



Reguladores del Ciclo Celular y el Cáncer

Oscar Oliveros Garay, MSc., Profesor Asistente, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.

La detención del ciclo celular normal comienza a ser entendida a través de la identificación y caracterización de los genes inhibidores de CDKs, cuyos productos se insertan dentro de las vías en las cuales están presentes las proteínas supresoras tumorales p53 y pRB.

Las células en un tejido normal están sujetas a una serie de estímulos que las llevan a dividirse, diferenciarse, o incluso morir. Aquellas que sobreviven envejecerán después de un período, que es específico para cada tipo celular. Sin embargo, determinadas agresiones (agentes físicos, químicos o biológicos) pueden alterar estos mecanismos de control, haciendo que la célula entra en un proceso tumoral, con una inestabilidad genómica inherente a su evolución y de la cual depende la adquisición de nuevas características como capacidad invasiva o resistencia a radiación o drogas (1). Los rearreglos cromosómicos frecuentes en casi todo tumor son manifestación de su inestabilidad genómica, y algunos de ellos pueden asociarse con el surgimiento de nuevas poblaciones celulares con ventajas selectivas (2).

En los últimos años se ha reunido evidencia para sustentar que productos de genes mutados en el cáncer están implicados también en el control del ciclo celular, y por lo tanto, podrían ser responsables de la estabilidad del genoma.

Control del ciclo celular

Para su entendimiento, el ciclo celular se ha delimitado en cuatro fases: G1 definido como un período de crecimiento; S durante el cual se sintetiza el DNA; G2 intervalo de preparación para la división celular y M corresponde a la mitosis. En fase G0 se encuentran células en quiescencia (detención temporal del crecimiento) o con diferenciación terminal (por ejemplo, neuronas). Los mecanismos genéticos que aseguran la dependencia de los eventos del ciclo celular son denominados “puntos de control”, y se ubican donde termina una fase y comienza otra (3). Dos de los puntos de control en células eucarióticas son la transición G1-S y la G2-M, los cuales además de controlar la progresión del ciclo, están involucrados en garantizar la integridad del DNA: la detención en G1 impide la replicación del DNA a partir de templeteles lesionados hasta tanto sean reparados, y la detención en G2 previene la segregación a las células hijas de cromosomas alterados al permitir su reparación antes de la mitosis. En células de mamíferos la transición G1-S constituye el punto de control mejor conocido.

La progresión del ciclo celular es coordinada mediante cambios en las quininas dependientes de ciclina CDKs, cuya forma activa la constituyen por lo menos dos

proteínas: una quinasa (enzima que transfiere grupos fosfato), la cual está asociada a una ciclina (proteína expresada en gran cantidad en un momento determinado del ciclo celular y degradada rápidamente). En células de mamíferos se expresa una serie de CDKs paralelamente con ciclinas (Figura 1): CDK4 forma complejos con una de varias ciclinas D durante la progresión de G1 a M, al parecer en respuesta a factores de crecimiento; CDK2 se une a ciclina E o A, ó a las dos, y ello es determinante para la replicación del DNA; y los complejos entre CDK1 (también denominada CDC2) con las ciclinas A y B son esenciales para la mitosis. Así, las CDKs parecen no ser muy específicas para su interacción con cada ciclina. Existe gran homología funcional entre CDKs y ciclinas en los eucariotes analizados, de tal forma que la mayoría de estas proteínas de mamíferos pueden reemplazar la función de sus correspondientes en levaduras.

Varios mecanismos positivos regulan el paso de una fase a otra del ciclo celular, tales como control de la transcripción de genes de ciclinas, degradación rápida de ciclinas, modificación de la actividad quinasa de CDKs por otras quininas o fosfatases. Existen también mecanismos de regulación negativa que llevan a la detención del ciclo celular, para evitar la generación de células con genomas inestables, en respuesta a eventos intrínsecos

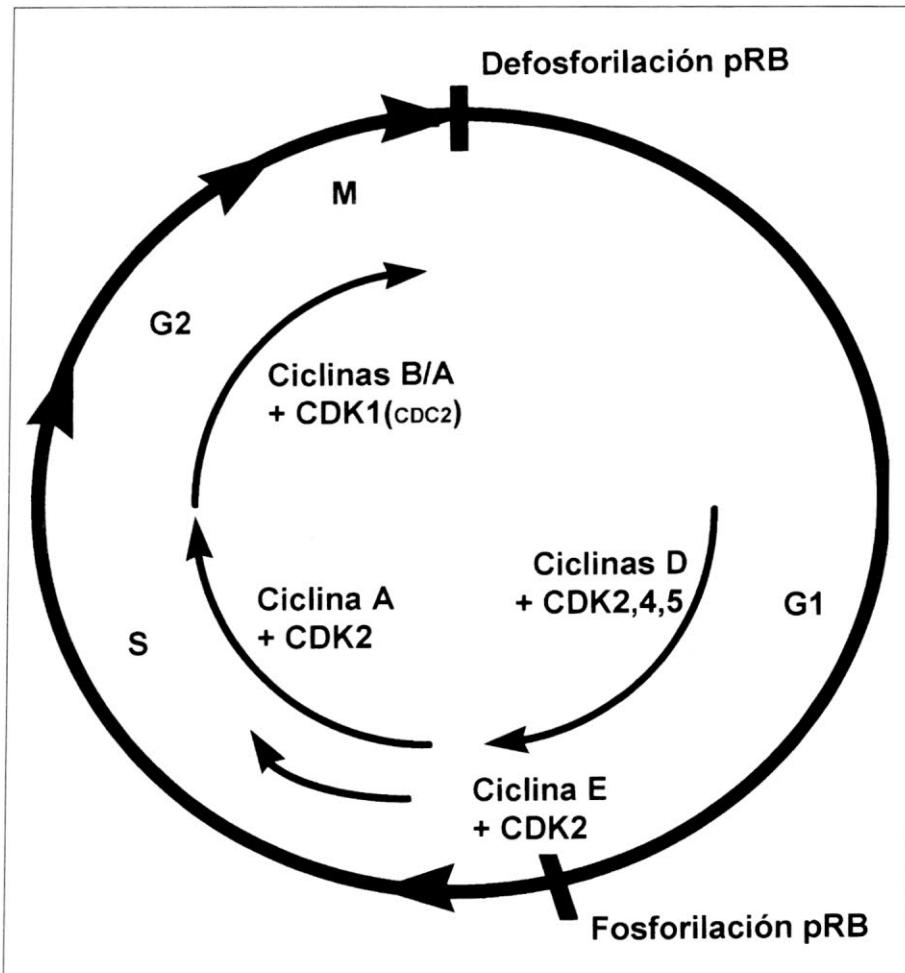


Figura 1. Interacción de ciclinas y CDKs durante el ciclo celular de células normales.

como: el acortamiento gradual de los telómeros (extremos de los cromosomas) durante el envejecimiento; la apoptosis o muerte celular programada; el rearreglo de genes de inmunoglobulinas y de receptores T durante el desarrollo del sistema inmune. También puede detenerse el ciclo por eventos extrínsecos como: la inhibición de la replicación del DNA en presencia de hidroxiurea, la inhibición por contacto entre células normales, la exposición al factor de crecimiento transformante- β , el daño al DNA producido por radiación o algunas drogas genotóxicas.

Las proteínas supresoras tumorales pRB y p53 controlan la transición G1-S

Un gen supresor tumoral es un elemento genético cuya pérdida o inactivación permite a la célula expresar una u otra característica del crecimiento tumoral, y su producto es componente de vías intracelulares para procesar señales inhibitorias provenientes del entorno (Tabla 1). Las proteínas codificadas por los genes supresores tumorales *RBI* del retinoblastoma y *p53*, son componentes moleculares fundamentales en la regulación de la transición G1-S, función que se encuentra alterada en

células malignas, pues el gen *p53* se encuentra mutado en la mayoría de los tumores humanos y en menor proporción el gen *RBI* (4).

● La proteína p53 actúa en una vía de respuesta al daño en el DNA

La proteína p53 actúa como factor de transcripción mediante la activación de genes específicos, entre los que se encuentran algunos implicados en el control del ciclo celular: *GADD45*, el oncogen *MDM2*, y el inhibidor de ciclina-CDK *p21*. En células humanas (o de los mamíferos evaluados) sometidas a radiación ionizante o luz ultravioleta existe un tipo de respuesta al daño del DNA, en el que la *p53* aumenta transitoriamente su concentración (Figura 2), inducción que se acompaña de detención del ciclo celular en G1 o apoptosis. La transfección del gen *p53* silvestre humano a células malignas carentes de *p53*, restaura la detención en G1 después de radiación, para permitir la reparación del DNA antes de que la célula entre en fase S y llegase a estabilizar los daños (5). Por esta función, *p53* ha sido llamado «guardian del genoma», pues células con la proteína *p53* alterada desarrollan aneuploidía (pérdida o ganancia de cromosomas) y amplificación génica (varias copias de un gen de copia simple), eventos poco comunes en células normales, y finalmente pueden transformarse en malignas.

En algunos tipos celulares, la otra respuesta al daño del DNA dependiente de *p53* es la apoptosis o muerte celular, la que se define por rasgos citológicos y moleculares: núcleo fragmentado y un patrón característico de degradación prograda del DNA (6). En este caso,

Tabla 1. Genes Supresores Tumorales Clonados

Gen	Tipo de cáncer	Síndrome hereditario	Proteína: Localización/Funcióñ
APC	Carcinoma de colon	Poliposis adenomatosa de colon	Membrana celular / Proteína asociada a microtúbulos
BRCA1	Carcinoma de seno y ovario	Cáncer hereditario de seno y ovario	Núcleo : ?
DCC	Carcinoma de colon	?	Núcleo : Molécula de adhesión celular
NF1	Neurofibromas	Neurofibromatosis tipo I	Núcleo : Activador GTP-asa
NF2	Schwanomas y meningiomas	Neurofibromatosis tipo 2	Núcleo : Unión de membrana al citoesqueleto?
NHPPC	Ca. de colon no polipósico y otros	Cáncer de colon no polipósico hereditario	Núcleo : Replicación del DNA
p53	>50% cáncer	Síndrome de Li-Fraumeni.	Núcleo: Factor de transcripción
p16/MTS1	Melanomas y muchos otros.	Melanoma Familiar	Núcleo: Inhibidor CDK4
Rb	Retinoblastoma	Retinoblastoma	Núcleo: Regulador de transcripción
VHL	Cáncer de riñón	Síndrome de von Hippel-Lindau.	Núcleo: Elongación de transcripción
TW1	Tumor de Wilms	Tumor de Wilms.	Núcleo: Factor de transcripción

vía de transducción de señales que conducen a la división celular, y su actividad está condicionada a su fosforilación: se encuentra defosforilada en fases G0 y G1, comienza a fosforilarse en la transición G1-S, y se encuentra hiperfosforilada en G2-M (Figura 1) (7). La fosforilación de pRB en G1 es llevada a cabo por los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2, evento que es regulado por varios inhibidores de CDK.

En G1 la pRB defosforilada forma complejos con varias proteínas, entre ellas con el factor de transcripción E2F; esta interacción impide que E2F induzca la transcripción de genes implicados en el inicio de la síntesis del DNA (Figura 3). Al final de la fase G1 ocurren varios eventos que afectan la composición y la función de estos complejos, entre ellos la fosforilación de pRB y probablemente la de E2F, lo que libera a E2F y le permite recuperar



Figura 2: Detección inmunoquímica de p53 con un anticuerpo monoclonal en fibroblastos de piel en cultivo. **Izquierda:** Sin irradiar. **Derecha:** Acumulación de p53 en células irradiadas con luz ultravioleta (100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ - 30min).

el efecto de mutaciones en p53 es la incapacidad de eliminar células con múltiples lesiones en su DNA, lo que les confiere inestabilidad genómica y por lo tanto la posibilidad de transformarse en tumorales; esta función define a p53 como «guardian de los tejidos».

● Varias señales de proliferación confluyen en la proteína pRB

La proteína pRB del retinoblastoma pertenece a una familia con un dominio ‘bolsillo’ que le permite interactuar con otras proteínas. La pRB ocupa un papel central en una

sus actividad, entonces la célula puede entrar en fase S. Además de la represión ejercida por la pRB sobre E2F, también regula durante G1 la función de otros factores de transcripción a través de la formación de complejos; por lo tanto, la pRB puede modular la actividad

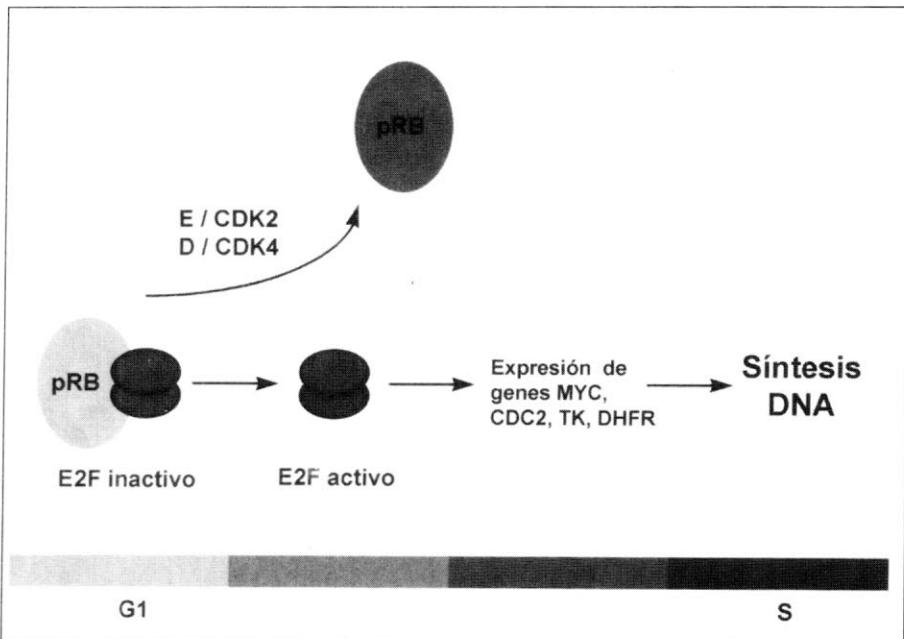


Figura 3. Regulación de pRB sobre la actividad transcripcional de E2F y de este sobre la expresión de genes comprometidos en la síntesis de DNA; la barra inferior indica el grado creciente de fosforilación de pRB y probablemente de E2F. Abreviaturas: MYC, MYB: oncogenes; DHFR: dihidrofolato reductasa; TK: timidina quinasa; CDC2: CDK1.

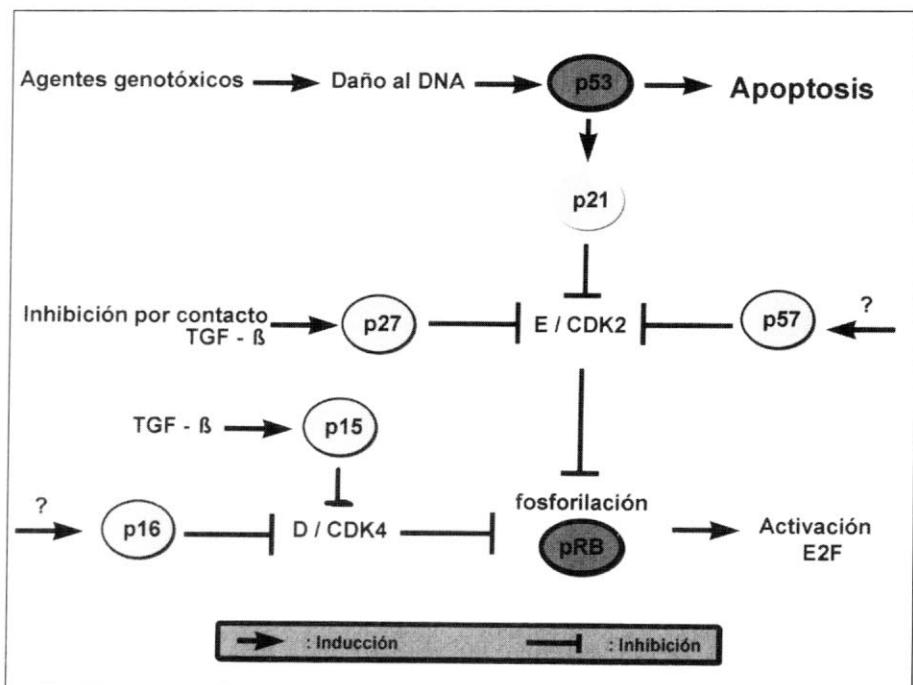


Figura 4: Acción de inhibidores de CDKs y de las proteínas p53 y pRB en el control del ciclo celular.

transcripcional en forma positiva o negativa, dependiendo de el factor de transcripción, el gen blanco y el tipo celular implicados.

La Detención del Ciclo Celular en G1 es ejercida por Inhibidores de CDKs
La actividad quinasa de los complejos ciclina-CDK es inhibida por un grupo

de proteínas recientemente descubierto, cada una denominada por su peso molecular (Figura 4).

● *p16/MTS1 Supresor Tumoral Múltiple:*

Los primeros estudios mostraron que este gen se pierde frecuentemente en varios tipos de cáncer, por lo que se considera un supresor tumoral. El gen *MTS1* codifica para la proteína p16 que inhibe la CDK4, impidiendo por esta vía la entrada al ciclo celular normal; en ausencia de p16, evento que sucede en algunas células tumorales, el complejo ciclina D-CDK4 fosforila la pRB llevando al desacople de factores reguladores de la transcripción y en consecuencia, a la activación de genes comprometidos en la síntesis del DNA (8).

● *p15/MTS2* es un gen que presenta gran similitud de secuencia y de función con *p16/MTS1*, y se encuentra muy cercano a este en el cromosoma 9 humano. Además se ha demostrado que p15 inhibe la actividad de complejos ciclina-CDK y el crecimiento de células tumorales, y se encuentra mutado en algunos tumores, razones por las cuales se le considera un supresor tumoral (9).

● *p21/WAF1/Cip1/Sdi1*: La triple denominación de este inhibidor obedece a su descubrimiento por abordajes experimentales diferentes (10). *WAF1* (Wild-type p53 activated-fragment) fue aislado como un gen regulado por la p53 silvestre más no por sus mutantes; *Cip1* (CDK-interacting protein) fue aislado como proteína presente en complejos con cada una de las ciclinas A, D1 y E, las que a su vez se ligan con CDK2; y el gen *Sdi1* (Senescent cell-derived inhibitor) se identificó en células envejecidas humanas donde su proteína p21 está más concentrada, situación que también se encontró en células en quiescencia (G0). La

secuencia del gen *Sdi1* es idéntica a la del gen *WAF1* y a la de *Cip1*.

La expresión aumentada de *WAF1* suprime el crecimiento de varios tipos de células tumorales humanas carentes del gen p53, por lo que se considera que la inducción de p21 es la señal por la cual p53 detiene el ciclo en G1, inhibiendo la actividad de los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2, bloqueo que a la vez impide la fosforilación de pRB. En células normales la sobreexpresión de p21 inhibe la síntesis del DNA, de esta forma participa en la vía de respuesta al daño del DNA dependiente de p53; ello ha permitido postular que p53 ejerce su acción a través de p21, lo que parece ser cierto sólo para el control del ciclo celular, más no para el control de la apoptosis o de la acción supresora tumoral. Así lo sugieren dos observaciones: 1. 14 tipos tumorales humanos no presentan mutaciones en el gen *p21/WAF1/Cip1/Sdi1*, 2. ratones con p21 mutado crecen normalmente y no desarrollan tumores espontáneos.

La proteína p21 se liga también al PCNA (antígeno nuclear de proliferación) para inhibir la replicación del DNA, lo que le confiere a la p21 una función dual como inhibidor del ciclo celular.

● ***p27Kip1***: Cuando células en cultivo se encuentran en contacto con sus vecinas o están expuestas al factor de crecimiento transformante β, se detiene su crecimiento y el responsable de esta detención es la proteína codificada por el gen *P27Kip1*, la cual inhibe la acción de los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina D-CDK4 (11). Uno de los sustratos de la actividad quinasa es la pRB, por lo tanto se inhibe su fosforilación y el ciclo se detiene en G1; p27 se encuentra unida al complejo ciclina E-CDK2 durante G1 y G0, entre tanto cuando la célula está en proliferación es incapaz de interactuar con dicho complejo. Las proteínas p27, p21 y p57 comparten un dominio del cual depende la capacidad de interacción para actuar como inhibidor de la actividad quinasa de ciclina-CDKs. Hasta la fecha no se han identificado tumores con alteraciones del gen *p27Kip1*, lo que de llegar a evidenciar, permitiría explicar porque las células malignas no presentan inhibición por contacto y pueden iniciar la invasión a tejidos vecinos.

● ***p57Kip2*** es el último miembro descubierto de esta familia de inhibidores, y al igual que los demás detiene el ciclo en G1 cuando se sobreexpresa. Se diferencia porque presenta niveles de expresión variables, encontrándose mayor

expresión en células de tejidos terminalmente diferenciados (músculo esquelético, cerebro, corazón, pulmones y ojos), lo que sugiere que controla la salida del ciclo celular (G0) durante el desarrollo y la diferenciación (12).

La participación de las proteínas pRB y p53 en vías que detienen el ciclo celular, sugieren la posibilidad de que otros genes reguladores de puntos de chequeo en células normales se encuentren mutados en células tumorales y por lo tanto participen en la progresión del cáncer. En este orden de ideas, los inhibidores de CDKs son candidatos de esta función, a pesar de que solamente se hayan demostrado alteraciones de *p16/MTS1* y *p15/MTS2* en cáncer humano; la otra posibilidad es que dichos genes podrían permanecer silvestres dentro de un vía que contiene otro componente genético mutado.

Possiblemente, las características tumorales podrán explicarse a partir de la alteración de estas vías. Cuando todas sus etapas sean identificadas, entonces podrán desarrollarse tratamientos más eficientes contra el cáncer, y en esa perspectiva los inhibidores de CDKs resultan ser moléculas interesantes, pues su bajo peso molecular es favorable para estrategias de terapia génica.

REFERENCIAS

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1994; 194:23-28.
- Oliveros O, Yunis E. Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1995; 82:155-160.
- Hartwell HH, Weintraub TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989; 246:629-644.
- Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific American*, 1996; 275, No 3: 32-40.
- Kastan MB, Onyekwere O, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research*, 1991; 51:6304-6311.
- Roa-Peña L. Apoptosis. Rev. Fac. Med.
- U.N. 1994; 42, No. 4: 215-219.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995; 81:323-330.
- Kamb A, Gruis NA, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994; 264:436-440. Nobori T, Miura K, et al. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer. *Nature*, 1994; 368:753-756.
- Stone S, Dayanath P, et al. Genomic structure, expression and mutational analysis of the p15 (MTS2) gene. *Oncogene*, 1995; 11:987-991.
- El-Deiry WS, Tokino T, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993; 75:817-825.
- Harper JW, Adami GR, et al. The p21 Cdk-i interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993; 75:805-816. Noda A, Ning Y, et al. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Experimental Cell Research*, 1994; 211:90-98.
- Polyak K, Lee M-H, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 1994; 78:59-66.
- Matsuoka S, Edwards MC, et al. p57Kip2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Development*, 1995; 9:650-662.