori degli androgeni. Sembra infatti che il complesso SWI/SNF sia necessario per la regolazione dei geni attivati dal recettore degli androgeni e che vi sia un utilizzo preferenziale dei complessi contenenti Brm (Marshall et al., 2003).

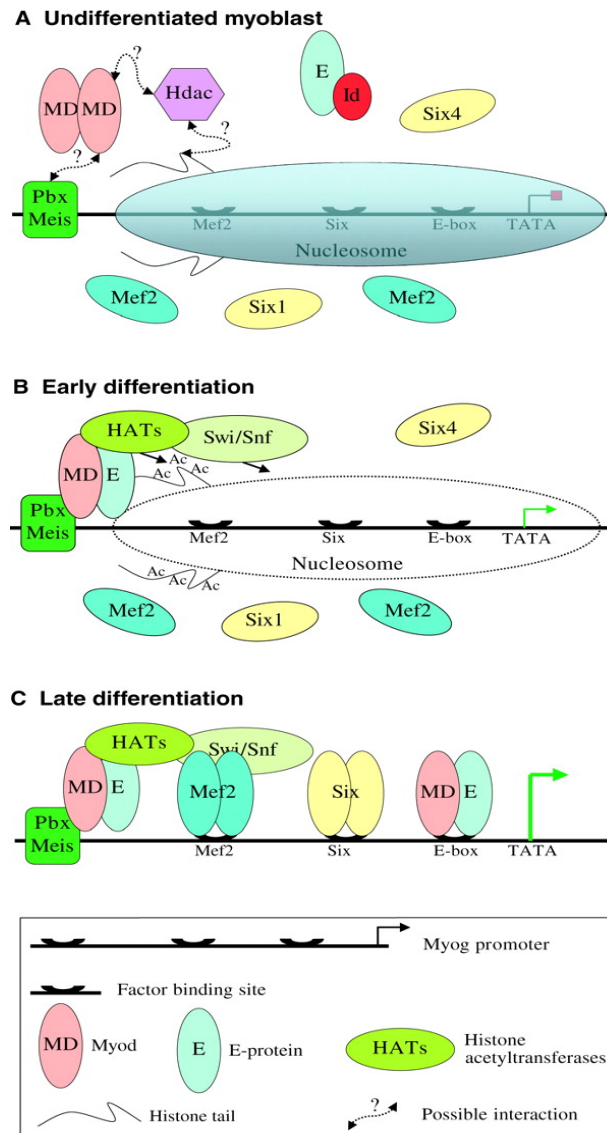


Figura 3. Modello proposto del reclutamento dei complessi di rimodellamento della cromatina sul promotore della miogenina.

(A) Nei mioblasti indifferenziati i nucleosomi occludono la E-box e il sito di legame per Mef2 e Six. Il complesso Pbx/Meis è invece legato in una regione permissiva adiacente (Berkes et al., 2004). Le analisi di immunoprecipitazione della cromatina indicano che MyoD recluta HDAC sul promotore della miogenina, probabilmente interagendo col complesso Pbx/Meis (Mal and Harter, 2003). Le proteine Id sono espresse nei mioblasti proliferanti e, legandosi alle proteine E, impediscono la formazione di eterodimeri MyoD/E. Le proteine Mef2 e Six, pur essendo presenti, non hanno accesso al promotore della miogenina nei mioblasti. (B) Con l'inizio del differenziamento, i livelli delle proteine Id decrescono portando alla formazione di eterodimeri MyoD/proteine E che interagiscono con il complesso Pbx/Meis sul promotore della miogenina. MyoD recluterebbe HATs e i complessi SWI/SNF (de la Serna et al., 2005; Simone et al., 2004) che acetilano gli istoni e rimodellano i nucleosomi, rispettivamente. (C) Il rimodellamento dei nucleosomi permettendo alle proteine Mef2 e Six di avere accesso sui loro siti specifici e permettere il legame stabile tra MyoD e la E-box. In questo modello, il rimodellamento della cromatina mediato da MyoD, avverrebbe prima che MyoD e gli altri fattori abbiano accesso ai loro siti specifici sul promotore.

Rimodellamento della cromatina e controllo della proliferazione cellulare

Come sopra accennato, molte osservazioni sia in linee cellulari che in animali knock-out suggeriscono che il complesso SWI/SNF di mammifero è coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare. La connessione meglio documentata tra componenti del complesso SWI/SNF e regolatori del ciclo cellulare riguarda l'interazione tra Brm o BRG1 e la proteina Retinoblastoma (pRb). Diversi studi hanno dimostrato che sia Brm che BRG1 sono in grado di interagire con pRb (Singh et al., 1995; Strober et al., 1996). Questa interazione è stata mappata in una regione contenente la sequenza LXCXE presente sia in BRG1 che in Brm. È noto che questo motivo media l'interazione del dominio "pocket" di pRb con diverse oncoproteine virali, quali l'antigene large T di SV40, le proteine E7 di papillomavirus e E1A di Adenovirus. Vari saggi funzionali hanno dimostrato che BRG1 e Brm sono implicati nel controllo negativo esercitato da pRb sulla transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Vari studi hanno dimostrato una cooperazione tra pRb e Brm o BRG1 nell'induzione dell'arresto della crescita. In cellule SW13 che non esprimono né Brm, né BRG1, ma contengono pRb wild-type, l'over-espressione di ciascuna delle due ATPasi porta alla formazione di cellule appiattite e arrestate; questo effetto è inibito dalla cotrasfezione dell'oncoproteina E1A (Dunaief et al., 1994).

pRb è una proteina nucleare la cui attività di soppressore della proliferazione viene regolata tramite fosforilazione durante il ciclo cellulare. Nella fase G0/G1 pRb si trova in una forma non fosforilata o ipofosforilata, attiva; durante la transizione verso la fase S pRb viene progressivamente fosforilata e così inattivata (Buchkovich et al., 1989). Nella fase G1-precoce, la fosforilazione di alcuni residui specifici di pRb è catalizzata dai complessi ciclinaD-Cdk4/Cdk6; questi eventi fosforilativi eliminano l'attività di soppressore della crescita di pRb e permettono il superamento del punto di restrizione. Queste modificazioni rendono pRb un substrato adatto per ulteriori e distinti eventi fosforilativi, mediati dai complessi ciclina E-Cdk2 e ciclina A-Cdk2, che contribuiscono al mantenimento di pRb in una forma inattiva, altamente fosforilata durante tutta la fase S (Mittnacht, 1998). Gli effetti di pRb sulla proliferazione cellulare sono mediati dalla sua interazione fisica e funzionale con importanti fattori regolativi (Taya, 1997). Una delle interazioni maggiormente studiate è quella tra pRb ed il fattore trascrizionale E2F. pRb lega E2F solo quando si trova nella sua forma ipofosforilata, mentre, la fosforilazione di pRb causa la distruzione di tale legame e la liberazione di E2F che può così attivare la trascrizione di

vari geni implicati nel controllo della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, quali, ad esempio, la DNA polimerasi alfa, la ribonucleotide reduttasi, c-myb, c-myc, la timidilato sintetasi ed il gene E2F-1 stesso (La Thangue, 1994).

Studi recenti hanno dimostrato che pRb regola negativamente i geni responsivi ad E2F tramite almeno due meccanismi. pRb inibisce direttamente l'attività trascrizionale di E2F legando il dominio transattivante di E2F. Inoltre, pRb può reprimere attivamente la trascrizione dei geni E2F-dipendenti in quanto recluta sui promotori contenenti siti di legame per E2F vari fattori di rimodellamento della cromatina, tra cui alcune iston-deacetilasi e i complessi SWI/SNF (Ferreira et al., 2001; Harbour and Dean, 2000a).

E' stato dimostrato che pRb lega proteine con attività deacetilasica e le recluta sui promotori contenenti siti di legame per E2F. pRb interagisce con le deacetilasi di classe I (HDAC 1-3) tramite una regione diversa da quella necessaria per il legame di E2F, il che permette la formazione di complessi ternari pRb-E2F-HDAC che vengono reclutati sui promotori E2F-dipendenti, quale la ciclina E. Questo reclutamento di HDAC mediato da pRb causa la deacetilazione degli istoni sui promotori bersaglio con conseguente repressione della trascrizione (Harbour and Dean, 2000a). Come detto precedentemente pRb interagisce anche con BRG1 e Brm, le subunità ATP-asiche dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF. pRb può legare contemporaneamente E2F e Brm suggerendo che complessi ternari pRb-E2F-Brm possono essere reclutati sui promotori che contengono siti E2F (Trousse et al., 1997). Questi studi indicano che la repressione trascrizionale mediata da pRb è complessa. Una domanda che sorge è se l'interazione simultanea di pRb con HDAC e con i complessi SWI/SNF sia necessaria per reprimere tutti i promotori contenenti siti E2F o se l'associazione con diversi fattori di rimodellamento della cromatina possa permettere a pRb di reprimere in maniera selettiva specifici geni bersaglio in certi punti del ciclo cellulare o in specifiche circostanze fisiologiche. A questo proposito, è stato osservato che pRb può formare due distinti complessi: un complesso che contiene sia HDAC che BRG1 e un complesso che contiene solo BRG1. In particolare, il complesso pRb-HDAC-SWI/SNF sembra importante per inibire la trascrizione di geni della fase G1 (quali ad esempio la ciclina E, myb e E2F1) e impedire la progressione verso la fase S. E' stato visto che la fosforilazione della regione "pocket" di pRb nella fase G1-tardiva da parte delle chinasi cdk4/cdk6 causa il rilascio di HDAC dal complesso ternario senza influenzare l'associazione tra pRb e BRG1. Il risultante complesso binario reprime ancora la ciclina A, ma non la ciclina E. Questo complesso residuo viene poi distrutto nella fase S dopo l'accumulo dei complessi

cdk2/ciclina E. In conclusione, sembra quindi che due distinti complessi repressori contenenti pRb possano agire su promotori regolati da E2F in fasi differenti del ciclo cellulare (Zhang et al., 2000).

Recentemente è stata analizzata più in dettaglio la funzione di Brm come regolatore del ciclo cellulare. E' stato visto che la sovraespressione di Brm nelle cellule di mammifero interferisce profondamente con la progressione del ciclo cellulare e non può essere tollerata. E' stato anche visto che l'acetilazione di Brm controlla negativamente questa sua funzione inibitoria della crescita, infatti, il trattamento con inibitori delle deacetilasi, riducono l'attività d'arresto della crescita mediata da Brm in fibroblasti murini (Bourachot et al., 2003). Inoltre tali inibitori sono in grado di aumentare l'espressione di Brm in cellule trasformate con ras regolando la tollerabilità di Brm attraverso la sua parziale inattivazione; questo Brm parzialmente attivo può quindi revertire il fenotipo trasformato attraverso la sua attività inibitoria sulla crescita.

RELAZIONI MOLECOLARI E FUNZIONALI TRA CICLO CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE

Premessa

L'uscita irreversibile dal ciclo cellulare è un prerequisito per il differenziamento terminale delle cellule muscolari scheletriche; infatti, miotubi terminalmente differenziati non rientrano in ciclo in seguito a stimolazione con il siero. Negli ultimi anni sono stati messi in evidenza alcuni dei meccanismi molecolari che legano l'attività dei geni regolatori del differenziamento muscolare al controllo del ciclo cellulare (Maione and Amati, 1997; Kitzmann and Fernandez, 2001).

Regolazione di cicline e Cdk durante la miogenesi

L'espressione dei regolatori positivi della progressione del ciclo cellulare, soprattutto cicline e Cdk, è variamente regolata durante il differenziamento miogenico.

Per quanto riguarda le Cdk, è stato evidenziato, nel corso del differenziamento delle cellule muscolari della linea C2, un notevole decremento della chinasi cdc2, in contrasto con il comportamento di Cdk2 e di Cdk4, i cui livelli rimangono sostanzialmente invariati (Jahn et al., 1994). È noto che l'attività di queste chinasi dipende dalla loro associazione con le cicline. L'espressione della maggior parte delle cicline, nelle cellule muscolari, viene rapidamente down-regolata nella fase iniziale del differenziamento, ovvero, quando le cellule si arrestano nella fase G1 (Wang and Nadal-Ginard, 1995). In particolare, le cicline D1, C, E, A e B sono rapidamente represses durante il differenziamento muscolare di mioblasti della linea C2 (Jahn et al., 1994). Un'eccezione è costituita dalla ciclina D3, la cui espressione viene invece indotta durante il differenziamento delle cellule C2. Studi condotti nel nostro laboratorio suggeriscono che la ciclina D3 ha un ruolo nell'arresto del ciclo cellulare nei miotubi differenziati (Cenciarelli et al., 1999), ma il meccanismo molecolare tramite cui esplica questa funzione (non canonica per una ciclina G1) non è stato ancora completamente chiarito.

Il differenziamento muscolare è caratterizzato dall'induzione di regolatori negativi della proliferazione

Lo stretto legame esistente tra arresto del ciclo cellulare ed induzione del differenziamento miogenico, è testimoniato anche dalla spiccata induzione di regolatori negativi della proliferazione. In particolare, in una fase precoce del differenziamento, in concomitanza con l'induzione di miogenina, è stato evidenziato un forte incremento dei livelli degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) p21, p57 e p18.

È stato dimostrato che la trascrizione del gene p21 è indotta direttamente da MyoD e che la proteina p21 nelle cellule muscolari differenziate, è associata con le Cdk e ne inibisce l'attività, contribuendo così all'arresto del ciclo in fase G1 (Guo et al., 1995; Halevy et al., 1995; Parker et al., 1995). Dati più recenti, suggeriscono che p21, in cellule muscolari differenziate, cooperi con pRb per garantire l'assenza di replicazione del DNA e mantenere, quindi, lo stato postmitotico (Mal et al., 2000). E' importante sottolineare che topi p21^{-/-} non mostrano difetti di sviluppo o di differenziamento muscolare, mentre topi privi sia di p21 che di p57, mostrano notevoli difetti nello sviluppo del muscolo scheletrico (Zhang et al., 1999), il che indica l'esistenza di funzioni ridondanti tra p21 e p57 nel controllo del differenziamento muscolare.

Un altro inibitore di Cdk fortemente indotto durante il differenziamento miogenico è p18 (Phelps et al., 1998). Nei miotubi terminalmente differenziati, p18 è associato con Cdk4 e Cdk6 per formare complessi funzionalmente inattivi, ad evidenziare un suo ruolo nel mantenimento dell'arresto della proliferazione. Il meccanismo di induzione di p18 è ancora ignoto.

E' stato dimostrato, inoltre, che, nel corso del differenziamento muscolare, viene incrementata l'espressione del gene oncosoppressore retinoblastoma (Coppola et al., 1990; Martelli et al., 1994) e che la proteina pRb si accumula nella sua forma ipofosforilata, attiva nell'inibizione della proliferazione (Gu et al., 1993). Nel nostro laboratorio è stato precedentemente dimostrato che MyoD induce l'attività del promotore del gene Rb tramite un meccanismo molecolare che non richiede l'interazione diretta di MyoD con sequenze E-box (Martelli et al., 1994). In un lavoro più recente è stato poi dimostrato che MyoD viene reclutato sul promotore di Rb dal fattore trascrizionale CREB che lega direttamente il promotore e che la funzione di MyoD consiste nel promuovere l'associazione di CREB con i cofattori trascrizionali PCAF e p300 (Magenta et al., 2003).

pRb controlla l'arresto del ciclo cellulare ed il differenziamento muscolare

Il ruolo critico di pRb nel differenziamento delle cellule muscolari è stato originariamente suggerito da studi su oncogeni virali che hanno come bersaglio una serie di proteine cellulari coinvolte nella proliferazione e nel differenziamento. L'espressione di oncoproteine virali, come, ad esempio, Large T di SV40 ed E1A di adenovirus, reinduce la sintesi del DNA nei nuclei dei miotubi (Gu et al., 1993; Crescenzi et al., 1995) e inibisce il differenziamento muscolare interagendo e inattivando le proteine della famiglia Rb (pRb; p107; p130) e nel caso di E1A, p300 (Caruso et al., 1993; Maione et al., 1994; Tedesco et al., 1995). Vari studi hanno suggerito che pRb è necessaria per il mantenimento del differenziamento nei miotubi; si riteneva infatti che, ad esempio, E1A, espressa nei miotubi, legasse le proteine della famiglia Rb, determinando il rilascio dei fattori di trascrizione E2F capaci così di riattivare l'espressione delle cicline E ed A (Ohtani et al., 1995; Schulze et al., 1995; Zeffass et al., 1995), spingendo la cellula ad entrare in fase S. La capacità dei miotubi differenziati di riattivare il ciclo cellulare suggerisce anche che l'apparato proliferativo basale non è stato irreversibilmente perso ma viene attivamente inibito.

Nelle cellule muscolari differenziate i complessi dei fattori E2F legati al DNA contengono pRb (e p130), il che suggerisce che sia pRb che p130 potrebbero regolare negativamente la funzione di questi fattori proliferativi nei miotubi (Kiess et al., 1995; Shin et al., 1995). E' stato anche dimostrato che pRb e MyoD interagiscono direttamente sia in vitro che in vivo attraverso una regione che coinvolge, rispettivamente, la regione pocket e il dominio bHLH (Gu et al., 1993). E' stato proposto che l'interazione diretta tra le due molecole sia necessaria per l'arresto della crescita delle cellule muscolari e per l'attivazione del programma differenziativo da parte di MyoD. Infatti, in cellule tumorali esprimenti una proteina pRb inattiva (la linea di osteosarcomi SAOS-2 e la linea WERI RB), MyoD è incapace di indurre l'arresto della crescita e la conversione miogenica; entrambe queste attività di MyoD vengono, invece, recuperate in seguito alla reintroduzione di una proteina pRb funzionale. Studi successivi hanno dimostrato in maniera più diretta che la funzione di pRb è necessaria per l'arresto irreversibile del ciclo cellulare. Infatti, cellule derivanti da embrioni di topo in cui è stata specificamente soppressa l'espressione di pRb ($Rb^{-/-}$), a differenza di mioblasti $Rb^{+/+}$, possono rientrare nel ciclo in seguito a stimolazione con siero (Schneider et al., 1994). E' stata successivamente messa in dubbio l'esistenza di un legame diretto tra pRb e MyoD

mediante saggi in vivo e in vitro; pRb sembra infatti capace di potenziare l'attività di MyoD in assenza di un'interazione diretta tra le due proteine.

Più recentemente si è posta l'attenzione sul ruolo specifico di pRb nel differenziamento muscolare. E' ormai chiaro, infatti, che la funzione di pRb nei miotubi terminalmente differenziati non è limitata all'inibizione della proliferazione, ma è necessaria anche per la realizzazione di specifiche fasi del programma miogenico. Ciò è stato suggerito da numerosi dati: ad esempio, linee cellulari muscolari $Rb^{-/-}$ esprimono livelli normali di miogenina e p21, ma non sintetizzano marcatori tardivi del differenziamento, quale MHC. Inoltre, la fusione di mioblasti Rb deficienti in miotubi multinucleati è notevolmente compromessa. Questi difetti differenziativi sembrano essere dovuti specificamente alla mancanza di pRb, poichè MyoD è capace di indurre un differenziamento muscolare normale e l'arresto irreversibile della crescita in fibroblasti privi di p107 o di p130 (Novitch et al., 1996). Questi risultati, ottenuti in vitro, sono confermati da quanto osservato in vivo in topi in cui il gene RB è stato inattivato.

L'inattivazione di entrambe gli alleli di RB risulta in embrioni che muoiono intorno al 13° giorno di gestazione. Questi embrioni sono caratterizzati da difetti nel differenziamento eritroide, neuronale e muscolare, e dal mancato arresto della proliferazione nel sistema nervoso centrale e periferico, nel cristallino e nel muscolo scheletrico (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992). Topi $RB^{-/-}$ in cui è stata ricostituita parzialmente la funzione di pRb riescono a completare lo sviluppo ma muoiono alla nascita, il che ha consentito di esaminare gli effetti dell'assenza di pRb nel differenziamento muscolare in stadi tardivi della gestazione. Difetti nel muscolo scheletrico sono già chiaramente evidenti allo stadio di sviluppo in cui gli embrioni $RB^{-/-}$ normalmente muoiono, e diventano più evidenti in stadi successivi. Il muscolo scheletrico di questi animali è caratterizzato da ridotta densità di fibre, formazione anormale di miotubi e mancata espressione dei marcatori tardivi del differenziamento; al contrario l'espressione dei marcatori precoci del differenziamento muscolare, quali miogenina e l' α -actina, non viene influenzata (Zacksenhaus et al., 1996). Quindi, la funzione di pRb sembra essere specificamente necessaria per la realizzazione degli stadi tardivi della miogenesi scheletrica, e la sua assenza disaccoppia le fasi precoce e tardiva di questo programma differenziativo.

Mentre appare chiaro che pRb controlla attivamente l'arresto della proliferazione in cellule muscolari differenziate grazie alla sua capacità di silenziare i geni E2F-dipendenti,

il controllo dell'espressione dei geni muscolo specifici tardivi sembra coinvolgere una funzione distinta di pRb. E' stato infatti dimostrato che una proteina chimerica E2F1-pRb(SP), che sopprime efficientemente promotori responsivi ad E2F e arresta la crescita cellulare, può sostituire solo parzialmente pRb per quanto riguarda l'espressione di marcatori tardivi del differenziamento in cellule RB^{-/-} (Novitch et al., 1999). Questi dati avvalorano l'ipotesi che pRb possa svolgere un'attività di induzione del differenziamento distinta dalle sue funzioni antiproliferative. Questa idea è sostenuta anche dall'evidenza che mutanti di pRb incapaci di legare stabilmente E2F sono ancora capaci di promuovere il differenziamento muscolare (Sellers et al., 1998). Recentemente è stato dimostrato che il differenziamento terminale difettivo osservato in mioblasti RB^{-/-} è dovuto alla inibizione dell'attività transattivante di MEF2 in queste cellule. Quando pRb è assente, MyoD induce livelli normali di proteina MEF2, correttamente localizzata nel nucleo, capace di legare il DNA, ma trascrizionalmente inerte. È stato dimostrato che sia MyoD che pRb sono necessari per l'induzione dell'attività transattivate di MEF2C; infatti, l'espressione dei geni muscolari tardivi in fibroblasti RB^{-/-} può essere parzialmente recuperata esprimendo MyoD insieme a una proteina MEF2C chimerica contenente un dominio transattivante costitutivamente attivo (Novitch et al., 1999). Queste osservazioni indicano che pRb regola positivamente il differenziamento muscolare svolgendo una duplice azione: da una parte induce l'arresto del ciclo cellulare inibendo E2F, dall'altra induce l'espressione dei geni tardivi del differenziamento contribuendo ad attivare la funzione transattivante dei fattori MEF2. Oltre a questi due meccanismi, pRb promuove il differenziamento miogenico regolando negativamente l'attività di Ras. È stato infatti dimostrato che fibroblasti isolati da embrioni RB^{-/-} presentano un'attività di Ras molto elevata e che la capacità di pRb di regolare negativamente l'attività di Ras è strettamente associata ai suoi effetti sul differenziamento (Lee et al., 1999). La rilevanza fisiologica di queste osservazioni è stata confermata in vivo effettuando incroci tra topi RB^{-/-} e topi N-ras^{-/-}. I risultati ottenuti dimostrano che la perdita di N-ras causa la reversione di molti dei difetti differenziativi osservati negli embrioni RB^{-/-} sia in stadi precoci che in stadi tardivi della gestazione, ma non produce effetti evidenti sulla proliferazione e la morte cellulare (Takahashi et al., 2003). Vari studi hanno precedentemente documentato che una proteina Ras costitutivamente attiva blocca l'attività trascrizionale di MyoD (Olson et al., 1987) agendo a vari livelli molecolari (Perry et al., 2001; Weyman et al., 1997).

Le osservazioni su riportate indicano che pRb esplica varie funzioni necessarie per la realizzazione del differenziamento miogenico terminale. Per valutare se pRb ha un ruolo

anche nel mantenimento del differenziamento terminale è stato creato un topo transgenico in cui al gene RB sono state affiancate le sequenze loxP riconosciute dalla ricombinasi Cre (Marino et al., 2000). Questo modello animale ha reso possibile valutare gli effetti della delezione del gene Rb a differenti stadi della miogenesi, in vivo e in vitro. Mioblasti isolati dal muscolo adulto del topo RB-lox sono stati infettati, prima o dopo il loro differenziamento, con un adenovirus ricombinante che codifica la ricombinasi Cre. E' stato osservato che la delezione di RB in mioblasti proliferanti porta ad un'alterazione della cinetica cellulare e, in condizioni di differenziamento, ad un notevole aumento del tasso di morte apoptotica; le cellule rimanenti sono in grado di formare solo miociti mononucleati che esprimono MyoD e miogenina ma non i geni della fase tardiva (quali catena pesante della miosina). Questo indica che i mioblasti RB^{-/-} sono capaci di iniziare il programma differenziativo ma non di portarlo a termine. E' stato inoltre osservato che la delezione del gene RB nei miotubi post-mitotici multinucleati non comporta la riattivazione della sintesi del DNA; la funzione di pRb sembra quindi necessaria per il completamento del differenziamento muscolare ma non per il mantenimento e l'irreversibilità dello stato postmitotico (Huh et al., 2004; Camarda et al., 2004). Questa conclusione è stata confermata anche da esperimenti condotti in vivo incrociando topi RB-lox con topi che esprimono la ricombinasi Cre nei mioblasti oppure esclusivamente nei miotubi terminalmente differenziati. I risultati ottenuti indicano che i topi che perdono RB nei mioblasti indifferenziati non sopravvivono, mentre la delezione di RB dopo la formazione di miotubi multinucleati, garantisce un apparato scheletrico apparentemente simile al fenotipo wild-type e che non presenta alterazioni nella rigenerazione (Huh et al., 2004; Camarda et al., 2004).

Sempre mediante l'uso di mioblasti in cui il gene RB può essere deletato in maniera condizionale, è stato valutato l'effetto della perdita della funzione di pRb nei miotubi a livello biochimico. Come atteso, è stato registrato un incremento dell'attività transattivante dei fattori trascrizionali E2F e un aumento dell'espressione dei geni da essi controllati (ciclina E, A e chinasi associate). Viene anche indotta l'espressione delle proteine coinvolte nella replicazione del DNA come PCNA, MCM2, DNA ligasi I e RPA. La perdita di pRb, quindi, attiva gli eventi molecolari associati alla transizione in fase S ma non permette la sintesi del DNA. Nei miotubi privi di pRb la sintesi del DNA può però essere riattivata in seguito ad infezione con adenovirus codificanti ciclina D1 e Cdk4. Il mantenimento dello stato postmitotico sembra quindi essere assicurato da un meccanismo indipendente dalla funzione di pRb, ma dipendente dall'espressione di Cdk4 e della ciclina

D1. pRb risulta tuttavia essenziale per l'espressione ottimale dei geni coinvolti nella fase tardiva del differenziamento muscolare sia nel corso del differenziamento che nei miotubi post-mitotici (Camarda et al., 2004).

Considerazioni finali

Da quanto detto finora risulta chiaro che la realizzazione del programma miogenico è controllata da una molteplicità di segnali che convergono sulla funzione dei fattori miogenici. L'esistenza di diversi meccanismi fornisce il vantaggio di un sistema di controllo ridondante che assicura la corretta uscita dal ciclo cellulare e l'induzione del processo differenziativo.

I fattori miogenici, una volta attivati dalla scomparsa dei segnali proliferativi, inducono l'espressione e/o la funzione d'inibitori della proliferazione e, contemporaneamente, innescano il programma differenziativo. Gli inibitori, da una parte contribuiscono all'arresto del ciclo cellulare, dall'altra, potenziano l'attività dei fattori miogenici, generando un circuito regolativo a feed-back positivo. Queste complesse e raffinate interconnessioni tra i meccanismi regolatori dell'uscita dal ciclo cellulare e del differenziamento miogenico suggeriscono un adattamento evolutivo finalizzato ad impedire la reversibilità dello stato differenziato. La mancanza di un corretto controllo dell'esclusione reciproca degli stati di proliferazione e differenziamento determina o morte cellulare apoptotica o, alternativamente, dedifferenziamento e crescita neoplastica incontrollata.

Scopo del lavoro

L'inizio di un programma differenziativo coinvolge l'attivazione di geni mantenuti in uno stato silente fino all'arrivo di segnali induttivi esterni. Nel caso della miogenesi, tali segnali convergono sulla funzione dei fattori regolatori miogenici i quali, essendo fattori di trascrizione, si legano a sequenze specifiche all'interno delle regioni regolatorie dei geni muscolari inducendone la trascrizione.

E' ormai risaputo che MyoD è il principale esecutore del differenziamento della cellula in senso muscolare. E' stato dimostrato che MyoD, sebbene possieda un'attività di rimodellamento della cromatina, causa solo un parziale grado di rilassamento della struttura cromatinica a livello dei promotori muscolari e che probabilmente altri fattori cooperano con MyoD per un completo rimodellamento cromatinico di questi loci. Recentemente è stato visto che MyoD necessita dei complessi di rimodellamento della cromatina Swi/Snf per attivare la trascrizione dei geni muscolo-specifici e che questi complessi sono reclutati sui loci miogenici nel corso del differenziamento muscolare (de la Serna et al., 2001; Simone et al., 2004).

Nelle cellule di mammifero coesistono due subunità con funzione ATPasica, Brm e BRG1, che si alternano all'interno di questi complessi multienzimatici. Nostri dati preliminari dimostrano che Brm è specificamente e progressivamente indotto durante il differenziamento muscolare, mentre BRG1 è espresso costitutivamente.

Questo dato ci ha suggerito l'ipotesi che il complesso SWI/SNF contenente Brm eserciti un ruolo specifico e diverso dal complesso contenente BRG1 nel corso del differenziamento muscolare.

Pertanto, per studiare il ruolo di Brm, abbiamo utilizzato due tipi di approcci sperimentali. Il primo è consistito nell'utilizzo di mutanti di Brm con funzione dominante-negativa. Tuttavia, questo tipo di approccio può intaccare anche le funzioni del complesso SWI/SNF basato su BRG1, e non permette di studiare il ruolo specifico di Brm. Abbiamo quindi utilizzato un secondo approccio sperimentale: l'utilizzo di cellule knock-out per il gene Brm.

Al contrario, dato che l'inattivazione di *BRG1* provoca una precoce letalità nei topi, per studiare il ruolo di BRG1 ci siamo proposti di utilizzare l'approccio dell'RNA interference inducibile.

RISULTATI

Il differenziamento miogenico è associato ad un incremento dei livelli di espressione di Brm

E' stato recentemente dimostrato che il differenziamento muscolare indotto da MyoD richiede l'attività enzimatica dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF (de la Serna et al., 2001a); non è stato tuttavia determinato se i due tipi di complesso SWI/SNF, contenenti Brm o BRG1 quale subunità ATP-asica, hanno funzioni ridondanti o distinte.

L'obiettivo di questo lavoro è pertanto quello di studiare il ruolo funzionale specifico di Brm e BRG1 nella regolazione dell'attività miogenica di MyoD.

Ci siamo innanzitutto chiesti come fosse regolata l'espressione di Brm e di BRG1 nel corso del differenziamento muscolare scheletrico utilizzando i mioblasti murini della linea C2C7 come sistema miogenico modello. I mioblasti C2C7 possono essere propagati nello stato non differenziato se coltivati in terreno contenente un' alta concentrazione di fattori di crescita (growth medium, GM); per indurre il differenziamento terminale, vengono trasferiti in terreno con bassa concentrazione di siero (differentiation medium, DM), condizione necessaria per indurre l'attività di MyoD.

Nella **Figura 4a** è riportata un'analisi per Western blot di estratti proteici preparati da mioblasti proliferanti, o coltivati in terreno di differenziamento per intervalli di tempo crescenti. I livelli di espressione di BRG1 e Brm sono stati determinati insieme a quelli di vari marcatori del processo differenziativo. In particolare, è stata esaminata l'espressione di due proteine regolatrici del ciclo cellulare, pRb e la ciclina A, e quella di alcune proteine specifiche del differenziamento terminale, miogenina, la catena pesante della miosina (MHC) e l'actina α -scheletrica. I risultati ottenuti mostrano che, come atteso, i livelli della proteina pRb aumentano precocemente in concomitanza con la sintesi di miogenina e la diminuzione della ciclina A, mentre i marcatori tardivi del differenziamento, quali MHC e α -actina, vengono indotti a tempi successivi. Inoltre per quanto riguarda la proteina pRb si può apprezzare una progressiva defosforilazione, tale per cui si passa da mioblasti in cui è presente solo la forma iperfosforilata, a miotubi terminalmente differenziati, in cui è presente quasi esclusivamente la forma ipofosforilata, attiva nell'inibizione della proliferazione. Riguardo alle due componenti dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF, si può osservare che i livelli della proteina BRG1 rimangono

pressoché costanti nel corso del differenziamento, mentre quelli di Brm aumentano progressivamente a partire dalle prime fasi del differenziamento. L'analisi dell'espressione della chinasi cdk4, i cui livelli rimangono costanti durante il differenziamento, consente di verificare che il caricamento dei campioni usati per il Western blot sia omogeneo.

Ci siamo poi chiesti se gli aumentati livelli di espressione della proteina Brm riscontrati nel corso del differenziamento rispecchino un'induzione a livello trascrizionale. Per verificare questa ipotesi, abbiamo eseguito un'analisi di espressione genica mediante RT-PCR (**Figura 4b**). Gli RNA utilizzati sono stati estratti da mioblasti proliferanti (GM) o terminalmente differenziati (DM). Il cDNA ricavato è stato utilizzato come template per l'amplificazione delle regioni codificanti i geni *BRM*, *BRG1* o miogenina. Per la quantificazione del materiale utilizzato è stato amplificato il gene codificante la ciclofillina, la cui espressione non è regolata nel corso del differenziamento. I risultati di questo esperimento mostrano che l'espressione dell'mRNA di Brm viene notevolmente indotta (circa 16 volte) nei miotubi terminalmente differenziati; anche i livelli di espressione del gene *BRG1* sembrano aumentare ma in misura decisamente minore.

L'osservazione che l'espressione di Brm è specificamente indotta durante il differenziamento miogenico indica che nei mioblasti differenziati la concentrazione dei complessi SWI/SNF contenenti l'ATP-asi Brm aumenta notevolmente, e suggerisce che la proteina Brm svolge una funzione specifica nella regolazione del differenziamento terminale.

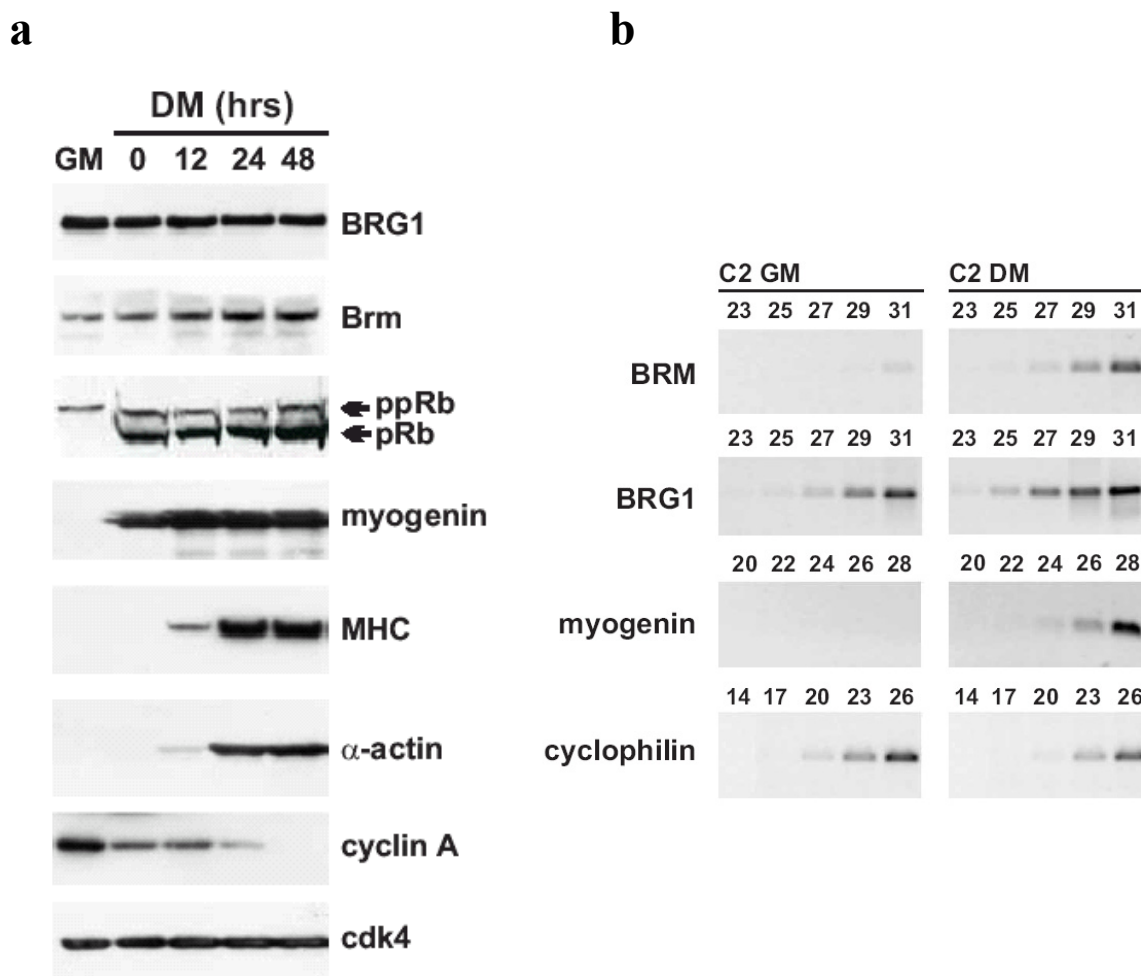


Figura 4. Analisi d' espressione di Brm e BRG1 nel corso del differenziamento muscolare.

(a) Analisi mediante Western blot di estratti proteici di mioblasti della linea C2, proliferanti (GM) o coltivati in terreno di differenziamento (DM) per intervalli di tempo crescenti. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE ed analizzate tramite immunoblot utilizzando anticorpi specifici per le proteine indicate.

(b) Analisi mediante RT-PCR Semi Quantitativa di cDNA retrotrascritto da RNA totali estratti da mioblasti della linea C2, proliferanti (GM) o coltivati in terreno di differenziamento (DM) per 48h. Per amplificare le regioni codificanti i geni BRM, BRG1, miogenina e ciclofillina sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici. Il numero di cicli di amplificazione è indicato. Per assicurarsi che i cicli di amplificazione analizzati siano nella fase lineare della reazione di PCR, sono stati fatti cinque prelievi di 20 μ l della miscela di reazione (100 μ l iniziali) ogni due cicli.

Caratterizzazione del ruolo delle regioni funzionali di Brm nel corso del differenziamento muscolare

Per studiare il ruolo di Brm nel processo differenziativo miogenico, un primo approccio è stato l'uso di mutanti dominanti-negativi di Brm. Come mostrato schematicamente nella Figura 5, la proteina Brm possiede vari domini strutturali e funzionali, tra cui una regione responsabile del legame dell'ATP, una regione tramite cui Brm interagisce con pRb (regione E7) e una regione carbossi-terminale, contenente una sequenza ricca in lisine e arginine (regione KR) e un Bromodominio, responsabile quest'ultimo dell'interazione di Brm con proteine acetilate. Abbiamo utilizzato mutanti di Brm (schematizzati in **Figura 5**), in cui sono state introdotte mutazioni che aboliscono il legame per l'ATP, o l'interazione con pRb, o che rimuovono la regione carbossi-terminale. Quando sovraesprese nelle cellule tramite trasfezione, queste proteine mutanti di Brm vanno a sostituire la proteina Brm endogena nei complessi SWI/SNF, agendo così da dominanti negativi e causando la perdita della funzionalità di questi complessi.

Per analizzare l'effetto della sovraespressione di questi mutanti di Brm sul differenziamento muscolare abbiamo misurato l'espressione di un marcatore tardivo del differenziamento quale la creatina chinasi muscolare (MCK). Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un costrutto reporter contenente il promotore del gene MCK a monte del gene codificante la luciferasi. Questo costrutto è stato trasfettato transientemente in fibroblasti murini della linea C3H10T1/2 insieme a un vettore di espressione per MyoD e a quantità crescenti di Brm wild-type, o di ciascun mutante dominante-negativo di Brm. Il giorno successivo alla trasfezione, le cellule sono state trasferite in terreno di differenziamento per 48h e poi lisate; è stata quindi misurata l'attività luciferasica degli estratti proteici così ottenuti. I risultati mostrati nella **Figura 6a** indicano che ciascuno dei tre mutanti dominanti-negativi di Brm è capace di inibire notevolmente, e in maniera dose-dipendente, la capacità di MyoD di indurre l'attività del promotore di MCK. È da notare che la sovraespressione di Brm wild-type non produce un incremento dell'attività del promotore di MCK, anzi un aumento della dose trasfettata risulta in una leggera inibizione. Questi risultati suggeriscono che l'inibizione di tre importanti funzioni di Brm -attività ATP-asi, interazione con pRb e interazione con istoni acetilati- risulta nell'inibizione dell'attività trascrizionale iniziata da MyoD. Inoltre, l'osservazione che anche la proteina Brm wild-type può risultare inibitoria se espressa in dosi troppo elevate indica che perché i complessi SWI/SNF possano svolgere la loro funzione fisiologica il complesso contenente Brm non può eccedere oltre un certo limite il complesso contenente BRG1.

Per confermare questi risultati, ottenuti misurando l'espressione di un gene reporter trasfettato transientemente, abbiamo analizzato gli effetti degli stessi mutanti dominanti-negativi di Brm sull'espressione di geni muscolari endogeni, quali MHC e miogenina. Pertanto, gli estratti proteici, oltre ad essere saggiati per attività luciferasica, sono stati analizzati mediante Western blot. Come si vede in **Figura 6b**, la proteina MyoD trasfettata viene espressa omogeneamente in tutte le cellule. Per quanto riguarda i marcatori endogeni del differenziamento muscolare, a conferma di quanto ottenuto nei saggi di attività enzimatica, si può osservare che sia l'espressione di miogenina che quella di MHC sono fortemente inibite se insieme a MyoD viene trasfettato ciascuno dei tre mutanti di Brm. L'effetto inibitorio è evidente soprattutto per MHC, marcatore del differenziamento tardivo, i cui livelli di espressione vengono drasticamente ridotti anche in presenza di basse dosi dei mutanti di Brm, rispetto alle cellule trasfettate con Brm wt. L'analisi dell'espressione della proteina cdk4 consente di verificare che il caricamento dei campioni usati per il Western blot sia uniforme. Questi risultati indicano che la proteina Brm svolge una funzione essenziale nel controllo dell'espressione dei geni muscolo specifici, sia precoci, come miogenina, sia tardivi, come MHC.

Tuttavia, l'approccio tramite utilizzo di mutanti dominanti-negativi di Brm su riportato non ci consente di determinare se il complesso SWI/SNF contenente Brm svolge una funzione specifica e distinta da quella svolta dal complesso SWI/SNF contenente BRG1. Infatti, i mutanti di Brm (così come pure Brm wild-type) una volta espressi ectopicamente nelle cellule vanno a sostituire le subunità catalitiche endogene nei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF. È quindi molto probabile che ciò risulti nell'inattivazione funzionale di entrambe i tipi di complesso SWI/SNF presenti nella cellula, sia quelli contenenti Brm sia quelli contenenti BRG1.

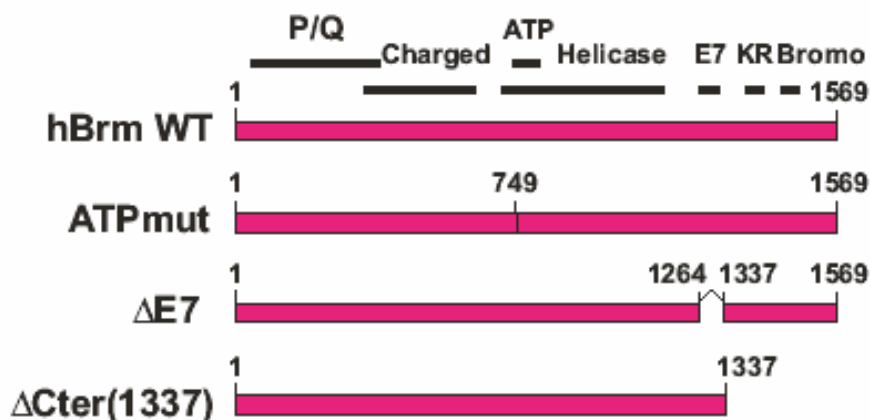


Figura 5. Struttura primaria della proteina Brm

Rappresentazione schematica dei domini strutturali della proteina Brm: P/Q, regione N-terminale ricca in proline e glutammine; Charged, regione composta da un susseguirsi di tratti carichi positivamente e negativamente; ATP, regione contenente il sito di legame per l'ATP; Helicase, dominio elicastico con attività ATPasica DNA-dipendente; E7, dominio di interazione con la proteina retinoblastoma; KR, regione ricca in arginine e lisine; Bromo, bromodominio che permette l'interazione di Brm con le lisine acetilate degli istoni. I mutanti utilizzati presentano una mutazione dell'aminoacido 749 nella regione ATPasica (ATPmut); una delezione dei residui 1264-133 ($\Delta E7$); una delezione degli ultimi 232 aminoacidi ($\Delta C\text{-ter}$).

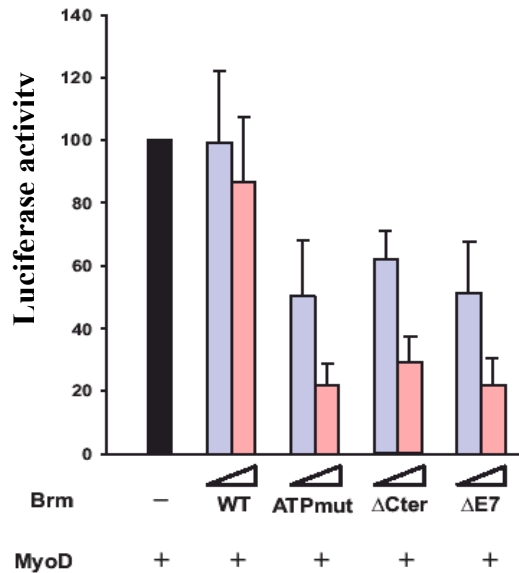
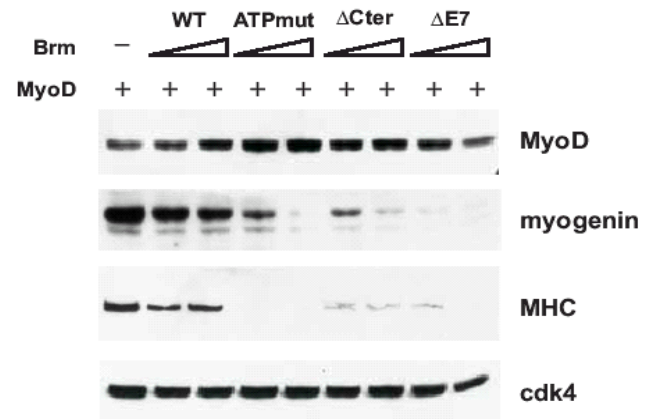
a**b**

Figura 6. Dominanti negativi delle regioni funzionali di Brm compromettono gravemente l'induzione dei geni muscolari mediata da MyoD.

(a) Fibroblasti C3H10T1/2 sono stati trasfettati con 0.5 μ g del costrutto reporter MCK-luc e 0.2 μ g del vettore di espressione pcDNA3-MyoD, da solo o con dosi crescenti (1 e 2 μ g) dei costrutti esprimenti Brm wt o i mutanti dominanti-negativi di Brm (descritti in Fig 4). Le cellule sono state coltivate in DM 48 ore, quindi è stata saggiata l'attività luciferasica degli estratti cellulari. I valori di attività luciferasica sono riportati come percentuale dell'attività misurata nelle cellule trasfettate con MyoD da solo. Le trasfezioni sono state ripetute tre volte ed in doppio per ogni campione, le barre d'errore rappresentano le deviazioni standard.

(b) Determinazione tramite western blot dei livelli d'espressione dei marcatori muscolari endogeni in un esperimento rappresentativo di quello mostrato in a.

L'attività miogenica di MyoD è compromessa in assenza di Brm

Per determinare il ruolo specifico del complesso SWI/SNF contenente Brm nel controllo del differenziamento miogenico, è stato quindi necessario analizzare un sistema cellulare in cui fosse inattivata la funzione della proteina Brm, ma non quella di BRG1. A questo scopo, abbiamo utilizzato fibroblasti embrionali (MEF, mouse embryonic fibroblasts) con genotipo *BRM*^{-/-} (MEF Brm-KO), isolati da topi knock-out per il gene *BRM*, e la loro controparte wild-type (MEF Brm-WT), derivate dai topi di controllo. Questi fibroblasti sono stati “convertiti” in mioblasti tramite infezione con un retrovirus codificante per MyoD, e una volta diventati confluenti sono stati coltivati in condizioni di differenziamento per tempi crescenti. Gli estratti proteici preparati a ciascun tempo sono stati quindi analizzati tramite Western blot (**Figura 7a**). Per prima cosa abbiamo verificato che le due linee cellulari esprimessero in maniera equivalente MyoD. Sono stati poi esaminati i livelli dei marcatori del differenziamento, miogenina, MHC e α -actina. I risultati ottenuti mostrano che l'espressione di questi geni è fortemente ridotta nelle cellule MEF Brm-KO rispetto alle cellule MEF Brm-WT. La mancanza di Brm nelle cellule MEF Brm-KO sembra comunque avere un effetto inibitorio maggiore sull'espressione dei marcatori tardivi, MHC e α -actina, rispetto a quello che ha sull'espressione della miogenina. Sono stati inoltre esaminati i livelli della ciclina A e della proteina retinoblastoma, pRb. In entrambe le linee cellulari, la ciclina A risulta espressa solo al tempo 0, cioè al momento in cui le cellule sono state trasferite in terreno di differenziamento; questo denota un normale arresto del ciclo cellulare anche in assenza della proteina Brm. L'analisi dell'espressione di pRb conferma questa conclusione, infatti si osserva una progressiva diminuzione della forma iperfosforilata e un aumento della forma iposforilata, come atteso nelle cellule terminalmente differenziate, con un andamento analogo in entrambe le linee cellulari, MEF Brm-KO e MEF Brm-WT. L'analisi di espressione della proteina BRG1 dimostra che i suoi livelli non mutano consistentemente durante il differenziamento nelle cellule MEF Brm-KO rispetto alle MEF Brm-WT. Infine, come atteso, l'espressione di Brm è assente nelle cellule MEF Brm-KO, mentre nelle cellule MEF Brm-WT i livelli di Brm aumentano nel corso del differenziamento. L'analisi dell'espressione dell' α -tubulina, i cui livelli rimangono costanti durante il differenziamento, consente di verificare che il caricamento dei campioni usati per il Western blot sia omogeneo.

Nella **Figura 7b** sono riportati i risultati di esperimenti di trasfezione transiente effettuati per misurare l'attività trascrizionale di MyoD nelle cellule MEF Brm-WT e MEF Brm-KO. A questo scopo, abbiamo saggiato l'attività luciferasica del costrutto reporter 4RE-Luc, che esprime il gene codificante la luciferasi sotto il controllo di un promotore sintetico contenente quattro siti di legame per MyoD. Le cellule sono state trasfettate con il costrutto 4RE-Luc, da solo o insieme a un vettore di espressione per MyoD, messe in terreno di differenziamento un giorno dopo la trasfezione e tenute a bassa concentrazione di siero per 48h. Gli estratti proteici ottenuti sono stati quindi utilizzati per il saggio luciferasico. Nella figura **7b** sono riportati i valori di attività della luciferasi delle cellule MEF Brm-WT e MEF Brm-KO, in presenza o in assenza di MyoD. Come atteso, nelle cellule Brm-WT l'attività luciferasica viene fortemente indotta da MyoD. Al contrario, nelle cellule Brm-KO l'attività trascrizionale di MyoD risulta drasticamente inibita. Abbiamo inoltre verificato se la mancanza di Brm inficiasse l'azione transattivante di MyoD anche sui marcatori endogeni. A tale scopo, i campioni di un esperimento rappresentativo sono stati analizzati per Western blot. Come riportato sempre in figura **7b**, pur essendo MyoD espresso a livelli simili, l'espressione di MHC è indotta nelle cellule MEF Brm-WT ma non nelle MEF Brm-KO.

Insieme, questi dati indicano che l'assenza della proteina Brm compromette l'induzione trascrizionale mediata da MyoD dei marcatori miogenici, ma non quella dei geni regolatori del ciclo cellulare.

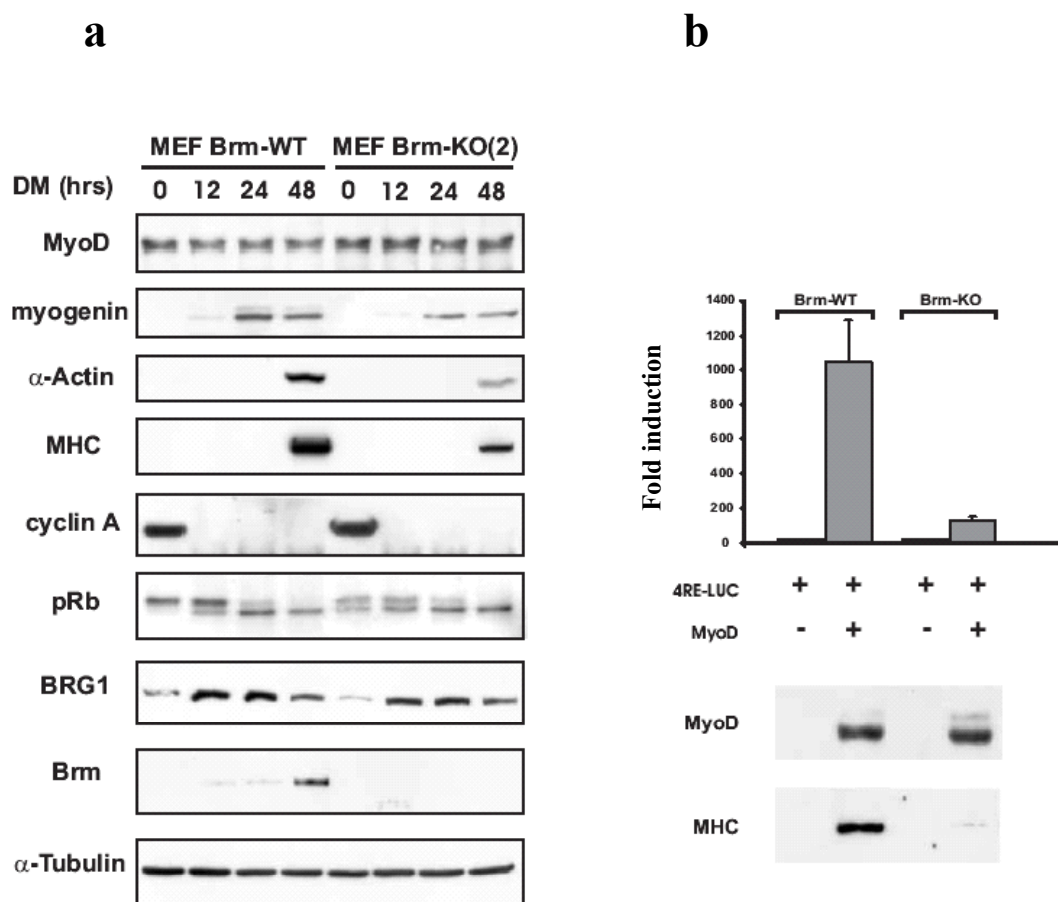


Figura 7. Il differenziamento miogenico indotto da MyoD è compromesso in fibroblasti *BRM*^{-/-}.

(a) Analisi mediante Western blot di estratti proteici di fibroblasti embrionali murini (MEF), wild-type (WT) o knockout (KO) per BRM, indotti a differenziare dopo infezione retrovirale con il vettore pBABE-puroMyoD per i tempi indicati. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e rilevate con anticorpi specifici per MyoD, miogenina, α -actina, miosina catena pesante (MHC), ciclina A, pRb, BRG1, Brm e α -tubulina.

(b) L'attività transattivante di MyoD è stata valutata tramite saggi di luciferasi in fibroblasti MEF Brm-WT e MEF Brm-KO, indotti a differenziare per 48h. Le cellule sono state trasfettate con 0.3 μ g del costrutto reporter 4RE-Luc (gene reporter per la luciferasi sotto il controllo di quattro E-box), da solo o insieme a 0.2 μ g del vettore di espressione pcDNA3-MyoD. I valori di attività luciferasica sono espressi come volte di induzione rispetto al valore misurato nelle cellule trasfettate col solo reporter 4R-Luc, che è stato arbitrariamente considerato uguale a 1. I Lisati cellulari di un esperimento rappresentativo sono inoltre stati utilizzati per l'analisi del marcatore endogeno MHC, e per rivelare la presenza di MyoD, mediante Western blot.

La reintroduzione di Brm in cellule $Brm^{-/-}$ ripristina l'espressione dei fattori miogenici

Per accertarsi che i ridotti livelli d'espressione delle proteine muscolari, riscontrati nelle cellule $BRM^{-/-}$ indotte a differenziare, sono dovuti all'assenza di Brm e non ad altre mutazioni che potrebbero essersi accumulate durante la propagazione delle cellule MEF Brm-KO in coltura, abbiamo pensato di ri-esprimere Brm in queste cellule in maniera inducibile, ed analizzare poi il differenziamento indotto da MyoD. A tale scopo, abbiamo creato una linea di fibroblasti Brm-KO che esprime stabilmente il trans-attivatore TetON (vedi materiali e metodi). Queste cellule, denominate Brm-KO¹³ sono state infettate con un retrovirus (pRevTRE-hBrm-Flag) codificante la proteina umana Brm, fusa all'epitopo FLAG, sotto il controllo di un promotore inducibile dalla doxyciclina, un analogo della tetraciclina. Questo retrovirus codifica inoltre il gene che conferisce la resistenza alla igromicina, che ha permesso selezionare le cellule infettate. La popolazione di cellule Brm-KO¹³ resistente alla igromicina è stata poi re-infettata con un retrovirus codificante MyoD. Le cellule infettate sono state trattate ulteriormente con doxyciclina o Tricostatina A (un inibitore delle isotone-deacetilasi) per aumentare l'espressione di Brm. E' stato recentemente visto, infatti, che la Brm viene acetilata e che questa modificazione consente un aumento dei livelli di espressione della proteina (Bourachot et al., 2003). Dopo due giorni, le cellule sono state indotte a differenziare come descritto sopra e raccolte dopo 48 ore.

Come possiamo notare nella **Figura 8**, i livelli basali della proteina Brm espressa ectopicamente, rilevata con l'anticorpo anti-FLAG, sono risultati già alti senza induzione con doxyciclina o Tricostatina A, condizioni in cui si nota solo un leggero aumento d'espressione. Possiamo osservare che la reintroduzione di Brm, ripristina l'espressione dei marcatori miogenici quali miogenina, α -actina sarcomerica e la miosina catena pesante. Tali proteine risultano infatti ridotte (vedi miogenina) o assenti (vedi α -actina e MHC) nelle cellule parentali KO¹³. L'analisi dell'espressione di Cdk4 è stata effettuata come controllo dell'omogeneità di caricamento dei campioni sul gel.

Questi risultati indicano che la reintroduzione di Brm in cellule prive di tale proteina, risulta nel recupero dell'induzione delle proteine muscolo-specifiche mediata da MyoD.

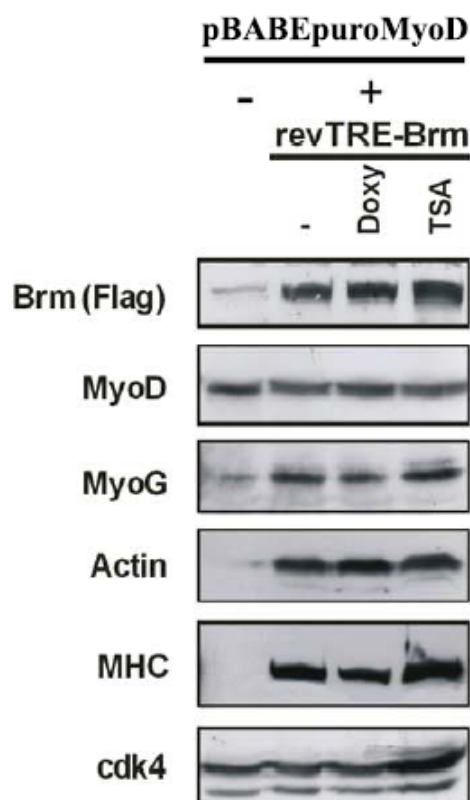


Figura 8. La reintroduzione di *Brm* in cellule *BRM*^{-/-} ripristina l'espressione dei marcatori muscolari.

Fibroblasti *Brm*-KO, che esprimono stabilmente il transattivatore Tet-ON (KO^{l3}) sono stati infettati con un retrovirus codificante per *Brm*-FLAG sotto il controllo di una regione responsiva alla tetraciclina (pRevTRE-*Brm*-FLAG). Il costrutto retrovirale codifica anche per il gene che conferisce resistenza alla igromicina e le cellule infettate sono quindi state sottoposte a selezione con igromicina (200ug/ml). Le cellule igromicina resistenti sono state successivamente infettate con pBABEpuro-MyoD e trattate con Doxyciclina (Doxy 1 ug/ml) o Tricostatina A (TSA 20nM) per aumentare l'espressione di *Brm*. Le cellule sono state quindi trasferite in terreno di differenziamento e raccolte dopo 48 ore. I lisati cellulari sono stati poi sottoposti ad analisi di western blot utilizzando anticorpi specifici per le proteine indicate.

Cloni derivati da MEFs Brm^{-/-} che esprimono stabilmente Brm recuperano le capacità differenziative

Al fine di saggiare in maniera approfondita il ruolo di Brm nel differenziamento muscolare, abbiamo pensato di analizzare alcuni cloni derivati dalla popolazione di cellule KO¹³ infettata con il retrovirus pRevTRE-hBrm-flag. Due cloni, denominati A2 e A3, sono stati scelti per una caratterizzazione completa. Tali cloni esprimono livelli apprezzabili di Brm come si può osservare dall'analisi per immunofluorescenza (**Figura 9a**). Le cellule parentali KO¹³ e le cellule Brm-WT sono state incluse nell'esperimento come controlli. Dall'immagine di immunofluorescenza si può osservare per Brm presenta un pattern d'espressione nucleare puntellato, tipico delle proteine associate alla matrice nucleare.

Abbiamo poi analizzato il differenziamento indotto da MyoD nei cloni A2 e A3, paragonato alle cellule di controllo Brm-WT e Brm-KO¹³. L'immagine microscopica a contrasto di fase (**Figura 9b**), mostra che i cloni che esprimono Brm (A2 e A3) recuperano le capacità differenziative, come evidenziato dalla formazione di miotubi, che sono invece assenti nelle cellule parentali Brm-KO¹³.

La **Figura 9c** mostra i livelli d'espressione delle proteine muscolo-specifiche (Miogenina, MHC e α -actina), dei regolatori trascrizionali (MyoD e Mef2C) e degli enzimi di rimodellamento della cromatina (Brm e BRG1), determinati tramite western blot. I vari campioni sono stati esaminati dopo 72 ore dall'inizio del differenziamento. Innanzitutto, sono stati monitorati i livelli d'espressione di MyoD per controllare l'omogeneità dell'efficienza di infezione delle varie linee cellulari. Per quanto riguarda l'espressione dei marcatori muscolari, si può osservare che nei cloni A2 e A3 vengono recuperati i livelli d'espressione del marcatore precoce miogenina, ma soprattutto quelli dei marcatori tardivi, quali MHC e α -actina. In contrasto, i livelli di BRG1 e di Mef2C non subiscono sostanziali variazioni d'espressione tra le cellule con e senza Brm. L'analisi dei livelli d'espressione della tubulina, che non variano durante il differenziamento, sono stati esaminati per verificare che il caricamento dei campioni usati per il western blot sia omogeneo.

Questi risultati dimostrano che inserendo stabilmente *BRM* in cellule prive di tale gene, si ha il recupero delle capacità differenziative sia in termini di espressione di marcatori miogenici sia a livello della formazione dei miotubi.

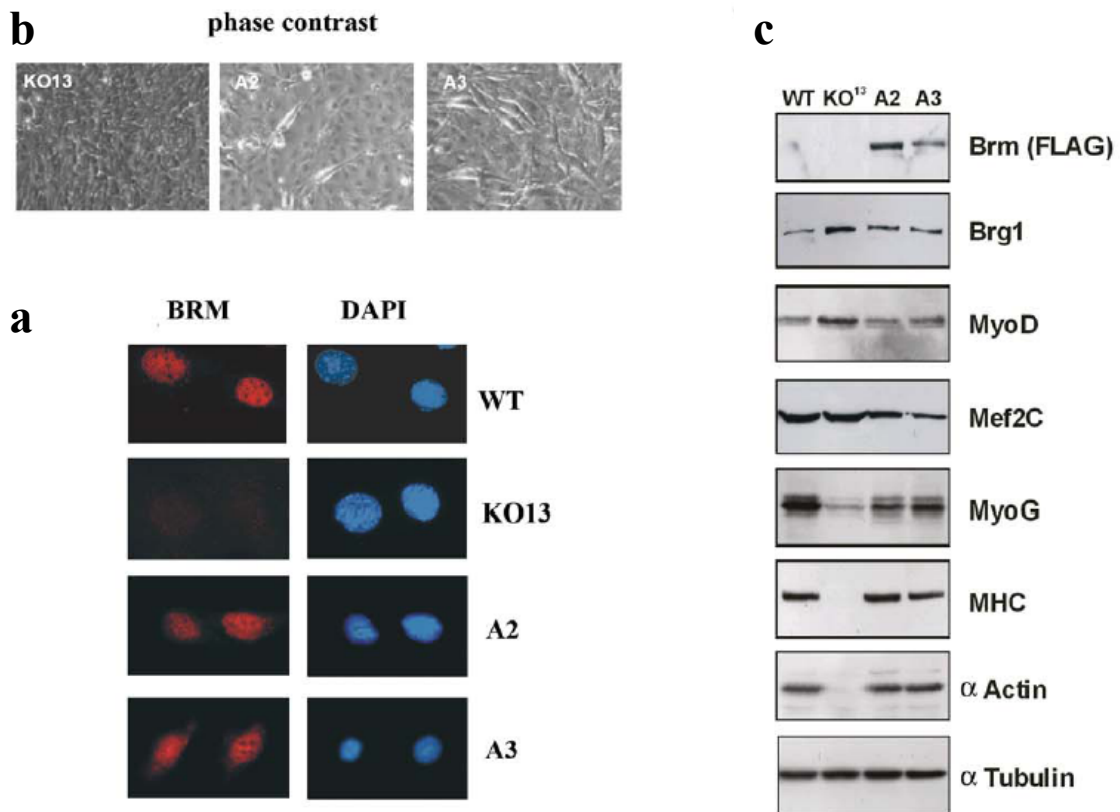


Figura 9. Cloni di fibroblasti $BRM^{-/-}$ in cui è stato reintrodotta *Brm* riacquistano le capacità differenziative.

Diversi cloni, esprimenti stabilmente *Brm*, sono stati isolati a partire dalla popolazione igromicina resistente descritta in figura 8. Sono stati scelti due cloni, A2 e A3 per ulteriore caratterizzazione. (a) L'espressione della proteina *Brm* è stata rilevata attraverso immunofluorescenza indiretta nelle cellule WT, KO13, A2 e A3 usando un anticorpo policlonale specifico per *Brm* (gentilmente donato da Yaniv M.) e tramite western blot usando l'anticorpo contro l'epitopo FLAG (c).

(b) Immagine a contrasto di fase delle cellule KO^{13} , A2 e A3 infettate con il retrovirus pBABEpuroMyoD e indotte a differenziare in terreno a bassa concentrazione di siero. Nei cloni che esprimono stabilmente *Brm* si recupera la capacità di formare i miotubi.

(c) Espressione dei fattori miogenici, delle proteine strutturali muscolo-specifiche e degli enzimi SWI/SNF monitorati per western blot nelle cellule WT, KO^{13} , A2 e A3 infettate con MyoD e indotte a differenziare.

Analisi del reclutamento dei complessi SWI/SNF e di attivatori trascrizionali sui promotori muscolo-specifici nei cloni che esprimono stabilmente la proteina Brm

I dati raccolti sin ora dimostrano che la proteina Brm è richiesta per l'attivazione, mediata da MyoD, dell'espressione dei marcatori del differenziamento muscolare. Ciò suggerisce che la proteina possa essere presente sui promotori muscolo-specifici e contribuire alla loro attivazione.

Per testare questa ipotesi abbiamo condotto esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) nei cloni K0¹³, A2 e A3 indotti a differenziare terminalmente come descritto precedentemente (**Figura 10**). L'analisi è stata condotta utilizzando anticorpi contro MyoD, MEF2C, p300 e PCAF (pannello superiore) e contro MyoD, Brm, BRG1 e l'istone H4 acetilato (pannello inferiore). 1/15 del DNA immunoprecipitato è stato usato per l'analisi di PCR, l'input rappresenta l'1% del DNA genomico totale. Nell'analisi di PCR la localizzazione delle proteine immunoprecipitate sui promotori muscolari è stata rilevata usando *primers* specifici che amplificano sequenze contenute nelle regioni regolative dei geni *miogenina*, *MHC*, *MCK* e *desmina*. Le regioni dei promotori amplificate dai primers sono schematizzate nella **Figura 11**; tutte le regioni considerate comprendono E-box e sequenze di legame per MEF2. I primers diretti contro la regione intragenica della *GAPDH*, sono stati utilizzati come controllo negativo della ChIP.

Si può osservare dalla **Figura 10** che sia i cofattori trascrizionali dotati di attività di acetil-trasferasi, p300 e PCAF, sia i fattori regolatori miogenici MyoD e Mef2C sono reclutati su tutti i promotori considerati nei cloni che esprimono Brm (A2, A3), mentre sono quasi del tutto assenti nelle cellule Brm-KO13. Abbiamo poi esaminato il reclutamento degli enzimi di rimodellamento della cromatina, Brm e BRG1, e la presenza della forma acetilata dell'istone H4 sugli stessi promotori. Tale analisi ha rilevato che sia Brm sia BRG1 risultano localizzati su tutti i promotori considerati con eccezione di quello della desmina in cui sono presenti in misura piuttosto inferiore. Inoltre nei cloni A2 e A3 osserviamo livelli consistenti della forma acetilata dell'istone H4 suggerendo uno stato trascrizionale attivo dei geni presi in considerazione.

In contrasto, nel clone Brm-KO¹³, BRG1, sembra non avere accesso sui promotori, nonostante sia espressa come proteina (vedi **Figura 9c**) e anche il livello della forma acetilata dell'istone H4 è piuttosto basso su tali loci.

Insieme, questi risultati indicano che nei cloni che esprimono Brm, indotti a differenziamento terminale, sia i fattori di rimodellamento della cromatina sia i regolatori miogenici, vengono reclutati sui loci muscolari mentre non sembrano avere accesso sugli stessi promotori nel clone senza Brm.

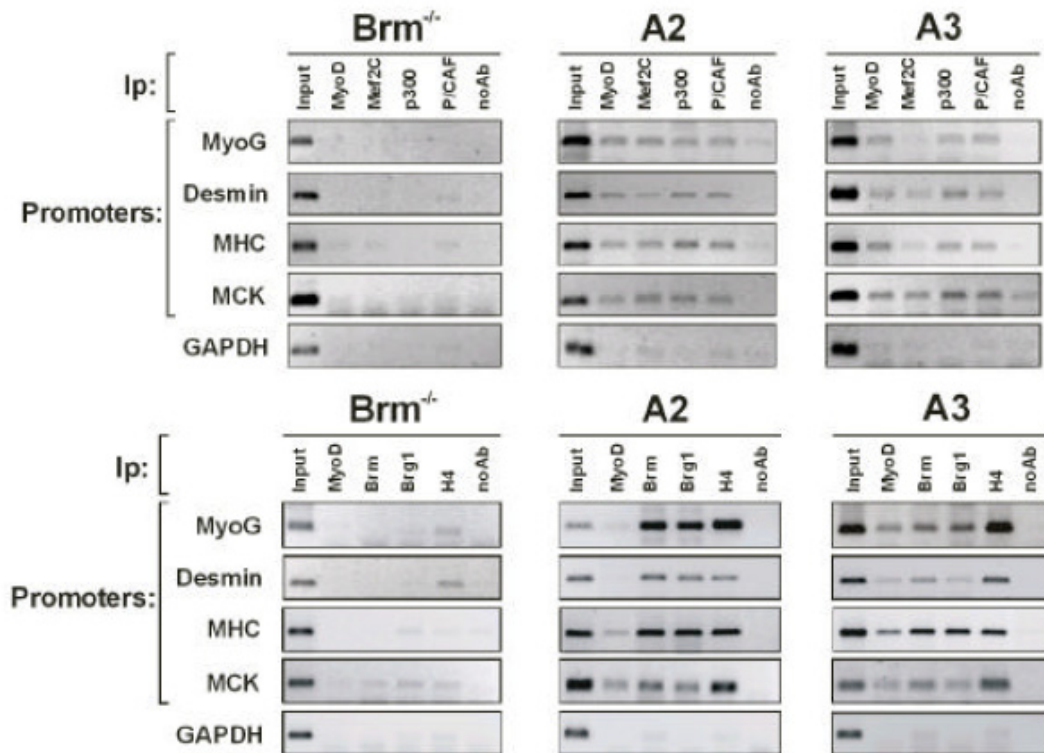


Figura 10. L'assenza di Brm compromette il reclutamento dei fattori miogenici e di rimodellamento della cromatina sui promotori muscolo-specifici.

Le cellule KO¹³, A2 e A3 sono state infettate con il retrovirus codificante per MyoD e indotte a differenziare in terreno a bassa concentrazione di siero. Dopo 72 ore dall'inizio del differenziamento le cellule sono state fissate con formaldeide 1%. Dopo la lisi, la cromatina è stata sonicata e immunoprecipitata con gli anticorpi specifici per i fattori di regolazione miogenici MyoD, MEF2C, le acetiltrasferasi p300 e P/CAF (pannello superiore), gli enzimi di rimodellamento Brm e BRG1 e l'istone H4 acetilato (pannello inferiore). Un'aliquota di cromatina è stata sottoposta a immunoprecipitazione in assenza di anticorpo (no Ab) come controllo negativo. Circa 1/15 del materiale immunoprecipitato è stato usato nell'analisi di PCR usando primers specifici contro i differenti promotori muscolari indicati. L'input rappresenta il 5% del DNA genomico totale. Una regione intragenica del gene GAPDH è stata amplificata come controllo negativo della ChIP.

Le osservazioni ricavate dall'analisi di ChIP, suggeriscono la possibilità che Brm eserciti un ruolo nello stabilizzare questi fattori sulle regioni regolatorie dei loci muscolo-specifici e promuova quindi la formazione di complessi trascrizionalmente attivi sui loci muscolari.

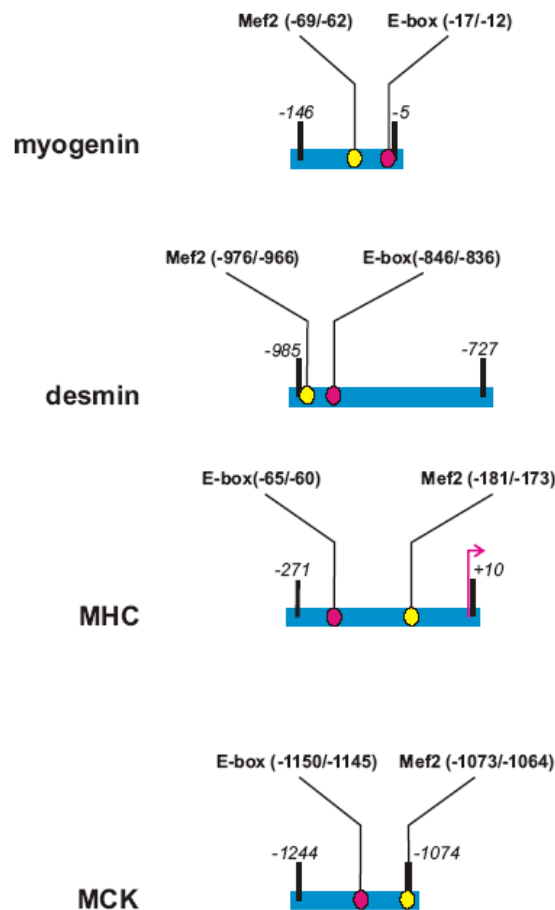


Figura 11. Rappresentazione schematica delle regioni dei promotori amplificate attraverso l'utilizzo di primers specifici nell'analisi di PCR successiva all'immunoprecipitazione della cromatina.

Analisi delle interazioni tra Brm e i fattori miogenici

La localizzazione di Brm sui promotori muscolari solleva la questione di come la proteina sia reclutata sui promotori muscolo-specifici. L'ipotesi che abbiamo ritenuto più probabile è che Brm interagisca fisicamente con i fattori regolatori miogenici.

Abbiamo quindi eseguito esperimenti di co-immunoprecipitazione usando estratti nucleari preparati da mioblasti C2C7 coltivati in terreno di differenziamento per 18 ore o per 48 ore. Le proteine Brm o BRG1 sono state immunoprecipitate con anticorpi specifici, e la presenza di MyoD, myogenin o MEF2C in tali immunoprecipitati è stata rilevata tramite western blot. Inoltre, per verificare la presenza, e la quantità, di Brm e BRG1 negli immunoprecipitati, abbiamo misurato l'espressione di INI1, una subunità in comune ai complessi SWI/SNF contenenti Brm o BRG1.

I risultati mostrati nella **Figura 12a** (pannello a destra), mettono chiaramente in evidenza un'interazione tra Brm e MEF2C sia a 18 che a 48 ore di differenziamento; inoltre, a 48 ore, la quantità di Mef2C che interagisce con Brm aumenta in maniera apprezzabile rispetto alle 18 ore. MEF2C è presente anche negli immunoprecipitati anti-BRG1, ma in misura nettamente inferiore. Nelle condizioni da noi utilizzate, non si osserva invece alcuna interazione tra Brm e BRG1 e i fattori miogenici bHLH, MyoD e miogenina. Infine, come atteso, abbiamo trovato una interazione simile tra Brm o BRG1 e la proteina retinoblastoma. In conclusione, Brm sembra interagire in maniera specifica, e molto più efficientemente di BRG1, con il fattore trascrizionale MEF2C.

L'associazione tra Brm e MEF2C è stata confermata anche nelle cellule A3 descritte precedentemente (Brm-KO in cui è stato re-introdotta il gene *BRM*). La proteina Brm è stata immunoprecipitata con un anticorpo anti-flag a partire da estratti preparati dal clone A3, o dalle cellule parentali Brm-KO¹³, e MEF2C è stata rilevata tramite western blot (**Figura 12a**, pannello a sinistra).

Dal momento che l'analisi di immunoprecipitazione ha messo in evidenza un'interazione tra le proteine Brm e MEF2C endogene, abbiamo voluto analizzare tale interazione anche tra le proteine sovraesprese. Pertanto fibroblasti 3T3 TetON sono stati cotrasfettati con i vettori d'espressione per TRE-Brm-FLAG e MEF2C-HA. L'espressione di Brm è stata indotta tramite trattamento con doxiciolina e, dopo 2 giorni, le cellule sono state raccolte e sottoposte ad estrazione proteica. L'immunoprecipitazione di Brm stata effettuata con l'anticorpo anti-Flag, mentre l'interazione con MEF2C, è stata monitorata

con l'anticorpo anti-HA. Come mostrato nella **Figura 12b**, anche questo approccio ha messo in evidenza l'associazione tra Brm e MEF2C.

Presi nel loro insieme, questi dati dimostrano che MEF2C interagisce preferenzialmente con Brm nel corso del differenziamento muscolare.

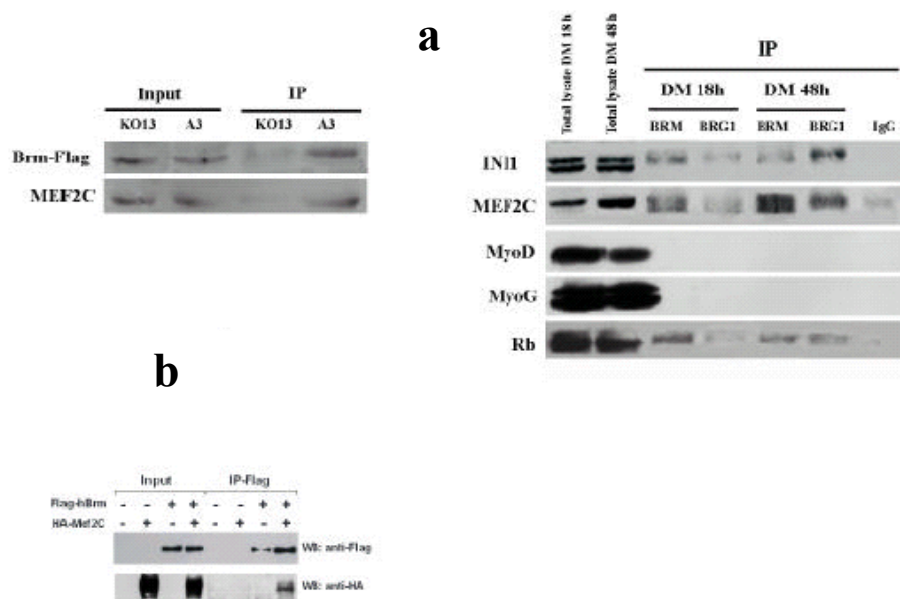


Figura 12. Mef2C e Brm interagiscono nel corso del differenziamento muscolare.

(a) Estratti proteici totali sono stati preparati dalle cellule KO13 e dal clone A3, in cui BRM è stato reintrodotta stabilmente, infettate con pBABEpuroMyoD e indotte a differenziare terminalmente. 1 mg di estratto è stato immunoprecipitato con l'anticorpo anti-Flag e MEF2C è stata rilevata negli immunoprecipitati tramite western blot (pannello a sinistra). 700 µg di estratti nucleari preparati da cellule C2 a 18 e a 48 ore dall'inizio del differenziamento, sono stati immunoprecipitati con anticorpi specifici per Brm e BRG1 (pannello a destra). Gli immunoprecipitati sono stati analizzati tramite western blot usando anticorpi specifici per INI-1, MyoD, mipgenina e MEF2C.

(b) Cellule 3T3 TetON sono state cotrasfettate con 5 µg di Mef2C-HA (pcDNA3-HA MEF2C) e 5 µg di Brm-FLAG (TRE-flag-BRM) e l'espressione di Brm è stata indotta con doxiciplina (1 µg/ml). I lisati proteici sono stati preparati dopo due giorni dalla trasfezione; Brm è stato immunoprecipitato con l'anticorpo per l'epitopo FLAG mentre la presenza di MEF2C negli immunoprecipitati è stata rivelata con l'anticorpo anti- l'epitopo HA.

Mioblasti Rb^{-/-}-esprimono bassi livelli della proteina Brm

I difetti differenziativi che abbiamo messo in evidenza nei fibroblasti *BRM^{-/-}* si sovrappongono in parte a quelli che si riscontrano nei mioblasti *RB^{-/-}*. E' noto che nel corso del differenziamento miogenico la funzione di pRb è necessaria non solo per l'arresto irreversibile del ciclo cellulare ma anche per la realizzazione della fase tardiva del programma miogenico; infatti, in assenza di pRb l'induzione trascrizionale dei geni specifici degli stadi tardivi della miogenesi scheletrica è drasticamente inibita (Novitch et al., 1996).

Nella **Figura 13** è mostrata l'analisi mediante Western blot di estratti proteici totali preparati da mioblasti *RB^{-/-}* della linea CC42 e di mioblasti *RB^{+/+}* della linea C2C7, proliferanti (GM) o coltivate in terreno di differenziamento (DM) per 48h. Innanzitutto è stata verificata l'assenza di pRb nella linea cellulare CC42, mentre nella linea C2 si nota sia l'aumento dei livelli di espressione che l'accumulo della forma ipofosforilata di pRb nelle cellule terminalmente differenziate. Per quanto riguarda i marcatori della proliferazione, sia la ciclina A che la ciclina E continuano ad essere espresse in condizioni di differenziamento nei mioblasti *RB^{-/-}*, indicando che l'assenza di pRb non permette l'arresto proliferativo che normalmente accompagna il differenziamento. Le cellule sono state inoltre caratterizzate per la presenza di MyoD e per i marcatori del differenziamento muscolare. Si può apprezzare come nelle cellule CC42 si realizzi solo la fase precoce del differenziamento miogenico, caratterizzato dall'induzione della miogenina. Non c'è invece evidenza del differenziamento tardivo come testimoniato dalla mancata espressione di MHC e dalla incapacità di queste cellule di fondersi per formare miotubi multinucleati (dato non mostrato). Infine l'espressione della proteina cdk4, i cui livelli rimangono costanti anche nel corso del differenziamento, permette di verificare il caricamento equivalente dei diversi campioni.

L'osservazione che sia l'assenza di pRb che quella di Brm risultano nella inibizione specifica dei geni tardivi del differenziamento miogenico ci ha suggerito la possibilità che pRb e Brm siano componenti di una stessa via regolativa. Inoltre, un esame attento della letteratura svela altre connessioni tra pRb e Brm. È stato dimostrato che

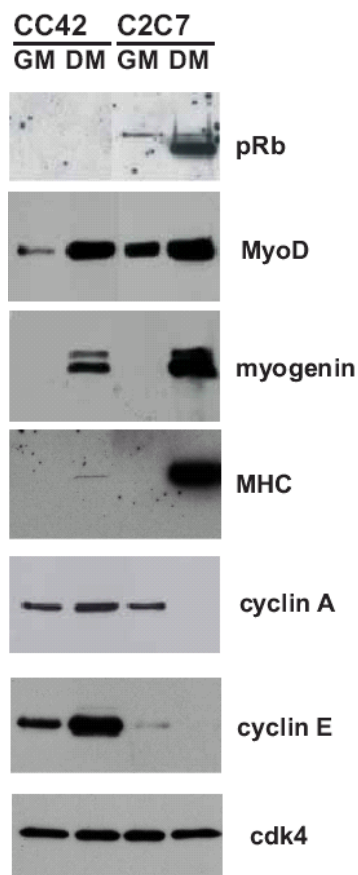


Figura 13. Espressione di geni muscolari e di regolatori del ciclo cellulare nella linea cellulare miogenica $RB^{-/-}$ CC42

Analisi mediante Western blot di estratti proteici totali di mioblasti delle linee C2 e CC42, proliferanti (GM), o coltivati in terreno di differenziamento per 48h (DM). Uguali quantità di proteine sono state separate mediante SDS-PAGE ed analizzate tramite immunoblot utilizzando anticorpi specifici per pRb, MyoD, miogenina, catena pesante della miosina (MHC), ciclina A, ciclina E, cdk4.

un ulteriore difetto dei mioblasti $RB^{-/-}$ consiste in una elevata attività della proteina Ras in queste cellule, ed è noto che Ras inibisce il differenziamento muscolare (Lee et al., 1999; Olson et al., 1987). D'altro canto, è stato osservato che la trasformazione di fibroblasti con un gene ras costitutivamente attivo porta alla repressione della trascrizione di Brm (Muchardt et al., 1998). Sulla base di queste osservazioni, abbiamo formulato l'ipotesi che nei mioblasti $RB^{-/-}$, dati gli alti livelli di attività di Ras, l'induzione dell'espressione di Brm da noi riscontrata durante il differenziamento sia inibita. Una nuova funzione di pRb pro-differenziativa sarebbe dunque quella di permettere una elevata espressione di Brm mantenendo repressa l'attività di Ras. Per verificare questa ipotesi, abbiamo pensato di misurare i livelli di espressione dell'mRNA di Brm in mioblasti CC42 e di paragonarli a quelli misurati in mioblasti CC42 nei quali fosse stato re-introdotta un gene RB funzionale.

A questo scopo, mioblasti CC42 sono stati infettati con un vettore adenovirale codificante *RB* (Adeno-RB) oppure con un vettore adenovirale codificante l'enzima β galattosidasi (Adeno- β gal). Dopo 1 ora di incubazione col lisato virale, tempo necessario per l'adsorbimento, le cellule sono state trasferite in terreno di differenziamento e raccolte 72 ore più tardi, quando le cellule infettate con Adeno-Rb mostravano presenza di miotubi, effetto di un avvenuto differenziamento. Le cellule infettate con Adeno- β gal servono come controllo, in quanto pur essendo state sottoposte ad un processo di infezione, mancando della proteina retinoblastoma, non presentano né arresto della proliferazione né formazione di miotubi. L'RNA estratto da queste cellule è stato retrotrascritto e il cDNA ottenuto utilizzato come template per l'amplificazione delle regioni codificanti i geni *BRM*, *BRG1* e *MCK* (**Figura 14**). Quest'ultimo gene è utilizzato come marcatore muscolo specifico, infatti la sua espressione aumenta in maniera molto rilevante nelle cellule in cui viene reintrodotta *RB*, ma è appena rilevabile in assenza di *RB*. Per la quantificazione del materiale utilizzato è stato amplificato il gene codificante la ciclofillina. Per entrambi i geni *BRM* e *BRG1* sono state utilizzate due coppie di oligonucleotidi primers nella reazione di amplificazione che producono frammenti di DNA lunghi 200 o 500 nucleotidi, come descritto nei materiali e metodi. I risultati ottenuti mostrano che il gene *BRG1* presenta gli stessi livelli di espressione sia nelle CC42 infettate con Adeno- β gal sia in quelle infettate con Adeno-Rb. Per quanto riguarda il gene *BRM*, invece, i suoi livelli di espressione sono indotti notevolmente nelle cellule in cui è stato reintrodotta il gene *RB*. Questi risultati confermano la nostra ipotesi, cioè che pRb regola positivamente l'induzione trascrizionale di Brm nei mioblasti differenziati.

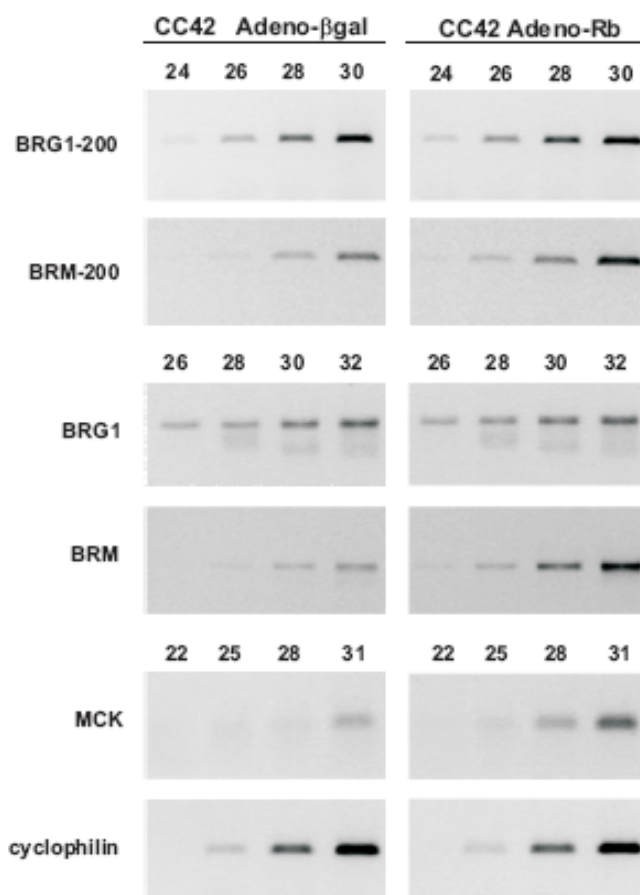


Figura 14. Analisi d' espressione di BRM e BRG1 nella linea miogenica $RB^{-/-}$ CC42 dopo infezione con Adeno-Rb.

Mioblasti CC42 sub-confluenti sono stati infettati con Adeno-βgal (MOI 500) e Adeno-Rb (MOI 500) e subito dopo l'infezione trasferite in terreno di differenziamento (DM) per 72h. L'RNA totale, estratto dalle cellule così infettate, è stato retrotrascritto in cDNA e questo utilizzato come template per l'analisi mediante RT-PCR-Semi Quantitativa. Per l'amplificazione delle regioni codificanti i geni BRM e BRG1, miogenina e ciclofillina sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici. In particolare per i geni BRM e BRG1 sono state utilizzate due coppie di oligonucleotidi primers che producono frammenti di DNA lunghi 200 bp (parte alta della figura) e 500 bp (parte centrale della figura) nucleotidi. Sono stati fatti quattro prelievi di 23μl della miscela di reazione iniziale (100 μl) ogni due cicli (il numero di cicli fatti per ogni coppia di oligonucleotidi è indicato). I prodotti di RT-PCR sono stati analizzati mediante corsa su gel di agarosio al 2%.

Metodo sperimentale in corso per lo studio di BRG1

Poichè l'inattivazione omozigote del gene BRG1 risulta in una precoce letalità embrionale, un approccio per poter studiare il ruolo di un gene tanto essenziale è quello dell'RNA interference inducibile. Questo metodo consente, infatti, di sopprimere l'attività del gene bersaglio attraverso la sintesi inducibile di piccoli RNA a doppio filamento, (siRNAs), contenenti una sequenza di 21-23 nt, compresa nella sequenza del gene in esame, che dirigono la degradazione specifica dell'mRNA corrispondente.

A tale scopo abbiamo intrapreso una collaborazione con il laboratorio della Dr. Annick Harel-Bellan (CNRS, Villejuif) che mi ha permesso di preparare il costrutto inducibile necessario per il mio lavoro.

Il vettore pTER è essenzialmente la forma inducibile del noto vettore pSUPER (Brummelkamp et al., 2002) che utilizza il promotore del gene dell'istone H1, attivato dalla RNA polimerasi III, per guidare la sintesi di piccoli RNA.

Gli RNA trascritti dalla polimerasi III mancano della coda di poliadenilazione ed hanno un definito punto di inizio e un segnale di terminazione formato da un tratto di 5 timidine.

In particolare, nel vettore da noi utilizzato, il taglio del trascritto, che avviene dopo la seconda uridina, porta alla formazione di piccoli trascritti di RNA che assumono una struttura a doppio filamento con estremità a cappio (stem-loop); questa struttura viene riconosciuta e tagliata dalla RNAsi Dicer con la produzione di RNA a doppio filamento lunghi 22 nt, che dirigono la degradazione dell'RNA bersaglio. Questi piccoli RNA somigliano a quelli formati dal taglio operato dalla RNAsi Dicer sull'RNA a doppio filamento (corrispondente all'intero mRNA bersaglio) negli organismi inferiori, col vantaggio di ovviare negli organismi superiori alla risposta citotossica provocata dall'introduzione di una grossa molecola di RNA.

Il vettore pTER contiene un operatore tetraciclina (TO) entro la regione del promotore H1, non inficiando in questo modo l'inizio della trascrizione a partire dal primo nucleotide della sequenza target da parte della RNA polimerasi III (van de Wetering M. et al., 2003).

Il sistema descritto da van de Wetering et al., prevede la presenza di un repressore Tet, integrato stabilmente nelle cellule prima del costrutto inducibile, che andrebbe a bloccare l'inizio della trascrizione delle sequenze specifiche legandosi all'operatore Tet

(TO). L'aggiunta di doxiciolina nel mezzo di coltura inibirebbe tale legame provocando la sintesi degli siRNAs.

Come schematizzato in **figura 15**, il vettore pTER⁺ contiene una regione di 750 bp inserita tra i siti Bgl II e Hind III che permette il subclonaggio di determinati oligonucleotidi aumentando la probabilità di successo del clonaggio. Gli oligonucleotidi devono essere opportunamente fosforilati prima di essere legati al vettore e la loro sequenza deve poi essere progettata per essere compatibile con le estremità del vettore tagliate con Bgl II e Hind III.

Il costrutto codifica per il gene che conferisce la resistenza sia all'ampicillina, per la selezione in cellule batteriche, sia alla zeocina per la selezione in cellule eucariotiche.

Essendo il mio scopo quello di interferire con l'attività di BRG1, ho dapprima trovato dalla letteratura le sequenze specifiche che interferiscono con la funzione di BRG1 e le ho poi clonate nel costrutto inducibile pTER⁺ schematizzato in figura 15.

In parallelo ho clonato anche sequenze specifiche contro Brm, per accertarsi in seguito di non interferire con la funzione di Brm utilizzando i piccoli RNA diretti contro BRG1, e viceversa.

I costrutti inducibili contenenti oligonucleotidi specifici per Brm o BRG1 da me costruiti, sono stati trasfettati in cellule C2 TetOFF, non disponendo del repressore Tet. In questo sistema l'induzione del costrutto è stata ottenuta attraverso rimozione della doxiciolina (100 ng/ml) dal mezzo di coltura. Per selezionare diversi cloni esprimenti i costrutti in questione ho utilizzato la zeocina (100 µg/ml). Dopo circa due settimane la selezione è finita e i cloni isolati sono stati fatti crescere e poi congelati. Lo screening dei cloni è in corso.

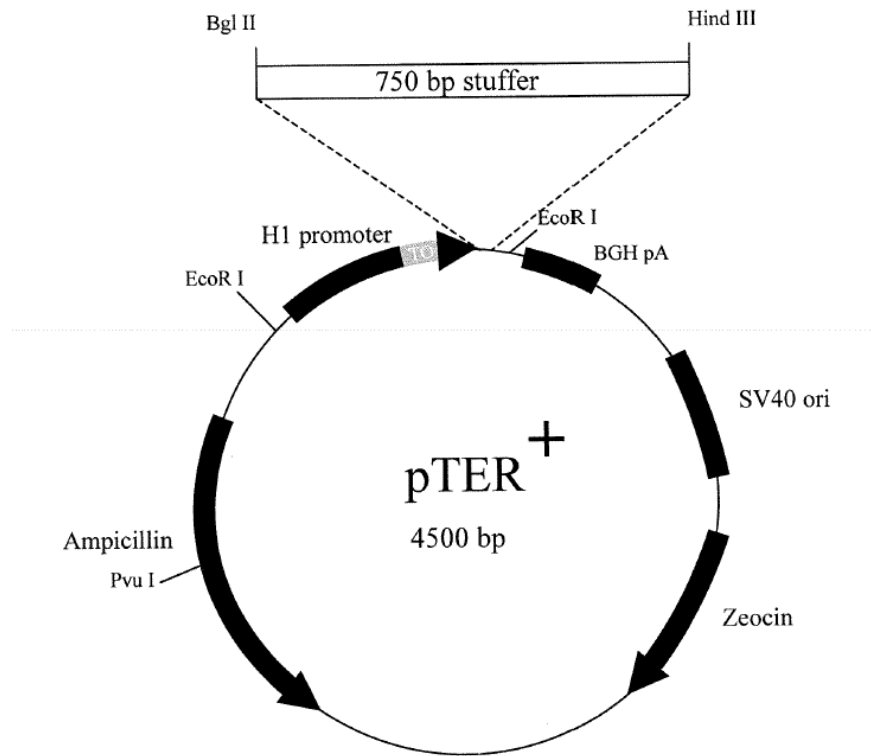


Figura 15. Rappresentazione schematica del vettore inducibile $pTER^+$ usato per il clonaggio delle sequenze specifiche dirette contro l'mRNA di *BRG1*.

DISCUSSIONE

Il fattore trascrizionale MyoD ha un ruolo critico nella specificazione del destino cellulare miogenico sia durante l'embriogenesi, che durante la rigenerazione del muscolo scheletrico adulto (Rudnicki et al., 1993; Holterman and Rudnicki, 2005). L'espressione ectopica di MyoD in cellule non-miogeniche è sufficiente ad attivare il programma di differenziamento muscolare scheletrico e risulta tipicamente nell'induzione trascrizionale di geni precedentemente mantenuti in uno stato silente. È stato dimostrato che l'attivazione genica mediata da MyoD è associata al rimodellamento della cromatina nelle regioni regolative dei geni muscolo-specifici. MyoD induce in maniera diretta ed immediata un parziale rilassamento della cromatina a livello delle regioni promotore/enhancer di un certo numero di geni muscolo-specifici, tra cui miogenina. Ciò risulta nella neosintesi di fattori che contribuiscono a promuovere ulteriori modificazioni della struttura cromatinica e collaborano con MyoD nell'attivazione della trascrizione di geni specifici di stadi successivi del differenziamento (Gerber et al., 1997).

Recentemente è stato dimostrato che l'induzione del differenziamento muscolare mediata da MyoD richiede l'attività dei complessi di rimodellamento della cromatina SWI/SNF, e che questi complessi sono reclutati a livello dei loci miogenici nei mioblasti in fase differenziativa (de la Serna et al., 2001a; Simone et al., 2004; de la Serna et al., 2005). Queste osservazioni suggeriscono che MyoD e altri fattori di trascrizione miogenici, bHLH e MEF2, possano selettivamente reclutare i complessi SWI/SNF sulle regioni regolative dei geni muscolari, promuovendo così alterazioni della configurazione cromatinica che permettano l'inizio e il mantenimento di alti livelli di trascrizione.

Il complesso multiproteico SWI/SNF, composto da circa 12 subunità, funziona destabilizzando le interazioni tra il DNA e gli istoni nucleosomali, in maniera ATP-dipendente grazie all'attività catalitica delle ATP-asi Brm o BRG1, che costituiscono subunità mutualmente esclusive dei complessi SWI/SNF nelle cellule di mammifero. Varie evidenze indicano che BRG1 e Brm, pur presentando un elevato grado di omologia strutturale e funzionale, regolano processi cellulari diversi. Studi di inattivazione genica in topi hanno dimostrato che mutazioni omozigoti del gene *BRG1* risultano letali a stadi molto precoci dell'embriogenesi, mentre i topi in cui è stato inattivato il gene *BRM* sono vitali e fertili. I topi *BRM*^{-/-} mostrano, tuttavia, un incremento del peso corporeo e alterazioni del controllo della crescita cellulare (Bultman et al., 2000b; Reyes et al., 1998).

BRG1 e Brm presentano differenti profili di espressione: durante lo sviluppo, BRG1 è espressa dalle prime fasi dell'embriogenesi mentre Brm si accumula più tardivamente; in cellule in coltura, BRG1 è espressa costitutivamente mentre la concentrazione della proteina Brm aumenta in cellule arrestate in fase G0 e in cellule F9 indotte a differenziare (Reyes et al., 1998). Inoltre l'espressione di Brm, ma non quella di BRG1, è regolata negativamente dai fattori di crescita, così come pure in cellule trasformate da un oncogene *ras* costitutivamente attivo (Muchardt et al., 1998).

Queste osservazioni ci hanno fatto ipotizzare che l'espressione di Brm potesse essere indotta nel corso del differenziamento muscolare che, come noto, è un processo strettamente associato all'arresto irreversibile del ciclo cellulare. I nostri risultati indicano che i livelli di espressione sia dell'mRNA che della proteina Brm sono considerevolmente indotti durante il differenziamento di mioblasti della linea C2, mentre quelli di BRG1 rimangono relativamente costanti. Questi risultati preliminari ci hanno suggerito che il complesso SWI/SNF contenente Brm potesse avere un ruolo critico nel processo di differenziamento terminale.

Abbiamo quindi esaminato l'induzione di geni muscolo specifici mediata da MyoD in fibroblasti esprimenti forme difettive di Brm in cui sono state introdotte mutazioni in vari domini funzionali della proteina. I mutanti esaminati presentano: una mutazione nel sito di legame dell'ATP, che abolisce l'attività ATPasica di Brm; una delezione della regione necessaria per l'associazione di Brm alla proteina retinoblastoma; una delezione della regione carbossiterminale di Brm, che rimuove il bromodominio. Una volta sovraesprese nelle cellule, queste forme mutate di Brm vanno a sostituirsi alla proteina Brm endogena nei complessi SWI/SNF funzionando così da dominanti-negativi. Abbiamo osservato che l'espressione ectopica di ciascun mutante di Brm inibisce drasticamente in maniera dose-dipendente la capacità di MyoD di attivare la trascrizione di geni endogeni muscolo-specifici.

Questi dati indicano che l'attività di Brm è necessaria perchè MyoD possa indurre la trascrizione muscolo-specifica, ma non ci permettono di distinguere tra la funzione di Brm e quella di BRG1. Infatti, poichè entrambi i tipi di complessi SWI/SNF, basati su BRG1 o Brm, condividono molte delle stesse subunità, la sovraespressione di forme mutanti di Brm potrebbe risultare anche in una inibizione della formazione dei complessi SWI/SNF fisiologici contenenti BRG1. Inoltre, è importante sottolineare che gli approcci sperimentali basati sulla sovraespressione di geni esogeni vanno sempre considerati con

cautela. Ad esempio nel corso di questi nostri esperimenti abbiamo osservato che l'espressione di Brm wild-type esogena non promuove un aumento dell'attività miogenica di MyoD, anzi, un incremento della dose di Brm trasfettata risulta in una inibizione del differenziamento, seppure in misura molto inferiore a quella provocata dalle proteine Brm mutanti. Questa osservazione era inattesa perchè ci saremmo aspettati piuttosto che Brm funzionasse da coattivatore di MyoD; una spiegazione di questo apparente paradosso è che livelli elevati di Brm alterano l'equilibrio fisiologico tra i complessi SWI/SNF contenenti Brm o BRG1, portando alla formazione di una quantità eccessiva di complessi basati su Brm a scapito della formazione di quelli basati su BRG1.

Per verificare se Brm svolge un ruolo specifico nel processo differenziativo miogenico, non vicariabile da BRG1, abbiamo esaminato le proprietà differenziative di fibroblasti embrionali derivati da topi *BRM*^{-/-} convertiti in mioblasti tramite espressione esogena di MyoD. Colture primarie di fibroblasti, isolati da topi *BRM*^{-/-} o da topi di controllo *BRM*^{+/+}, sono state infettate con un retrovirus codificante per MyoD, e l'espressione di vari marcatori muscolo-specifici è stata analizzata a vari tempi dopo induzione del differenziamento terminale. Abbiamo osservato che nei fibroblasti mancanti della funzione della proteina Brm, MyoD induce livelli ridotti dei marcatori del differenziamento, ed in particolare dei marcatori del differenziamento tardivo, come l'actina sarcomerica e la catena pesante della miosina, i quali risentono fortemente dell'assenza di Brm. È noto che MyoD, oltre ad indurre i geni muscolo-specifici, promuove l'arresto irreversibile del ciclo cellulare nelle fasi precoci del differenziamento. Nei nostri esperimenti, questa seconda attività di MyoD non sembra essere compromessa nelle cellule *BRM*^{-/-}, come documentato dalla normale repressione della ciclina A e dalla induzione della proteina pRb che si accumula in maniera normale nella sua forma ipofosforilata nel corso del differenziamento delle cellule *BRM*^{-/-}.

Per assicurarci che i ridotti livelli d'espressione delle proteine muscolari fossero attribuibili veramente a Brm e non a mutazioni accumulate nelle cellule *BRM*^{-/-}, abbiamo reintrodotto *BRM* in cellule *BRM*^{-/-} contenente il transattivatore TetON (clone KO¹³) utilizzando un costrutto retrovirale codificante per la proteina Brm-FLAG sotto il controllo di un promotore responsivo alla tetraciclina. Per aumentare l'espressione di Brm abbiamo trattato le cellule sia con doxiciiclina che con Tricostatina A in quanto è stato recentemente dimostrato che l'inibizione delle iston-deacetilasi porta ad una parziale inattivazione di Brm e ad un conseguente aumento del grado di tolleranza di questa proteina nella cellula (Muchardt et al., 2003).

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i livelli basali d'espressione di Brm in assenza dei trattamenti indicati, sono già abbastanza elevate e sufficienti a ripristinare l'espressione delle proteine miogeniche. Questo risultato ha confermato che i difetti nell'espressione dei geni muscolo-specifici osservati nelle cellule *BRM*^{-/-}, sono realmente attribuibili all'assenza di Brm.

Dalle cellule KO¹³ infettate con il retrovirus Brm-FLAG abbiamo poi derivato cloni individuali esprimenti Brm in maniera stabile e abbiamo analizzato le loro caratteristiche differenziative in seguito ad espressione di MyoD esogeno. I cloni scelti esprimenti Brm (A2 e A3) sono stati paragonati al clone parentale in tutti gli esperimenti effettuati.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza ancora una volta che l'assenza di Brm compromette notevolmente l'espressione soprattutto dei marcatori miogenici tardivi. In questa analisi abbiamo esaminato anche i livelli d'espressione di BRG1 e del fattore di trascrizione MEF2C i quali risultavano espressi indipendentemente dalla presenza di Brm.

MEF2C è, tra i fattori MEF2, l'isoforma più importante richiesta nel corso del differenziamento muscolare scheletrico e la sua espressione è amplificata e mantenuta nel corso del programma differenziativo. In particolare l'inizio della trascrizione di MEF2C richiede i fattori bHLH, mentre il mantenimento e l'aumento dei suoi livelli d'espressione nel tempo richiedono la cooperazione tra i fattori bHLH e MEF2 (Wang et al., 2001). Ci è sembrato quindi importante focalizzare la nostra attenzione sul fattore MEF2C in quanto la sua trascrizione è specificamente indotta nel corso del differenziamento muscolare scheletrico.

I risultati finora discussi ci hanno permesso di identificare Brm come un fattore necessario all'attivazione dei geni muscolari e ci hanno indotto ad ipotizzare che Brm potesse essere presente nelle regioni regolative dei promotori muscolari e contribuire alla loro attivazione trascrizionale.

Abbiamo pertanto condotto esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina nei cloni KO¹³, A2 e A3 indotti a differenziare, tramite espressione ectopica di MyoD, allo scopo di esaminare il reclutamento di Brm e di altri fattori quali BRG1, MyoD, MEF2C, p300 e P/CAF sui promotori di geni muscolari sia precoci che tardivi. I dati ottenuti hanno messo in evidenza che nelle cellule che esprimono Brm, tutti questi fattori sono localizzati su regioni trascrizionalmente attive della cromatina, mentre nelle cellule senza Brm questi fattori, seppur espressi, non sono rivelabili sulle regioni considerate. Questo suggerisce che

Brm possa essere richiesto per l'assemblaggio o il reclutamento stabile di un complesso trascrizionale, di cui i fattori esaminati fanno parte, a livello dei promotori specifici.

In assenza di Brm, MyoD avrebbe difficoltà ad accedere al DNA a causa di una struttura compattata della cromatina. Le acetil trasferasi reclutate non sarebbero sufficienti a decondensare localmente il DNA, come testimoniato dal basso livello d'acetilazione dell'istone H4 osservato sui promotori muscolo-specifici delle cellule *BRM*^{-/-}. Questo dato suggerisce un reclutamento consistente delle HATs successivo a SWI/SNF sulle regioni interessate e mette in evidenza la presenza di uno stato piuttosto condensato e inaccessibile della cromatina in assenza di Brm.

Inoltre BRG1 è presente sui promotori muscolo-specifici insieme a Brm; questo porterebbe a pensare ad una cooperazione tra i due fattori nell'attivazione dei geni muscolari esaminati. In realtà l'assenza di BRG1 sui loci miogenici osservata nelle cellule *BRM*^{-/-}, testimonia che il complesso SWI/SNF contenente Brm svolge un ruolo specifico nel rimodellamento della cromatina sui promotori esaminati. Ciò avvalorerebbe l'ipotesi che Brm e BRG1 esercitino funzioni diverse e siano selettivamente reclutati sui promotori, senza escludere la cooperazione tra i due tipi di complessi SWI/SNF nel mantenimento di una struttura rilassata che permette alti livelli di trascrizione nel corso del processo differenziativo.

La cooperazione tra Brm e BRG1 nel processo di attivazione genica è stata proposta anche in altri sistemi, come nell'adipogenesi. E' stato visto, infatti, che i due complessi (analizzati attraverso dominanti negativi) vengono reclutati sul promotore del recettore nucleare PPAR γ attraverso l'attivatore C/EBP β , facilitando o stabilizzando il legame dei fattori generali di trascrizione associati alla RNA polimerasi II (Salma et al., 2004).

Per comprendere il meccanismo attraverso il quale Brm viene indirizzato sui promotori muscolo-specifici, abbiamo analizzato la capacità di Brm e BRG1 di associarsi ai fattori bHLH e MEF2. Abbiamo osservato che, nelle condizioni da noi utilizzate, il solo fattore che interagisce con le proteine ATPasiche dei complessi SWI/SNF è MEF2C. In particolare MEF2C interagisce preferenzialmente con Brm e in maniera consistente durante la fase tardiva del differenziamento.

Questi dati, considerati insieme, ci permettono di ipotizzare un modello secondo il quale il reclutamento di Brm sui promotori muscolo-specifici sarebbe mediato dalla sua interazione con MEF2C. Una volta indirizzato sui loci muscolari target, Brm causerebbe un rilassamento della cromatina tale da permettere il legame stabile sulle regioni regolative

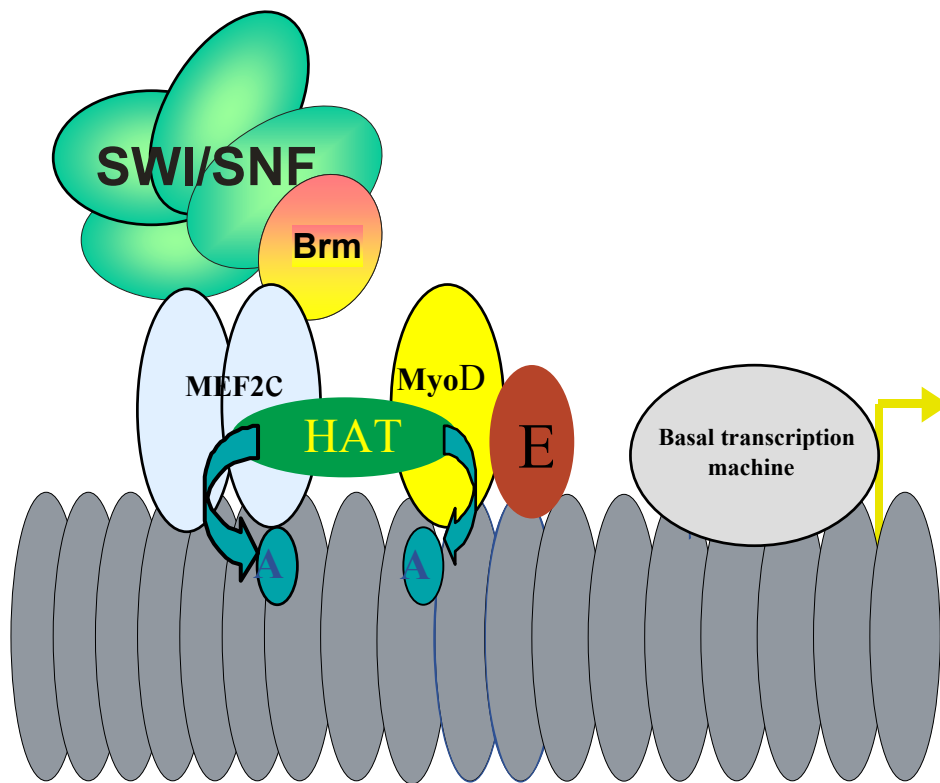


Figura 16. Modello proposto per il reclutamento del complesso *Swi/Snf* contenente *Brm* sui promotori muscolo-specifici. Attraverso l'interazione con MEF2C, *Brm* sarebbe reclutato sui promotori target e causerebbe un rilassamento della cromatina tale da permettere l'accesso dei fattori indicati sulle regioni regolatorie dei geni muscolari e la conseguente attivazione dei componenti del macchinario basale di trascrizione.

dei fattori necessari alla costituzione di un complesso trascrizionalmente attivo formata da MyoD, le actiltrasferasi e BRG1 (Figura 16).

Questo modello affianca un modello recentemente proposto secondo il quale i complessi SWI/SNF sono reclutati sul promotore di miogenina dal fattore di trascrizione MyoD legato al complesso costitutivo Pbx/Meis prima ancora che MyoD formi un complesso stabile sulla E-box specifica. Nel nostro caso, il complesso SWI/SNF contenente Brm potrebbe essere reclutato sui promotori muscolari dal fattore di trascrizione MEF2C sulla base della forte interazione tra MEF2C e Brm, da noi osservata durante il differenziamento muscolare. Poichè MEF2C non è rivelabile sui promotori in cellule *BRM*^{-/-}, è plausibile che, come nel caso descritto per MyoD, anche il legame di MEF2C con il DNA non sia stabile. Un'altra spiegazione potrebbe essere che MEF2C, così come anche MyoD che è rilevato in misura molto bassa sui promotori muscolari delle nostre cellule *BRM*^{-/-}, sia presente sul sito specifico, ma non rilevabile come proteina in quanto nascosto dalle strutture istoniche ancora compatte.

Studi effettuati in topi mutanti e in linee miogeniche *RB*^{-/-} hanno dimostrato che pRb è essenziale sia per l'arresto proliferativo dei mioblasti in corso di differenziamento che per l'espressione dei marcatori tardivi del differenziamento terminale (Zacksenhaus et al., 1996; Novitch et al., 1996). È stato ben documentato che pRb inibisce la proliferazione cellulare reprimendo l'attività trascrizionale dei fattori della famiglia E2F, che controllano l'espressione di geni essenziali per la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. pRb inibisce l'attività di E2F sia reprimendone direttamente l'attività transattivante che reclutando sui siti E2F, legato ai promotori bersaglio, enzimi di rimodellamento della cromatina, quali i complessi SWI/SNF e le iston-deacetilasi. È stato dimostrato che pRb interagisce direttamente sia con Brm che con BRG1 e che l'attività dei complessi SWI/SNF è necessaria perchè pRb possa reprimere la trascrizione di alcuni specifici geni bersaglio di E2F (Ferreira et al., 2001; Harbour and Dean, 2000a; Harbour and Dean, 2000b). I nostri dati indicano che l'assenza di Brm non influenza la capacità di pRb di arrestare il ciclo cellulare durante il differenziamento miogenico.

È tuttavia interessante evidenziare che i difetti del differenziamento muscolare da noi osservati in cellule *BRM*^{-/-}, si sovrappongono in parte a quelli osservati, da noi e da altri, in linee miogeniche *RB*^{-/-}. Infatti, sia l'assenza di pRb che quella di Brm risulta in una marcata incapacità di fusione dei mioblasti e nella inibizione dell'espressione dei geni

muscolari specifici degli stadi tardivi del processo differenziativo. Queste osservazioni suggeriscono che pRb e Brm possano essere componenti di una stessa via regolativa.

L'attività di pRb coinvolta nel controllo del differenziamento terminale miogenico è distinta dalla sua attività di repressore di E2F (Sellers et al., 1998) ed è ancora poco conosciuta. È stato dimostrato che una proteina pRb funzionale è necessaria, insieme a MyoD, per attivare la funzione trascrizionale dei fattori MEF2 (Novitch et al., 1999), che sono coinvolti nell'induzione dell'espressione dei geni muscolari tardivi. Un altro meccanismo tramite cui pRb regola positivamente il differenziamento muscolare sembra essere collegato alla sua capacità di regolare negativamente l'attività di Ras. Infatti, fibroblasti *RB*^{-/-} indotti a transdifferenziare in mioblasti tramite espressione di MyoD, presentano livelli molto elevati dell'attività di Ras, e una inibizione dell'attività di Ras in queste cellule reverte molti dei difetti differenziativi provocati dall'assenza di pRb (Lee et al., 1999). L'importanza fisiologica di questi risultati è stata confermata *in vivo* dall'esame di embrioni *RB*^{-/-}; *N-ras*^{-/-}; è stato infatti dimostrato che la delezione di *N-ras* porta ad un recupero della normale capacità differenziativa del muscolo *RB*^{-/-}. (Takahashi et al., 2003). È noto da tempo che la proteina Ras costitutivamente attiva inibisce il differenziamento miogenico (Olson et al., 1987); questo effetto inibitorio è probabilmente mediato da molteplici effettori di Ras; ad esempio, è stato visto che MEK1, una kinasi attivata da Ras, lega MyoD e ne inibisce l'attività transattivante (Perry et al., 2001).

Il gene *BRM* è stato identificato come un bersaglio specifico a valle di Ras; infatti, la trasformazione di fibroblasti con un oncogene *ras* attivato inibisce quasi completamente l'accumulo dell'mRNA e della proteina Brm, senza alcun effetto sull'espressione di BRG1 (Muchardt et al., 1998). L'osservazione che cellule in cui manca *RB* mostrano elevati livelli di attività di Ras, insieme all'osservazione che l'espressione del gene *BRM* è repressa in fibroblasti trasformati con *ras*, considerate insieme, ci hanno suggerito che pRb, agendo da repressore dell'attività di Ras, potesse funzionare da regolatore positivo dell'espressione di Brm durante la miogenesi.

Abbiamo verificato questa ipotesi esaminando l'espressione dell'mRNA di *BRM* in mioblasti *RB*^{-/-} in condizioni di differenziamento, comparandola a quella rilevata nelle stesse cellule dopo reintroduzione di un gene *RB* funzionale tramite infezione adenovirale. I nostri risultati indicano che il ripristino della funzione della proteina pRb nei mioblasti *RB*^{-/-} risulta non solo nel recupero della loro completa capacità differenziativa ma anche in

un notevole aumento dell'espressione di *BRM*. Come atteso, i livelli di espressione di BRG1 non sono influenzati da pRb.

In conclusione, i nostri dati indicano che la funzione della proteina Brm ha un ruolo importante nel processo differenziativo miogenico e mettono in luce l'esistenza di una connessione regolativa tra pRb e Brm nella fase tardiva del differenziamento. Abbiamo, infatti, dimostrato che nel corso del differenziamento miogenico, pRb induce l'espressione di Brm. Dati riportati in letteratura suggeriscono che questa connessione regolativa è indiretta e dipende dalla capacità di pRb di inibire l'attività di Ras, che a sua volta funziona da inibitore dell'espressione di Brm. Il fatto che i fenotipi di mioblasti *RB*^{-/-} e *BRM*^{-/-} sono parzialmente sovrapponibili e che pRb regola positivamente l'espressione di Brm, rivela che il meccanismo con cui Rb promuove il differenziamento si esplica attraverso l'induzione di Brm (Figura 17).

I nostri dati hanno messo in luce che il complesso SWI/SNF contenente Brm esercita un ruolo specifico durante la miogenesi, non sovrapponibile a quello di BRG1. Recentemente è stato dimostrato che BRG1 e Brm possono interagire in maniera selettiva con distinti fattori trascrizionali ed essere così reclutati su promotori diversi per regolare geni specifici (Kadam and Emerson, 2003). Le analisi di interazione proteina-proteina hanno messo in evidenza una preferenzialità del fattore MEF2C con Brm rispetto a BRG1. Da un altro lato, è stato dimostrato che BRG1 interagisce con MyoD in mioblasti in cui è stata forzata l'attivazione della chinasi p38, nota nel promuovere il differenziamento miogenico (Simone et al., 2004).

La nostra ipotesi di lavoro è che Brm e BRG1 regolino la trascrizione di geni implicati in fasi diverse del differenziamento muscolare interagendo in maniera preferenziale con specifici membri delle famiglie di fattori miogenici bHLH e MEF2.

L'obiettivo che vogliamo perseguire verte sulla comprensione delle diversità funzionali tra Brm e BRG1. A tale scopo, per superare le difficoltà relative allo studio di un gene essenziale quale BRG1, la cui inattivazione causa precoce mortalità nei topi, utilizzeremo piccoli RNA interferenti inducibili diretti contro specifiche sequenze di BRG1.

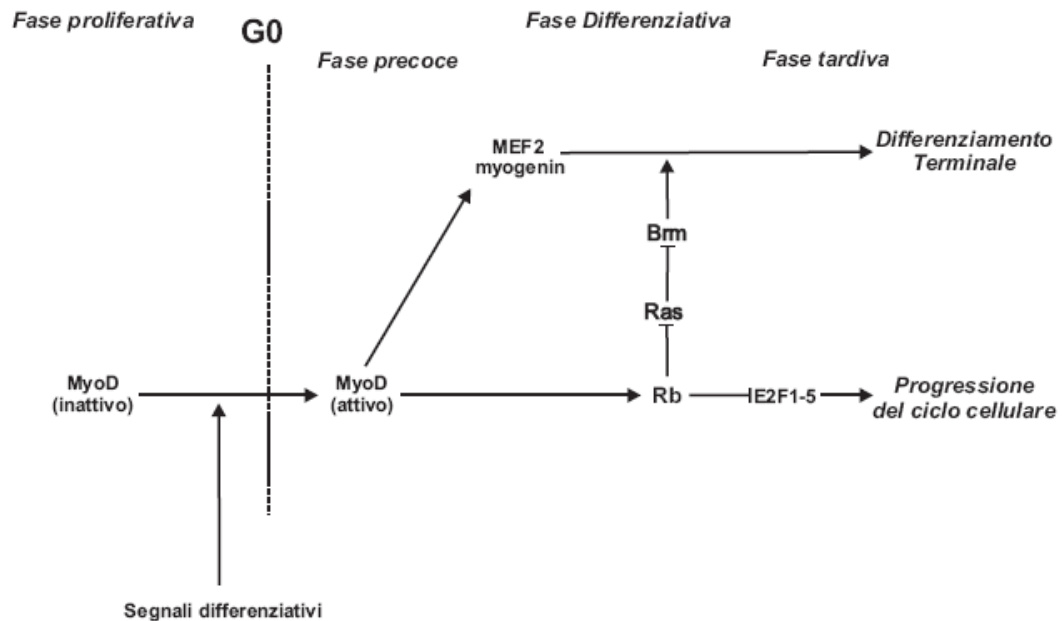


Figura 17. Rappresentazione schematica del processo di differenziamento muscolare

MyoD, sottoposto a stimoli differenziativi, viene attivato, promuovendo così la trascrizione dei fattori miogenici precoci (quali MEF2 e miogenina) e di RB. I geni precoci portano a loro volta all'attivazione dei geni tardivi spingendo le cellule verso il differenziamento terminale. La proteina pRb svolge un duplice ruolo nel corso del differenziamento: promuove l'uscita irreversibile dei mioblasti dal ciclo cellulare bloccando l'azione transattivante dei fattori E2F, e coadiuva MyoD nell'attivare la funzione trascrizionale dei fattori MEF2. Un altro meccanismo con cui pRb agisce nel corso del differenziamento è attraverso la regolazione negativa dell'attività di Ras. Inibendo l'attività di Ras, pRb funziona da regolatore positivo dell'espressione di Brm. L'attività di Brm è necessaria per una efficiente trascrizione dei geni muscolo-specifici della fase tardiva.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e condizioni di coltura

Tutte le cellule utilizzate sono state mantenute in un incubatore a 37° C, avente il 90% di umidità ed il 5% di CO₂. Le varie linee cellulari sono state coltivate in monostrato e propagate mediante trattamento con una soluzione di tripsina allo 0.125%, previo lavaggio con tampone isotonic PBS (Phosphate buffered saline). Il terreno di coltura utilizzato è il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementato con L-glutamina (alla concentrazione finale di 2 mg/ml), penicillina (50 UI/ml) e streptomicina (50 µg/ml).

La cellule della linea miogenica murina C2C7, derivate dalla linea C2 di mioblasti di muscolo scheletrico (Yaffe and Saxel, 1977), sono state cresciute in DMEM supplementato con 20% di FBS (fetal bovine serum). Per indurre il differenziamento terminale, 2x10⁵ cellule, seminate in piastre da 90 mm di diametro, e lasciate crescere fino al raggiungimento dell'80%-90% di confluenza, sono state trasferite in terreno di differenziamento, costituito da DMEM contenente 2% di HS (horse serum), per i tempi desiderati.

I fibroblasti murini della linea C3H10T1/2 sono stati cresciuti in DMEM supplementato con 20% di BCS (bovine calf serum definito e supplementato).

I fibroblasti embrionali murini *BRM*^{-/-} e *BRM*^{+/+} sono stati cresciuti in DMEM supplementato con 3% di BCS e 7% di FBS. Dopo trasfezione con un costrutto esprimente MyoD (pCDNA3-MyoD) o infezione col retrovirus pBABEpuro-MyoD, sono stati cresciuti in terreno proliferativo costituito da DMEM arricchito con il 20% di FBS e, dopo 48 ore, trasferiti in terreno di differenziamento per i tempi desiderati.

La linea cellulare Brm-KO¹³ è stata creata trasfettando i fibroblasti embrionali *BRM*^{-/-} con il costrutto pUHD172-1 PURO, che esprime il transattivatore TetON e il gene che conferisce la resistenza alla puomicina. Vari cloni puomicina-resistenti sono stati isolati e caratterizzati per la loro capacità di indurre l'espressione del costrutto reporter TRE-luc, che codifica il gene luciferasi sotto il controllo di un promotore inducibile da tetraciclina o dal suo analogo doxiciclina. Il clone Brm-KO¹³ è stato scelto per i successivi esperimenti.

Le linee cellulari A2 e A3 sono state ottenute a partire dalle cellule Brm-KO¹³ infettate con il retrovirus pRevTRE-hBrm-FLAG, che codifica il gene *BRM*, fuso

all'epitopo Flag, sotto il controllo di un promotore inducibile da doxiciolina, e il gene che conferisce la resistenza alla igromicina. Dalla popolazione igromicina-resistente risultante sono stati selezionati e analizzati diversi cloni, di cui due (denominati A2 e A3) sono stati scelti per ulteriore caratterizzazione.

I mioblasti della linea CC42, derivate da cellule staminali embrionali $RB^{-/-}$ (Schneider et al., 1994), sono stati cresciuti in DMEM supplementato con 20% di FBS e messe a differenziare, quando la confluenza delle cellule arrivava all' 80%-90%, in DMEM contenente 2% di HS.

I fibroblasti della linea 3T3TetON-A1, esprimono stabilmente in transattivatore TetON e sono stati creati come descritto per la linea cellulare Brm-KO¹³; queste cellule sono state cresciute in DMEM supplementato con 3% FCS e 7% FBS.

Trasfezioni e saggi luciferasici

Le trasfezioni sono state effettuate con il metodo della Lipofectamina (Invitrogen) seguendo le istruzioni riportate.

Le cellule sono state seminate 24 ore prima della trasfezione (10^5 cellule in piastre da 35 mm o 5×10^5 in piastre da 90 mm) e, il giorno successivo, sono state trasfettate con il metodo della Lipofectamina utilizzando circa 2,5 μ l di lipofectamina per μ g di DNA. Dopo un'incubazione di 5 ore a 37°C le cellule sono state coltivate in terreno di crescita per 48 ore prima di essere raccolte.

Negli esperimenti di saggi di attività luciferasica, come controllo interno dell'efficienza di trasfezione, sono stati co-trasfettati 0.1 μ g del costrutto reporter pCMV- β gal, che esprime l'enzima β -galattosidasi sotto il controllo di un promotore costitutivo. Dopo la trasfezione, le cellule sono state coltivate per 24 ore in condizioni di proliferazione, e quindi trasferite in terreno di differenziamento per altre 48 ore. Le cellule sono state poi lisate e gli estratti sono stati sottoposti a saggi di attività luciferasica e β -galattosidasica. Gli esperimenti sono stati sempre ripetuti almeno tre volte e in duplicato.

Per ciascun campione, l'attività luciferasica è stata determinata usando quantità di estratto che contenessero da 30 a 50 μ g di proteine ognuno. Per iniziare la reazione, sono stati aggiunti 25 μ l di miscela di iniezione 5x (D-luciferina 0.5 mM, Acetyl-CoA 0.3 mM, ATP 0.6 mM, DTT 33 mM, MgSO₄ 50 mM, Buffer K-fosfato 10 mM PH 7.8). L'emissione di luce è stata misurata per 20 sec a 25° C in un luminometro.

L'attività β -galattosidasi è stata determinata incubando 10 μ l di ciascun estratto con 800 μ l di tampone β -galattosidasi e 200 μ l di ONPG 1x (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) a 37°C per 30 minuti. La reazione è stata arrestata aggiungendo 500 μ l di 1 M Na_2CO_3 . La densità ottica delle reazioni è stata misurata alla lunghezza d'onda di 420 nm (L'intervallo di linearità è compreso tra 0.2-0.8 OD).

Costrutti plasmidici

Negli esperimenti di espressione transiente sono stati utilizzati i seguenti costrutti:

I vettori di espressione per il gene *BRM* wild type e i mutanti ATP mut, ΔE7 e $\Delta\text{C-term}$ (1337), espressi sotto il controllo del promotore CMV, sono stati ottenuti da M. Yaniv e C. Muchardt (Istituto Pasteur, Parigi) e sono descritti in (Bourachot et al., 1999).

Il vettore di espressione pcDNA3-MyoD esprime il gene che codifica per la proteina MyoD, sotto il controllo del promotore CMV che presenta un'espressione ubiquitaria e costitutiva.

Il gene reporter 4RE-LUC codifica per l'enzima luciferasi controllato da un promotore sintetico contenente 4 siti di legame a MyoD.

Il gene reporter MCK-luc codifica per l'enzima luciferasi della lucciola, controllato dal promotore del gene creatina chinasi muscolare, espresso durante la fase tardiva del differenziamento muscolare.

Il gene reporter pCMV- β gal codifica per l'enzima betagalattosidasi di *E. coli*, controllato dal promotore del citomegalovirus.

Il vettore di espressione pcDNA3-MEF2C-HA esprime la proteina MEF2C fusa all'epitopo HA, sotto il controllo del promotore CMV.

Il vettore di espressione d'espressione pBS(-)Brm-FLAG è stato ottenuto clonando la proteina Brm-FLAG da pBABE-hBrm-FLAG nel sito EcoR1 di pBS(-).

Il vettore di espressione retrovirale pBABE-hBrm-FLAG codifica per la proteina Brm-FLAG e ci è stato donato dal laboratorio di Kingston (Sif et al., 2001).

Il vettore d'espressione pTRE-hBrm-FLAG è stato costruito clonando il cDNA di Brm-FLAG da pBABE-hBrm-FLAG nel sito EcoR1 del vettore pTRE (Clontech). Il costrutto risultante codifica per la proteina Brm, fusa all'epitopo FLAG, sotto il controllo di un promotore responsivo alla tetraciclina/doxyciclina.

Il vettore d'espressione pRev-TRE-hBrm-FLAG è stato costruito clonando il cDNA di Brm-FLAG da pBS(-)Brm-FLAG nel sito Hind III del vettore retrovirale pRevTRE (Clontech) che codifica anche il gene che conferisce la resistenza all'igromicina. Il costrutto retrovirale risultante codifica per la proteina umana Brm-FLAG sotto un promotore inducibile dalla tetraciclina/doxiciclina.

I vettore inducibili pTER⁺-siBrm e pTER⁺-siBRG1 sono stati costruiti clonando sequenze specifiche (vedi risultati) nel vettore inducibile pTER⁺.

Infezione delle cellule con Retrovirus

Sopranatanti retrovirali ad alto titolo (intorno a 10^7 virus/ml) sono stati prodotti mediante trasfezione transiente con il metodo del calcio-fosfato dei vettori pBABE-puro-MyoD o pRevTRE-hBrm-FLAG in cellule packaging Phoenix. I sopranatanti sono stati poi utilizzati per infettare i fibroblasti embrionali murini *BRM*^{-/-} e *BRM*^{+/+} oppure i fibroblasti BRM-KO¹³. L'infezione è stata fatta aggiungendo alle cellule il lisato virale insieme a polibrene (8 µg/ml), quest'ultimo è un polimero che rende maggiormente permeabili le membrane cellulari. Dopo 5 ore di incubazione, il lisato è stato diluito con il terreno di crescita e le cellule infettate sono state lasciate in GM per almeno 36-48 prima del trasferimento in DM, ove richiesto. È necessario che le cellule siano in attiva proliferazione al momento dell'infezione e almeno nelle 24 ore successive, per permettere l'integrazione e l'espressione del retrovirus ricombinante.

Infezione delle cellule con Adenovirus

Le cellule sono state infettate con i costrutti Adenovirali esprimenti i geni per la β-galattosidasi e per RB. I lisati virali sono stati propagati infettando cellule 293 e il titolo è risultato essere 2×10^8 pfu/ml. In seguito il lisato virale è stato utilizzato per infettare la linea cellulare CC42. La molteplicità di infezione (MOI) a cui sono stati utilizzati i virus è stata MOI 500 per Adeno-β gal e MOI 500 o 1000 per Adeno-Rb.

Per cellule piastrate su piastre da 60 mm l'infezione è stata fatta aspirando il terreno di crescita e aggiungendo 1 ml di lisato virale con aggiunta di polibrene. Dopo 1-2 ore di adsorbimento è stato aggiunto il terreno di differenziamento. Nel caso delle infezioni adenovirali non è necessario che le cellule siano in stato proliferativo per l'adsorbimento del virus.

Immunoprecipitazione e Western blot

Per il Western blot, gli estratti proteici totali sono stati preparati lisando le cellule direttamente in Laemmli Sample buffer 2x (Tris-HCl pH 6.8 62.5 mM, SDS 2%, glicerolo 10%, DTT 50 mM), preriscaldato a 90°C o in buffer contenente 20 mM Hepes pH 7.9, 350 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH 8, 0.1 mM EGTA pH 8, 20% Glicerolo, 0.5% NP40. A questo vengono poi aggiunti, al momento dell'utilizzo, gli inibitori delle proteasi: 1 mM PMSF, 5 µg/ml Aprotinina, 5 µg/ml Leupeptina, 5 µg/ml Pepstatina. Gli estratti proteici sono centrifugati a 14000 rpm per 20 min e poi quantificati mediante saggio Bradford. Per il western blot, gli estratti proteici sono stati denaturati attraverso l'ebollizione e 80 µg di ciascun campione proteico è stata corsa su gel di poliacrilammide denaturante e corso in tampone Tris/glicina/SDS pH 8.3. Le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell), mediante trasferimento elettroforetico, e la membrana è stata bloccata in tampone PBS 1X contenente 5% di NFM (non fat milk) per 1 ora. Le membrane sono state poi incubate con gli anticorpi primari e con i secondari coniugati alla perossidasi per 1 ora ciascuno. Infine, i filtri sono stati processati tramite chemiluminescenza (Super Signal, Pierce).

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione, quando indicato, sono stati fatti lisati nucleari lisando le cellule prima in un buffer ipotonico contenente 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF. Dopo 15' in ghiaccio, è stato aggiunto NP-40 0.5% ed è stato rimosso il supernatante dopo agitazione e centrifugazione dei campioni. I pellets nucleari sono poi stati estratti per 15' in un buffer contenente 20 mM Hepes pH 7.9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 5 mM ATP in Tris 100 mM, 5 mM MgCl₂, 15 mM Tris-HCl pH=8, 400 mM NaCl più gli inibitori delle proteasi. I supernatanti ottenuti dopo centrifugazione ad alta velocità sono stati sottoposti a dialisi per tutta la notte per abbassare la concentrazione di NaCl e recuperare le interazioni proteina-proteina. Prima dell'immunoprecipitazione per ogni campione sono stati conservati circa 80 µg di estratto che rappresenta il lisato totale o input. Aliquote di 700 µg di estratti nucleari sono stati incubati con la proteina G-sefariosio (Amersham) per 30' in ruota a +4°C, centrifugati a 12000 rpm e i sovranatanti incubati con 2µg degli anticorpi sotto riportati per 2 ore in ruota a +4°C. Come controllo un'aliquota di estratto proteico è stata incubata con 2 µg di IgG. Gli stessi estratti sono stati poi incubati per un'altra ora con la proteina G-sefariosio. Dopo tre lavaggi in buffer di lisi con 150 mM NaCl, le proteine sono state eluite in laemmli buffer e analizzate tramite western blot.

Gli anticorpi utilizzati per analizzare le proteine di interesse sono i seguenti:

Anticorpo policlonale di capra specifico per BRG1, clone N-15, usato 2 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology); anticorpo policlonale di capra specifico per Brm, clone N-19, usato 2 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology); anticorpo policlonale specifico per Brm donatoci dal laboratorio di Yaniv (istituto Pasteur, Parigi) (Muchardt et al., 1998); anticorpo monoclonale specifico per Rb, clone G3-245 (Pharmigen), usato 1.5 µg/ml; anticorpo monoclonale specifico per α -sarcomeric actin, clone 5C5 (Sigma), usato con una diluizione di 1:1000; anticorpo policlonale di coniglio specifico per α -tubulina (H-300), (Santa Cruz Biotechnology), usato 1 µg/ml; anticorpo policlonale di coniglio specifico per ciclina A, clone C-19 (Santa Cruz Biotechnology) usato 2 µg/ml; anticorpo policlonale di coniglio specifico per cdk4, clone C-22 (Santa Cruz Biotechnology) usato 1 µg/ml; anticorpo monoclonale specifico per MyoD, clone 5.8A (DAKO) usato 5 µg/ml; anticorpo policlonale di coniglio specifico per ciclina E, clone M-20 (Santa Cruz Biotechnology); anticorpo specifico per MEF2C usato 1:1000 (Cell Signaling), anticorpo monoclonale anti-Flag (M2, Sigma) usato 10 µg/ml, anticorpo policlonale di coniglio per INI1, clone H-300 (Santa Cruz Biotechnology) usato 1 µg/ml. L'anticorpo monoclonale specifico per miogenina, clone IF5D7/2 (Wright et al., 1991) usato diluito 1:2, l'anticorpo monoclonale specifico per MHC, clone MF20 (Bader et al., 1982) usato diluito 1:5 e l'anticorpo monoclonale per l'epitopo HA, clone 12CA5 usato 1:5, sono stati utilizzati come sovrinatanti di coltura delle cellule di ibridoma che li producono. Per le immunoprecipitazioni sono stati utilizzati gli anticorpi anti-Brm (N-19) e anti-BRG1 (N-15) e l'anticorpo policlonale di coniglio anti-MyoD (M318) tutti ottenuti dalla Santa Cruz Biotechnology.

Immunofluorescenza

I fibroblasti WT e KO sono stati piastrati su vetrini portaoggetti e indotti a differenziare secondo le modalità precedentemente descritte. A 48 ore dall'inizio del differenziamento, le cellule sono state fissate in 4% paraformaldeide per 10' a temperatura ambiente e poi permeabilizzate in Triton-X 0.25% in PBS per 10'. I vetrini sono poi incubati per 30' in 20% siero di capra in PBS e successivamente per 2 ore con l'anticorpo policlonale per Brm diluito in PBS/5% siero di capra. Dopo 3 lavaggi in PBS/NP-40 0.1%, le cellule sono incubate con un anticorpo secondario, contro le immunoglobuline di

coniglio, coniugato alla fluoresceina (Jackson IR). Le cellule sono lavate altre 3 volte e il DNA viene marcato con 0.1 ug/ml 4', 6 diamidino-2-phenilindole (DAPI).

Immunoprecipitazione della cromatina

Le cellule sono state trattate con formaldeide 1% finale a 37°C per 10' per permettere la formazione di legami cross-link tra DNA e proteine. La reazione è stata fermata aggiungendo glicina alla concentrazione finale di 0.125 M dopodiché le cellule sono state lavate per due volte in PBS freddo e raccolte in PBS supplementato con PMSF (1 mM). I pellets sono stati risospesi in buffer L1 (50mM Tris HCl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP40, 10% glicerolo più inibitori delle proteasi), tenuti 5' in ghiaccio e centrifugati. Il sovratanante è stato rimosso e i nuclei sono stati risospesi in buffer di lisi L2 (50 mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA pH 8.0, 1% SDS più inibitori delle proteasi). La cromatina è stata sonicata in modo da ottenere frammenti di DNA compresi tra 300 e 700 bp e i campioni sono poi stati centrifugati a 13000 rpm per 10' a +4°C e i supernatanti sono stati diluiti di 10 volte aggiungendo 9 parti di DB (50mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 0.5% NP40 più inibitori delle proteasi) per abbassare la concentrazione di SDS. Aliquote di circa 500 ug di cromatina sono state incubate in ruota a 4°C per 3 ore in presenza di proteina G-agarosio precedentemente bloccata con DNA di sperma di salmone sonicato (200 ug/ml) e BSA (albumina di siero bovina, 500ug/ml). I campioni sono stati centrifugati per eliminare la proteina G e le aliquote sono state incubate tutta la notte in ruota a 4°C con 5 ug degli appropriati anticorpi. Un'aliquota di cromatina è stata incubata senza anticorpo in presenza solo delle IgG (Immunoglobuline di capra) per avere un controllo negativo della ChIP. Il giorno dopo gli immunoprecipitati sono stati incubati per 1 ora ulteriore con la proteina G agarosio per raccogliere l'immunocomplesso. I campioni sono stati poi centrifugati e il sovratanante del campione senza anticorpo (300 ul sono sufficienti) è stato conservato come DNA genomico totale o input. Gli immunoprecipitati sono stati lavati 3 volte con buffer contenente alto sale (20mM Tris, pH 8.0, 0.1% SDS, 1%NP-40, 2mM EDTA, 500 mM NaCl) e 3 volte con buffer a bassa concentrazione di sale (10mM Tris pH 8.0 ed 1mM EDTA) e poi sono stati eluiti in 300 ul di buffer DB (100mM NaHCO₃, 1% SDS). I pellets sono stati trattati con RNAasi A (10 ug) per 10' a temperatura ambiente e i campioni sono stati successivamente incubati almeno 4 ore a 65°C per revertire i cross-links e per altre 2 ore con la proteinasi K (100ug/ml) a 50°C. Infine si è proceduto

all'estrazione del DNA con il metodo fenolo-cloroformio-alcool isoamilico e precipitazione con etanolo. E' stato usato tRNA (10 ug) come co-precipitante.

I pellets sono stati risospesi in 50 ul di acqua e 4 ul di ciascun campione è stato utilizzato per la reazione di PCR, utilizzando specifici primers (vedi sotto). Come standard interno abbiamo condotto simili reazioni di PCR a partire da diluizioni seriali di DNA genomico (1/10; 1/100; 1/200).

La reazione di PCR è stata preparata in un volume di 50 ul, contenenti 0.1 mM di ciascun dNTP, 10pmoli di ciascun oligonucleotide primer, 1.5 mM MgCl₂, 200mM (NH₄)₂SO₄, 750mM TrisHCl pH 9.0, 0.1% Tween 20, 2.5 u Taq Polymerase (fisher molecular biology). Le reazioni sono state corse per un certo numero di cicli che includevano una prima fase di denaturazione a 95°C per 5' e poi denaturazione a 95°C per 60'', *annealing* per 45'' (le temperature ottimali di *annealing* [Ta] per ciascun promotore sono sotto indicate) e *extension* a 72°C per 45''. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel d'agarosio 2%, e visualizzati mediante colorazione con Bromuro d'etidio.

Le sequenze dei primers utilizzati e le rispettive temperature di *annealing* sono i seguenti:
gene GAPDH GenBank (NT_039356), sense CCAATGTGTCCGTCGTGGATC, antisense TTGAAGTCG CAGGAGACAAC, Ta=56°C; promotore MCK (GenBank M21390), sense GGTCTAGGCTGCCCCATGTAAGGA, antisense GAGCGAGCTTCTCCTCCATGTGT Ta=56°C; promotore Desmina, GenBank (NT_039171) sense CTTGTCGCTGTCAGCCTT CCT, antisense TCGCCCCCTCTCTGATTC, Ta=62°C; promotore MHC (GenBank M92099), sense CACCCAAGCCGGGAGAAACAGCC, antisense GAGGAAGGACAG GACAGAGGCACC, Ta=58°C; promotore Miogenina (GenBank X71910) sense GAATCACATGTAATCCACTGGA, antisense TCACACCAACTGCTGGGTGCCA, Ta = 51°C.

Gli anticorpi utilizzati nella ChIP sono i seguenti:

Anticorpo policlonale di coniglio anti-MyoD (M318); anticorpo policlonale di capra anti-BRM (N-19); anticorpo policlonale di capra anti-BRG1 (N-15); anticorpo policlonale di coniglio anti-PCAF (H369); anticorpo policlonale di coniglio anti-p300 (N-15); questi anticorpi sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology; anticorpo policlonale di coniglio anti-MEF2C (Cell Signaling), anticorpo specifico per l'istone H4 acetilato (antisiero di coniglio, Upstate biotechnology).

Estrazione di RNA da colture cellulari e RT-PCR.

Per l'estrazione dell'RNA totale cellulare è stato usato il metodo AGPC (*Acid Guanidinium Phenol Chloroform*) come descritto da (Chomczynski and Sacchi, 1987).

10 µg dell'RNA totale di ciascun campione sono stati retrotrascritti in un volume finale di 40 µl, usando 200 unità/µl di M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) con 200 pmol di esameri random che l'enzima utilizza come primers per la reazione di sintesi. Ai 10 µg di RNA sono stati aggiunti sequenzialmente: 200 pmol di examers solution, 0.5 mM di ogni dNTPs, 8 µl di 1st Strand Buffer 5x e H₂O (DPC) fino a 30 µl. I campioni sono stati incubati per 5 minuti a 70 °C per eliminare eventuali strutture secondarie dell'RNA e poi in ghiaccio per arrestare la reazione. A questa miscela di reazione iniziale sono stati aggiunti sequenzialmente: 4 µl di DTT 100 mM, 80 unità di RNAsin e 200 unità di M-MLV Reverse Transcriptase. La reazione di retrotrascrizione fatta a 37 °C per 1 ora è stata arrestata mettendo i campioni a 70 °C per 10 minuti, i campioni così ottenuti sono stati utilizzati per la reazione di PCR. Quest'ultima è stata effettuata a partire da 2 µl di cDNA di ciascun campione fatti reagire in un volume finale di 100 µl, contenente 0.25 mM di ogni dNTP; 50 pmol/µl di ogni oligonucleotide *primer*; 5 mM MgCl₂, PCR buffer (20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 9, 0.01% *Tween-20*) e 2.5 unità di *Taq* DNA polimerasi (Biotherm).

Qui di seguito è stata riportata la lista degli oligonucleotidi *primers* e delle corrispondenti condizioni sperimentali utilizzate:

Oligo Sense per mBrm (nt.1-nt.18)
Sequenza: 5'-CCC GGA CCT CCC AGC GTC-3'

Oligo AntiSense per mBrm (nt.501-nt.484)
Sequenza: 5'-GCC AGG CAA GGT CCT TTT-3'

Condizioni PCR: TD = 94° 1', TR + TA = 60° 1'

Oligo Sense per mBRG1 (nt.33-nt.50)
Sequenza: 5'-CAC CCA GGG GCC TGG AGG-3'

Oligo AntiSense per mBRG1 (nt.549-nt.532)
Sequenza: 5'-TCC TGT GGC GGA CAC TGA-3'

Condizioni PCR: TD = 94° 1', TR + TA = 60° 1'

Questi oligonucleotidi danno un frammento di circa 500bp.

Oligo Sense per mBrm (nt.8-nt.29)

Sequenza: 5'-CTC CCA GCG TCT CAC ATC CTC T-3'

Oligo AntiSense per mBrm (nt.242-nt.219)

Sequenza: 5'-AGA GGA GAC GGA TGT GGT GAC ATA-3'

Condizioni di PCR: TD = 94° 1', TR = 54° 1' 30'', TA = 65° 1' 30''

Oligo Sense per mBRG1 (nt.8-nt.32)

Sequenza: 5'-CTC CTT CAG CAG GAC ATC CCA TGC-3'

OligoAntiSensepermBRG1(nt.266-nt.244)

Sequenza : 5'-GGG ACA GCA CTG GAG GCA TGT T-3'

Condizioni PCR: TD = 94° 1', TR = 56° 1', TA = 72° 1'

Questi oligonucleotidi sono stati progettati per mantenere una linearità nella PCR in quanto il prodotto di PCR è di circa 200bp.

Oligo Sense per mcyclophilin A (nt.24-nt.43)

Sequenza: 5'-TGG TCA ACC CCA CCG TGT T-3'

Oligo AntiSense per mcyclophilin A (nt.396-nt.377)

Sequenza: 5'-TGC CAT CCA GCC ATT CAG T-3'

Condizioni PCR: TD = 95° 1', TR = 56° 45'', TA = 72° 45''

Oligo Sense per MCK (nt.189-nt.211))

Sequenza: 5'-CAA TAA GCT TCG CGA TAA GGA G-3'

Oligo Antisense per MCK (nt.348-nt.326)

Sequenza: 5'-GAT GGG ATC AAA CAG GTC CTT G-3'

Condizioni PCR: TD = 94° 1', TR = 55° 30'', TA = 70° 30''

Oligo Sense per myogenin (nt.283-nt.303)

Sequenza: 5'-CTG GGG ACC CCT GAG CAT TG-3'

Oligo AntiSense per myogenin (nt.555-nt.535)

Sequenza: 5'-ATG GCG CTC CTC CTG GTT GA-3'

Condizioni PCR: TD = 94° 1', TR = 55° 1', TA= 72° 1'

TD = Temperatura di Denaturazione, TR = Temperatura di Rinaturazione, TA = Temperatura di Allungamento

Infine, i prodotti di amplificazione così ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% in condizioni non denaturanti.

BIBLIOGRAFIA

- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Berkes,C.A., Bergstrom,D.A., Penn,B.H., Seaver,K.J., Knoepfler,P.S., and Tapscott,S.J. (2004). Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol. Cell* 14, 465-477.
- Biesiada,E., Hamamori,Y., Kedes,L., and Sartorelli,V. (1999). Myogenic basic helix-loop-helix proteins and Sp1 interact as components of a multiprotein transcriptional complex required for activity of the human cardiac alpha-actin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2577-2584.
- Black,B.L. and Olson,E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 167-196.
- Bour,B.A., O'Brien,M.A., Lockwood,W.L., Goldstein,E.S., Bodmer,R., Taghert,P.H., Abmayr,S.M., and Nguyen,H.T. (1995). Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* 9, 730-741.
- Bourachot,B., Yaniv,M., and Muchardt,C. (1999). The activity of mammalian brm/SNF2alpha is dependent on a high-mobility- group protein I/Y-like DNA binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3931-3939.
- Bourachot,B., Yaniv,M., and Muchardt,C. (2003). Growth inhibition by the mammalian SWI-SNF subunit Brm is regulated by acetylation. *EMBO J.* 22, 6505-6515.
- Braun,T., Bober,E., Winter,B., Rosenthal,N., and Arnold,H.H. (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9, 821-831.
- Braun,T., Buschhausen Denker,G., Bober,E., Tannich,E., and Arnold,H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701-709.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., and Agami,R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296, 550-553.
- Buchkovich,K., Duffy,L.A., and Harlow,E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.
- Bultman,S., Gebuhr,T., Yee,D., La Mantia,C., Nicholson,J., Gilliam,A., Randazzo,F., Metzger,D., Chambon,P., Crabtree,G., and Magnuson,T. (2000b). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* 6, 1287-1295.
- Bultman,S., Gebuhr,T., Yee,D., La Mantia,C., Nicholson,J., Gilliam,A., Randazzo,F., Metzger,D., Chambon,P., Crabtree,G., and Magnuson,T. (2000a). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* 6, 1287-1295.

- Camarda,G., Siepi,F., Pajalunga,D., Bernardini,C., Rossi,R., Montecucco,A., Meccia,E., and Crescenzi,M. (2004). A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* 167, 417-423.
- Caruso,M., Martelli,F., Giordano,A., and Felsani,A. (1993). Regulation of MyoD gene transcription and protein function by the transforming domains of the adenovirus E1A oncoprotein. *Oncogene* 8, 267-278.
- Cenciarelli,C., De Santa,F., Puri,P.L., Mattei,E., Ricci,L., Bucci,F., Felsani,A., and Caruso,M. (1999). Critical Role Played by Cyclin D3 in the MyoD-Mediated Arrest of Cell Cycle during Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5203-5217.
- Chen,S.L., Loffler,K.A., Chen,D., Stallcup,M.R., and Muscat,G.E. (2002). The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J. Biol. Chem.* 277, 4324-4333.
- Cheng,S.W., Davies,K.P., Yung,E., Beltran,R.J., Yu,J., and Kalpana,G.V. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat. Genet.* 22, 102-105.
- Cheng,T.C., Wallace,M.C., Merlie,J.P., and Olson,E.N. (1993). Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* 261, 215-218.
- Chiba,H., Muramatsu,M., Nomoto,A., and Kato,H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 22, 1815-1820.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clarke,A.R., Maandag,E.R., van Roon,M., van der Lugt,N.M., van,d., V, Hooper,M.L., Berns,A., and te,R.H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.
- Coppola,J.A., Lewis,B.A., and Cole,M.D. (1990). Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene* 5, 1731-1733.
- Corey,L.L., Weirich,C.S., Benjamin,I.J., and Kingston,R.E. (2003). Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev.* 17, 1392-1401.
- Cornelison,D.D. and Wold,B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 191, 270-283.
- Cosma,M.P. (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol. Cell* 10, 227-236.
- Crescenzi,M., Fleming,T.P., Lassar,A.B., Weintraub,H., and Aaronson,S.A. (1990). MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8442-8446.

- Crescenzi,M., Soddu,S., Sacchi,A., and Tatò,F. (1995). Adenovirus infection induces reentry into the cell cycle of terminally differentiated skeletal muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752, 9-18.
- Cserjesi,P. and Olson,E.N. (1991). Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4854-4862.
- Davis,R.L., Cheng,P.F., Lassar,A.B., and Weintraub,H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60, 733-746.
- Davis,R.L. and Weintraub,H. (1992). Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12. *Science* 256, 1027-1030.
- Davis,R.L., Weintraub,H., and Lassar,A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- de la Serna,I., Carlson,K.A., and Imbalzano,A.N. (2001a). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.* 27, 187-190.
- de la Serna,I., Roy,K., Carlson,K.A., and Imbalzano,A.N. (2001b). MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative SWI/SNF chromatin remodeling enzymes. *J. Biol Chem.* 276, 41486-41491.
- de la Serna,I., Ohkawa,Y., Berkes,C.A., Bergstrom,D.A., Dacwag,C.S., Tapscott,S.J., and Imbalzano,A.N. (2005). MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3997-4009.
- Dilworth,F.J., Seaver,K.J., Fishburn,A.L., Htet,S.L., and Tapscott,S.J. (2004). In vitro transcription system delineates the distinct roles of the coactivators pCAF and p300 during MyoD/E47-dependent transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11593-11598.
- Dunaief,J.L., Strober,B.E., Guha,S., Khavari,P.A., Alin,K., Luban,J., Begemann,M., Crabtree,G.R., and Goff,S.P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79, 119-130.
- Eckner,R., Yao,T.P., Oldread,E., and Livingston,D.M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* 10, 2478-2490.
- Edmondson,D.G., Lyons,G.E., Martin,J.F., and Olson,E.N. (1994). *Mef2* gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120, 1251-1263.
- Edmondson,D.G. and Olson,E.N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628-640.
- Ferreira,R., Naguibneva,I., Pritchard,L.L., Ait-Si-Ali,S., and Harel-Bellan,A. (2001). The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion. *Oncogene* 20, 3128-3133.
- Fryer,C.J. and Archer,T.K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.

- Gerber,A.N., Klesert,T.R., Bergstrom,D.A., and Tapscott,S.J. (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* *11*, 436-450.
- Gray,S.G. and Ekstrom,T.J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* *262*, 75-83.
- Gu,W., Schneider,J.W., Condorelli,G., Kaushal,S., Mahdavi,V., and Nadal Ginard,B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* *72*, 309-324.
- Guo,K., Wang,J., Andres,V., Smith,R.C., and Walsh,K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3823-3829.
- Halevy,O., Novitch,B.G., Spicer,D.B., Skapek,S.X., Rhee,J., Hannon,G.J., Beach,D., and Lassar,A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* *267*, 1018-1021.
- Han,J., Jiang,Y., Li,Z., Kravchenko,V.V., and Ulevitch,R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* *386*, 296-299.
- Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000a). Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 685-689.
- Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000b). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* *14*, 2393-2409.
- Hassan,A.H., Prochasson,P., Neely,K.E., Galasinski,S.C., Chandy,M., Carrozza,M.J., and Workman,J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* *111*, 369-379.
- Hasty,P., Bradley,A., Morris,J.H., Edmondson,D.G., Venuti,J.M., Olson,E.N., and Klein,W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene [see comments]. *Nature* *364*, 501-506.
- Hebrok,M., Fuchtbauer,A., and Fuchtbauer,E.M. (1997). Repression of muscle-specific gene activation by the murine Twist protein. *Exp. Cell Res.* *232*, 295-303.
- Holterman,C.E. and Rudnicki,M.A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 575-584.
- Huh,M.S., Parker,M.H., Scime,A., Parks,R., and Rudnicki,M.A. (2004). Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J. Cell Biol.* *166*, 865-876.
- Imbalzano,A.N., Kwon,H., Green,M.R., and Kingston,R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* *370*, 481-485.
- Jacks,T., Fazeli,A., Schmitt,E.M., Bronson,R.T., Goodell,M.A., and Weinberg,R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* *359*, 295-300.

- Jahn, L., Sadoshima, J., and Izumo, S. (1994). Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp. Cell Res.* 212, 297-307.
- Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827-830.
- Kadam, S. and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377-389.
- Kadam, S., McAlpine, G.S., Phelan, M.L., Kingston, R.E., Jones, K.A., and Emerson, B.M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* 14, 2441-2451.
- Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-313.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466-471.
- Kaushal, S., Schneider, J.W., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* 266, 1236-1240.
- Kiess, M., Gill, R.M., and Hamel, P.A. (1995). Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ.* 6, 1287-1298.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339-2352.
- Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (1998). The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol* 142, 1447-1459.
- Kitzmann, M. and Fernandez, A. (2001). Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 571-579.
- Knoepfler, P.S., Bergstrom, D.A., Uetsuki, T., Dac-Korytko, I., Sun, Y.H., Wright, W.E., Tapscott, S.J., and Kamps, M.P. (1999). A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Res.* 27, 3752-3761.
- Kowenz-Leutz, E. and Leutz, A. (1999). A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell* 4, 735-743.
- La Thangue, N.B. (1994). DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* 19, 108-114.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., and Weintraub, H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.

- Lee, K.Y., Ladha, M.H., McMahon, C., and Ewen, M.E. (1999). The retinoblastoma protein is linked to the activation of Ras. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7724-7732.
- Li, L. and Olson, E.N. (1992). Regulation of muscle cell growth and differentiation by the MyoD family of helix-loop-helix proteins. *Adv. Cancer Res.* 58, 95-120.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688-693.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., and Olson, E.N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276, 1404-1407.
- Liu, H., Kang, H., Liu, R., Chen, X., and Zhao, K. (2002). Maximal induction of a subset of interferon target genes requires the chromatin-remodeling activity of the BAF complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6471-6479.
- Lyons, G.E., Micales, B.K., Schwarz, J., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Expression of *mef2* genes in the mouse central nervous system suggests a role in neuronal maturation. *J. Neurosci.* 15, 5727-5738.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Ma, Z., Chang, M.J., Shah, R., Adamski, J., Zhao, X., and Benveniste, E.N. (2004). Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 46326-46334.
- Magenta, A., Cenciarelli, C., De Santa, F., Fuschi, P., Martelli, F., Caruso, M., and Felsani, A. (2003). MyoD Stimulates RB Promoter Activity via the CREB/p300 Nuclear Transduction Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2893-2906.
- Maione, R. and Amati, P. (1997). Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1332, M19-M30.
- Maione, R., Fimia, G.M., Holman, P., Schaffhausen, B., and Amati, P. (1994). Retinoblastoma anti-oncogene is involved in the inhibition of myogenesis by polyomavirus large T antigen. *Cell Growth Differ.* 5, 231-237.
- Mal, A., Chattopadhyay, D., Ghosh, M.K., Poon, R.Y., Hunter, T., and Harter, M.L. (2000). p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J. Cell Biol.* 149, 281-292.
- Mal, A. and Harter, M.L. (2003). MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1735-1739.
- Mal, A., Sturniolo, M., Schiltz, R.L., Ghosh, M.K., and Harter, M.L. (2001). A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J.* 20, 1739-1753.

- Mao,Z. and Wiedmann,M. (1999). Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* 274, 31102-31107.
- Marino,S., Vooijs,M., van Der,G.H., Jonkers,J., and Berns,A. (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14, 994-1004.
- Marshall,T.W., Link,K.A., Petre-Draviam,C.E., and Knudsen,K.E. (2003). Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J. Biol. Chem.* 278, 30605-30613.
- Martelli,F., Cenciarelli,C., Santarelli,G., Polikar,B., Felsani,A., and Caruso,M. (1994). MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Oncogene* 9, 3579-3590.
- McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 497-504.
- Meersseman,G., Pennings,S., and Bradbury,E.M. (1992). Mobile nucleosomes--a general behavior. *EMBO J.* 11, 2951-2959.
- Miner,J.H. and Wold,B. (1990). Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1089-1093.
- Miska,E.A., Karlsson,C., Langley,E., Nielsen,S.J., Pines,J., and Kouzarides,T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* 18, 5099-5107.
- Mittnacht,S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 21-27.
- Molkentin,J.D., Black,B.L., Martin,J.F., and Olson,E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125-1136.
- Muchardt,C., Bourachot,B., Reyes,J.C., and Yaniv,M. (1998). ras transformation is associated with decreased expression of the brm/SNF2alpha ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* 17, 223-231.
- Muchardt,C. and Yaniv,M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 12, 4279-4290.
- Murre,C., McCaw,P.S., and Baltimore,D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Narlikar,G.J., Fan,H.Y., and Kingston,R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Novitch,B.G., Mulligan,G.J., Jacks,T., and Lassar,A.B. (1996). Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J. Cell Biol.* 135, 441-456.

- Novitsch, B.G., Spicer, D.B., Kim, P.S., Cheung, W.L., and Lassar, A.B. (1999). pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell- cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr. Biol.* 9, 449-459.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12146-12150.
- Olson, E.N., Arnold, H.H., Rigby, P.W., and Wold, B.J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85, 1-4.
- Olson, E.N., Perry, M., and Schulz, R.A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 172, 2-14.
- Olson, E.N., Spizz, G., and Tainsky, M.A. (1987). The oncogenic forms of N-ras or H-ras prevent skeletal myoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2104-2111.
- Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.
- Pedersen, T.A., Kowenz-Leutz, E., Leutz, A., and Nerlov, C. (2001). Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 15, 3208-3216.
- Penn, B.H., Bergstrom, D.A., Dilworth, F.J., Bengal, E., and Tapscott, S.J. (2004). A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2348-2353.
- Perry, R.L., Parker, M.H., and Rudnicki, M.A. (2001). Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol. Cell* 8, 291-301.
- Peterson, C.L. and Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 187-192.
- Phelps, D.E., Hsiao, K.M., Li, Y., Hu, N.P., Franklin, D.S., Westphal, E., Lee, E.Y., and Xiong, Y. (1998). Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18^{INK4c} expression during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2334-2343.
- Polesskaya, A., Duquet, A., Naguibneva, I., Weise, C., Vervisch, A., Bengal, E., Hucho, F., Robin, P., and Harel-Bellan, A. (2000). CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *J. Biol Chem.* 275, 34359-34364.
- Polesskaya, A., Naguibneva, I., Duquet, A., Bengal, E., Robin, P., and Harel-Bellan, A. (2001a). Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol. Cell Biol* 21, 5312-5320.
- Polesskaya, A., Naguibneva, I., Fritsch, L., Duquet, A., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Vervisch, A., Pritchard, L.L., Cole, P., and Harel-Bellan, A. (2001b). CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *EMBO J.* 20, 6816-6825.

- Puri,P.L., Avantaggiati,M.L., Balsano,C., Sang,N., Graessmann,A., Giordano,A., and Levrero,M. (1997a). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* 16, 369-383.
- Puri,P.L., Sartorelli,V., Yang,X.J., Hamamori,Y., Ogryzko,V.V., Howard,B.H., Kedes,L., Wang,J.Y., Graessmann,A., Nakatani,Y., and Levrero,M. (1997b). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell* 1, 35-45.
- Reyes,J.C., Barra,J., Muchardt,C., Camus,A., Babinet,C., and Yaniv,M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *EMBO J.* 17, 6979-6991.
- Rhodes,S.J. and Konieczny,S.F. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3, 2050-2061.
- Rohwedel,J., Horak,V., Hebrok,M., Fuchtbauer,E.M., and Wobus,A.M. (1995). M-twist expression inhibits mouse embryonic stem cell-derived myogenic differentiation in vitro. *Exp. Cell Res.* 220, 92-100.
- Rudnicki,M.A., Braun,T., Hinuma,S., and Jaenisch,R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383-390.
- Rudnicki,M.A., Schnegelsberg,P.N., Stead,R.H., Braun,T., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.
- Salma,N., Xiao,H., Mueller,E., and Imbalzano,A.N. (2004). Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4651-4663.
- Sartorelli,V., Huang,J., Hamamori,Y., and Kedes,L. (1997). Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1010-1026.
- Sartorelli,V., Puri,P.L., Hamamori,Y., Ogryzko,V., Chung,G., Nakatani,Y., Wang,J.Y., and Kedes,L. (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell* 4, 725-734.
- Schneider,J.W., Gu,W., Zhu,L., Mahdavi,V., and Nadal-Ginard,B. (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. *Science* 264, 1467-1471.
- Schulze,A., Zerfass,K., Spitkovsky,D., Middendorp,S., Berges,J., Helin,K., Jansen-Durr,P., and Henglein,B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11264-11268.
- Sellers,W.R., Novitch,B.G., Miyake,S., Heith,A., Otterson,G.A., Kaye,F.J., Lassar,A.B., and Kaelin,W.G.J. (1998). Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* 12, 95-106.

Shin,E.K., Shin,A., Paulding,C., Schaffhausen,B., and Yee,A.S. (1995). Multiple change in E2F function and regulation occur upon muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2252-2262.

Sif,S., Saurin,A.J., Imbalzano,A.N., and Kingston,R.E. (2001). Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev.* *15*, 603-618.

Simone,C., Forcales,S.V., Hill,D.A., Imbalzano,A.N., Latella,L., and Puri,P.L. (2004). p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat. Genet.* *36*, 738-743.

Singh,P., Coe,J., and Hong,W. (1995). A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* *374*, 562-565.

Smith,C.K., Janney,M.J., and Allen,R.E. (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Physiol* *159*, 379-385.

Sorrentino,V., Pepperkok,R., Davis,R.L., Ansorge,W., and Philipson,L. (1990). Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature* *345*, 813-815.

Soutoglou,E. and Talianidis,I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* *295*, 1901-1904.

Strober,B.E., Dunaief,J.L., Guha, and Goff,S.P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1576-1583.

Takahashi,C., Bronson,R.T., Socolovsky,M., Contreras,B., Lee,K.Y., Jacks,T., Noda,M., Kucherlapati,R., and Ewen,M.E. (2003). Rb and N-ras function together to control differentiation in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5256-5268.

Taya,Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 14-17.

Tedesco,D., Caruso,M., Fischer-Fantuzzi,L., and Vesco,C. (1995). The inhibition of cultured myoblast differentiation by the simian virus 40 large T antigen occurs after myogenin expression and Rb up-regulation and is not exerted by transformation-competent cytoplasmic mutants. *J. Virol.* *69*, 6947-6957.

Ticho,B.S., Stainier,D.Y., Fishman,M.C., and Breitbart,R.E. (1996). Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Mech. Dev.* *59*, 205-218.

Trouche,D., Le Chalony,C., Muchardt,C., Yaniv,M., and Kouzarides,T. (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 11268-11273.

van de Wetering M., Oving,I., Muncan,V., Pon Fong,M.T., Brantjes,H., van Leenen,D., Holstege,F.C., Brummelkamp,T.R., Agami,R., and Clevers,H. (2003). Specific inhibition

of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 4, 609-615.

Wang,A.H., Bertos,N.R., Vezmar,M., Pelletier,N., Crosato,M., Heng,H.H., Th'ng,J., Han,J., and Yang,X.J. (1999). HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7816-7827.

Wang,D.Z., Valdez,M.R., McAnally,J., Richardson,J., and Olson,E.N. (2001). The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128, 4623-4633.

Wang,J. and Nadal-Ginard,B. (1995). Regulation of cyclins and p34CDC2 expression during terminal differentiation of C2C12 myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 82-88.

Wang,W., Xue,Y., Zhou,S., Kuo,A., Cairns,B.R., and Crabtree,G.R. (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* 10, 2117-2130.

Weintraub,H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Weintraub,H., Genetta,T., and Kadesch,T. (1994). Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. *Genes Dev.* 8, 2203-2211.

Weyman,C.M., Ramocki,M.B., Taparowsky,E.J., and Wolfman,A. (1997). Distinct signaling pathways regulate transformation and inhibition of skeletal muscle differentiation by oncogenic Ras. *Oncogene* 14, 697-704.

Wilson,C.J., Chao,D.M., Imbalzano,A.N., Schnitzler,G.R., Kingston,R.E., and Young,R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.

Wright,W.E., Sassoon,D.A., and Lin,V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607-617.

Yaffe,D. and Saxel,O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-727.

Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nishikawa,J., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.

Youn,H.D., Sun,L., Prywes,R., and Liu,J.O. (1999). Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 286, 790-793.

Yuan,W., Condorelli,G., Caruso,M., Felsani,A., and Giordano,A. (1996). Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J. Biol. Chem.* 271, 9009-9013.

Zacksenhaus,E., Jiang,Z., Chung,D., Marth,J.D., Phillips,R.A., and Gallie,B.L. (1996). pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev.* 10, 3051-3064.

Zerfass,K., Schulze,A., Spitkovsky,D., Friedman,V., Henglein,B., and Jansen-Durr,P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* *69*, 6389-6399.

Zhang,H.S., Gavin,M., Dahiya,A., Postigo,A.A., Ma,D., Luo,R.X., Harbour,J.W., and Dean,D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* *101*, 79-89.

Zhang,P., Wong,C., Liu,D., Finegold,M., Harper,J.W., and Elledge,S.J. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* *13*, 213-224.

Zhu,W., Dahmen,J., Bulfone,A., Rigolet,M., Hernandez,M.C., Kuo,W.L., Puellas,L., Rubenstein,J.L., and Israel,M.A. (1995). Id gene expression during development and molecular cloning of the human Id-1 gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *30*, 312-326.