

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EL DESARROLLO TUMORAL

Mónica A. Costas^{1,2}, Sabrina Micenmacher², María F. Rubio², Pablo N. Fernández Larrosa²

¹Investigadora independiente de CONICET, ²Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM), CONICET-UBA

Dirección postal: Dra. Mónica A. Costas, Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM), CONICET-UBA, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina
e-mail: mcostas@lanari.fmed.uba.ar

Mecanismos que controlan el destino vida-muerte de la célula

Además de diversos procesos fisiológicos que controlan el desarrollo tumoral, existen mecanismos moleculares por los cuales se determina el destino de una célula. Estos mecanismos permiten la proliferación de las células que el organismo detecta como sanas o normales o bien, ante daños genómicos que no pudieron ser reparados y el riesgo de expansión de estos errores, las células son eliminadas por apoptosis o entran en estado de senescencia replicativa. El correcto funcionamiento de estos mecanismos es el que garantiza el estado de salud del individuo.

La apoptosis o muerte celular programada, a diferencia de la necrosis podría compararse a la destrucción del disco rígido de una computadora. Además de numerosos cambios morfológicos de la célula, lo más importante es que primero se destruye toda la información genética (el ADN se fragmenta) y se preserva la integridad de la membrana plasmática hasta las etapas más tardías del proceso, dando lugar a los llamados cuerpos apoptóticos¹. Se dispara por numerosas señales, pero su rol fundamental es la eliminación de células que podrían ser nocivas para el organismo y ocurre en el desarrollo. Es un proceso fisiológicamente controlado.

La necrosis, por el contrario, se produce por daño a la membrana plasmática de la célula, provocando la liberación de su contenido al entorno y en consecuencia una respuesta inflamatoria.

La falla en el control de apoptosis puede llevar tanto a enfermedades degenerativas (apoptosis exacerbada) como a enfermedades autoinmunes

(preservación de clones de células autorreactivas) o desarrollo de tumores.

La senescencia no es la muerte celular, sino un arresto en el ciclo celular. Las células no mueren, pero si bien no dejan descendencia, cambian su patrón de expresión génica, suprimiendo información genética (por heterocromatinización de ciertas zonas del genoma) y liberan factores que pueden favorecer el crecimiento y diferenciación de células vecinas².

El número de células senescentes se incrementa con la vejez y esto se debe al acortamiento telomérico luego de un determinado número de ciclos, que llevaría a una acumulación de errores en las sucesivas replicaciones, por lo cual las células maduras entran en estado senescente. Sin embargo, esta no es la única causa. La acumulación de daños genómicos debido a distintas señales o toxinas del entorno también dispara la entrada en senescencia. Si bien es un mecanismo que preserva al individuo de un posible desarrollo tumoral, también es sabido que a través de la producción de factores de crecimiento puede favorecer la tumorigénesis de células no senescentes del entorno².

Los mecanismos moleculares que controlan todos estos procesos implican un cambio en la expresión génica.

Para comprender como funcionan estos procesos y como pueden contribuir al desarrollo tumoral debemos partir de conceptos básicos que se desarrollan a continuación.

Todas las células de un organismo tienen la misma información genética, sin embargo, no es de esperar que una célula de la epidermis produzca insulina, aunque sí una célula de un islote pancreático. Pero, ¿cómo es posible, si ambas llevan

el gen de insulina? ¿Qué las hace diferentes en su capacidad de expresar ese gen?

Pues bien, todas las células del organismo contienen los mismos genes, pero controlan su expresión de un modo diferente. No todos los genes se expresan en todas las células ni en forma permanente (constitutiva). El control de la expresión génica está a cargo de los llamados “factores de transcripción” (FT). Estos factores son proteínas que se activan bajo determinadas señales, se unen a secuencias específicas en el ADN y controlan el proceso de transcripción de cada gen (síntesis de ARN mensajero utilizando el ADN como molde). La síntesis posterior de péptidos (traducción) se producirá en los ribosomas y por lectura de los ARNs sintetizados.

Cada gen es un fragmento de ADN que contiene largas secuencias de nucleótidos, algunas de las cuales se preservan en el ARNm (mensajero) maduro y llamadas “exones” y otras que si bien se copian a ARN, se pierden en el proceso de maduración y se llaman “intrones”.

Si bien el ADN es una doble cadena polinu-cleotídica, tiene un origen y un sentido de lectura y copia (transcripción) para cada gen. A la izquierda

del origen (llamado el +1) se encuentra lo que llamamos “promotor” y contiene las secuencias específicas (etiquetas) para la unión de distintos FT y para reclutar a la enzima ARN polimerasa que realizará el proceso de copia a ARN (Fig. 1a).

Los promotores de los distintos genes llevan algunas etiquetas conservadas y comunes a casi todos los genes y otras etiquetas específicas para la unión de otros FT. La combinación de etiquetas es lo que da la especificidad en el control de la expresión de cada gen (Fig. 1a).

Algunos genes son de expresión constitutiva y a niveles constantes, tal como ocurre con el gen que codifica para la actina del citoesqueleto y esto ocurre porque en sus promotores llevan etiquetas para la unión de FT que están presentes en todas las células y siempre activos. Otros, requieren de la unión en sus promotores de FTs más específicos, que no están activos en todas las células ni todo el tiempo.

La actividad de los FTs se controla por señales que la célula recibe del entorno, como hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés, toxinas e infecciones virales. Debido a estas señales, se dispara una cascada de eventos que

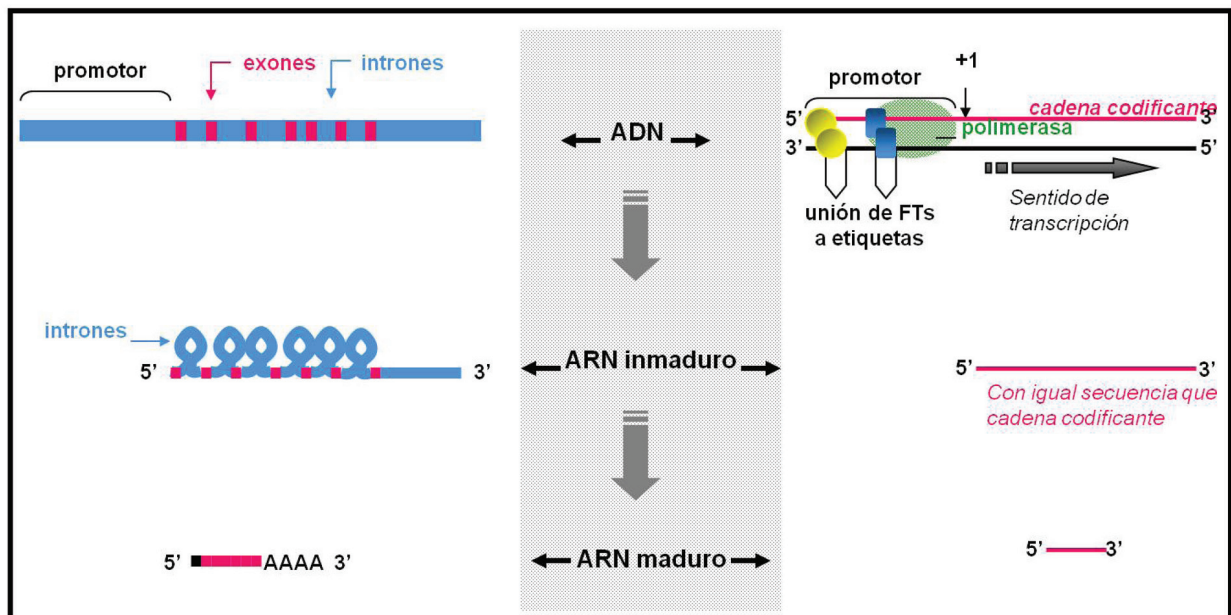


Figura 1 a- Regulación de la expresión génica. A la izquierda se muestra en forma esquemática la estructura de un gen en el ADN, constituido por exones e intrones y bajo el control de un promotor. En la transcripción el ADN se copia a ARNm (ARN mensajero). En su estado inmaduro, el ARNm contiene tanto exones como intrones y en la maduración, se remueven los intrones y los extremos 5' fosfato y 3' oxidrilo se protegen de la degradación para su transporte al citoplasma por el agregado de un “capuchón” (nucleótido modificado) y una cola de nucleótidos de adenina. A la derecha, se muestra el proceso, pero en detalle las cadenas antiparalelas y complementarias del ADN: la codificante (conteniendo la misma secuencia que el ARN) y la cadena que la ARN polimerasa utiliza como molde para la copia de ARN, así como su sentido de síntesis, la cual depende de la unión de los FT a secuencias específicas en el promotor.

lleva a cambios en la fosforilación, conformación o asociación de los FTs con otras proteínas y así pueden migrar al núcleo o adquirir la conformación espacial adecuada para reconocer etiquetas en los promotores de sus genes blanco.

Los genes sólo se expresan (se transcriben a ARN que luego se traduce a proteína) si se unen los FTs específicos. La transcripción en ausencia de FTs es prácticamente despreciable.

Entre las grandes cascadas de transducción de señal capaces de modificar la actividad de los FTs y la expresión génica podemos distinguir de un modo muy general dos tipos: las disparadas por hormonas esteroideas y otras moléculas liposolubles que atraviesan la membrana plasmática y las disparadas por proteínas o moléculas que no atraviesan la membrana libremente. Las primeras, utilizan los llamados “receptores nucleares” que suelen encontrarse en el citoplasma asociados a chaperonas y no son ni más ni menos que FTs. Una vez unido su ligando, estos receptores migran al núcleo y se unen a etiquetas específicas en los promotores de sus genes blanco. Este es el caso de los glucocorticoides, los estrógenos y progestágenos (Fig. 1b).

Las señales disparadas por hormonas de naturaleza proteica en cambio, reconocen receptores

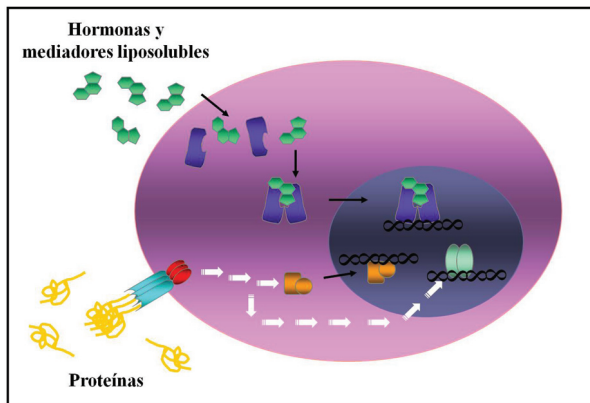


Figura 1 b- Transducción de señales en la célula. Las hormonas esteroideas liposolubles atraviesan la membrana plasmática y se unen a receptores que forman dímeros (para su posterior unión a cada una de las cadenas del ADN). Una vez unidos a sus ligandos los receptores se encuentran activos y los complejos migran al núcleo, reconocen secuencias específicas en los promotores blanco de acción y así regulan la expresión génica. Los receptores de hormonas esteroideas son FTs. Las proteínas reconocen receptores de membrana. Una vez unido el ligando, los receptores modifican su conformación espacial y a través de sus dominios citoplasmáticos reclutan y activan a otros mediadores que a su vez modifican otros sustratos (cascadas de quinasas por ejemplo) produciendo un efecto en cadena que culmina activando un factor de transcripción.

en la membrana plasmática y a partir de allí se produce una cascada de eventos conocidos como “transducción de señal” cuyo punto de inicio es el cambio conformacional del receptor de membrana una vez unido a su ligando, que recluta y activa a otro mediador del lado citoplasmático que funcionará como segundo mensajero. La cascada finaliza en una activación o inhibición de un FT y modificando de este modo la expresión génica (Fig. 1b).

Además de los FTs, existen otras moléculas que no se unen directamente al ADN, pero que sí se asocian a los FTs y los ayudan en su actividad transcripcional llamados “coactivadores”. Los coactivadores contienen o reclutan actividades enzimáticas por las cuales pueden acetilar a las histonas, ayudando a relajar la estructura de cromatina que de este modo queda más accesible para la síntesis de ARN a partir de una de las cadenas como molde.

El factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B fue originalmente identificado como el factor nuclear responsable de la expresión del gen de la cadena kappa de inmunoglobulinas y de ahí su nombre. Posteriormente se descubrió su importancia en el control de toda la respuesta inmune, dado que controla la expresión de citoquinas, receptores para las mismas, mediadores de la respuesta inflamatoria y moléculas de adhesión^{3,4}. Hoy se sabe que está involucrado en el control de la expresión de genes clave para numerosas respuestas celulares como: la proliferación y ciclo celular, la diferenciación, la migración, el desarrollo, expresión de genes anti-apoptóticos, la senescencia^{3, 5, 6}.

Es el principal responsable de la respuesta inflamatoria y mediador clave en el shock séptico. El receptor de glucocorticoides activado por unión a su ligando es un inhibidor natural de su activación^{7,8}, aunque la aspirina o la sulfasalazina también actúan inhibiendo su activación⁹ (Fig. 2a).

Su participación en el desarrollo tumoral ha sido ampliamente demostrado^{4, 10-12}.

Entre las múltiples señales capaces de activarlo se encuentra la citoquina inflamatoria Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), una proteína particularmente interesante, dado que es capaz de enviar simultáneamente a la célula un doble mensaje: inducción de muerte por necrosis o apoptosis y activación de una señal anti-apoptótica como

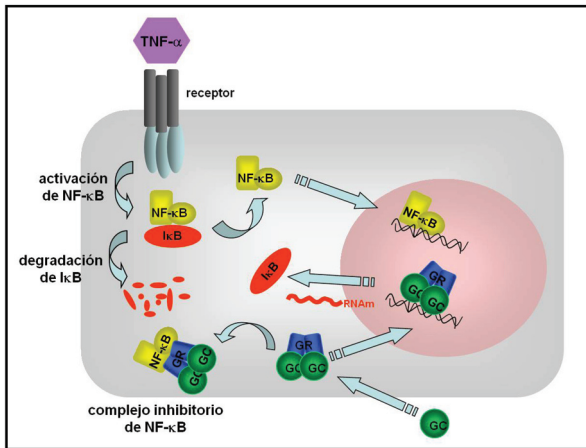


Figura 2 a- Activación de NF- κ B y modelo de inmunosupresión por glucocorticoides a nivel molecular. Entre las múltiples señales que activan a NF- κ B se encuentra TNF- α . El FT en su estado inactivo se encuentra en el citoplasma unido a un factor inhibidor llamado I κ B. Esta proteína mantiene oculta la etiqueta de translocación nuclear del FT. La cascada de señales induce la fosforilación y degradación de I κ B (proceso que se inhibe por aspirina). NF- κ B ahora libre, se transloca al núcleo para unirse a secuencias específicas en los promotores de sus genes blanco e inducir su transcripción. Los GC (glucocorticoides) atraviesan la membrana y se unen a sus receptores. Los complejos hormona-receptor se unen a NF- κ B y lo mantienen secuestrado en citoplasma (enmascaran etiqueta de translocación nuclear) evitando la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. Un mecanismo adicional de inactivación de NF- κ B es la inducción de la transcripción de ARNm de I κ B. El aumento en los niveles de I κ B secuestra a NF- κ B en citoplasma.

NF- κ B¹³. ¿Qué señal prevalece? Habitualmente y en la mayoría de las células, la señal de vida es la que triunfa. De acuerdo con numerosos estudios, ha sido demostrado que en la mayoría de las células TNF- α induce la muerte celular sólo bajo la acción de agentes sensibilizadores (inhibidores de la expresión génica como actinomicina D, o de la activación de NF- κ B como aspirina).

Por el contrario a lo esperado, TNF- α puede incluso ser una señal proliferativa que contribuye al desarrollo tumoral¹⁴.

El coactivador RAC3

RAC3 (coactivador asociado al receptor de ácido retinoico), también conocido como SRC-3 (coactivador de receptores de esteroides) o AIB1 (del inglés: amplificado en tumor mamario) es una molécula de 160 KDa que pertenece a la familia de coactivadores de receptores nucleares conocida como p160¹⁵. Originalmente fue descrita por su

capacidad de asociarse a receptores de hormonas esteroideas, tales como el receptor de estrógenos (ER) aumentando su actividad en el control de la expresión de genes blanco de la hormona, como la Ciclina D1¹⁶. El aumento en la respuesta a esteroides puede llevar a un aumento en la proliferación celular.

Posteriormente se demostró que esta molécula se encontraba en altos niveles en tumores de mama y ovario, aumentando la respuesta a estrógenos y progestágenos¹⁶.

En el año 2000, nuestro grupo demostró que RAC3 es además un coactivador del factor de transcripción NF- κ B, el cual, como ya se ha explicado, además de su rol en sistema inmune, contribuye a la proliferación celular y tiene un rol protector de apoptosis¹⁷ (Fig. 2b).

No tardó en investigarse si RAC3 podría estar elevado en otros tipos de tumores y contribuyendo a su evolución a través de mecanismos hormono-independientes. Así fue que se encontró elevado en tumores hepáticos y gástricos^{18, 19}. Mas aún, nuestro grupo demostró que niveles aumentados de RAC3 podían contribuir a la proliferación de células de tumor de mama ER positivas por mecanismos dependientes de NF- κ B¹⁴.

Posteriormente investigamos si además de la proliferación, niveles aumentados de RAC3 podrían contribuir al desarrollo tumoral aumentando la resistencia a apoptosis. Demostramos que esta hipótesis era correcta en distintas líneas celulares²⁰, incluyendo células leucémicas y esta condición podía revertirse inhibiendo la expresión génica de RAC3, aumentando en consecuencia la sensibilidad a apoptosis inducida por drogas quimioterapéuticas²¹.

De acuerdo con trabajos publicados en los últimos años respecto de esta molécula, existe un consenso en su consideración como un oncogén. Sin embargo, aún no ha sido esclarecido qué mecanismos controlan los niveles de RAC3, dado que su aumento no siempre se debe a una amplificación génica y tampoco se sabe en qué etapa del desarrollo de un tumor se produce este cambio.

Conclusiones finales

El objetivo clave en una terapia anti-tumoral es lograr el tratamiento adecuado de la enfermedad con mínimos daños a las células normales y

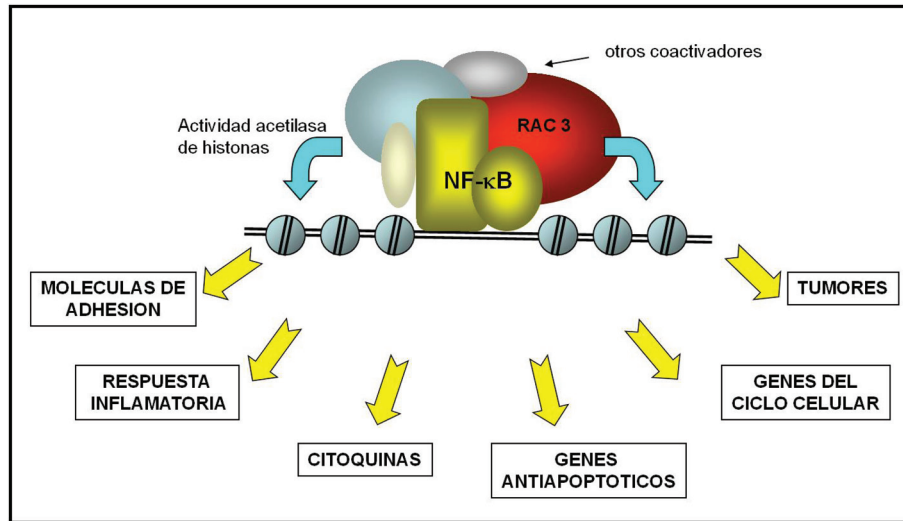


Figura 2 b- RAC3 es un coactivador de NF- κ B. Para que ocurra la transcripción, la cromatina debe relajarse disminuyendo su interacción con las histonas, de modo que ambas cadenas de ADN puedan separarse y permitir el paso de la ARN polimerasa. Los FTs unidos a sus secuencias en los promotores reclutan proteínas que agregan acetilos a las histonas disminuyendo su carga positiva y afinidad por el ADN. NF- κ B recluta a RAC3 y otras moléculas que facilitan la interacción de este FT con el complejo que contiene a la ARN polimerasa y facilita la transcripción.

logrando, de ser posible, la eliminación total de todas las células tumorales que de persistir, siguen acumulando mutaciones que las capacita para la generación de nuevas metástasis.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos actualmente y a pesar del crecimiento exponencial en los últimos años sobre nuevos oncogenes y mecanismos moleculares y fisiológicos que controlan el desarrollo tumoral, es que todos los fármacos desarrollados hasta el presente, en muy pocas ocasiones logran erradicar en su totalidad las células tumorales sin ocasionar efectos nocivos en las células normales y perjudicando la salud general del individuo. Es que precisamente, los mecanismos y enzimas que afectan son utilizados por casi todas las células del organismo. ¿Cómo diseñar entonces terapias más específicas y eficientes? Tradicionalmente siempre hemos investigado en busca de una propiedad, una mutación o un marcador selectivo de la célula tumoral. Existen, pero sin embargo, esto no ha resultado información suficiente. No existen células tumorales de un individuo iguales a las de otro y lo más grave: ni siquiera son todas iguales entre sí en el mismo individuo ni en las distintas etapas de la evolución de la enfermedad. Tal vez, antes de pensar en nuevas estrategias para combatir las necesitamos una mejor comprensión de los mecanismos elementales del control de la expresión de los genes que regulan

la proliferación, el ciclo celular, la diferenciación y la muerte, en todas las células. Cuando falla uno de estos mecanismos predispone a un acúmulo de errores que sientan las bases para el desarrollo de un tumor. Una mutación en un gen que suprime el arresto de ciclo celular como por ejemplo p53, no implica el desarrollo de un tumor, pero, sin embargo, al no existir arresto, no existe la posibilidad de corregir errores en la síntesis del nuevo ADN para las células hijas, que heredarán nuevas mutaciones, además de proseguir su ciclo de proliferación sin control. Dentro del organismo, como en el planeta, opera la selección natural y si estas nuevas mutaciones aportan una ventaja adaptativa, como independencia de factores de crecimiento y resistencia a apoptosis, estamos ante un problema, dado que además conservan su capacidad de proliferar y seguir acumulando mutaciones indefinidamente, como por ejemplo, la adquisición de movilidad, expresión de proteasas para invadir, cambio en la expresión de moléculas de adhesión para alojarse en otros tejidos.

Los contenidos aquí desarrollados pretenden interesar al lector sobre los mecanismos moleculares que controlan respuestas básicas de las células y están involucrados en el desarrollo tumoral, poniendo énfasis en los mecanismos más que en "las mutaciones", dado que puede haber cambios en la expresión de genes que alteren el destino de

la célula sin que hayan ocurrido cambios de secuencia en su gen. Se ha desarrollado como ejemplo las actividades de un factor de transcripción y un coactivador, ambos involucrados en el desarrollo tumoral e hiperactivos o en alto título en distintos tipos de tumor.

Actualmente, existen grupos de investigación dedicados a la exploración de posibles terapias génicas, utilizando por ejemplo, vectores adenovirales que llevan el gen normal con el objeto de compensar la ausencia de ciertas funciones que han sido perdidas por mutación. Si bien este es un campo de investigación promisorio a futuro, un claro conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la expresión génica resulta fundamental para el desarrollo de futuras terapias anti-cáncer más efectivas, pues no se trata sólo de poseer genes normales, sino de que éstos se expresen normalmente.

Bibliografía

1. Costas MA. Vida y muerte de la célula: las señales intracelulares. *Medicina (B Aires)* 2006; 66: 281-4.
2. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223-33.
3. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60.
4. Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; 13: 1367-78.
5. Natoli G. When sirtuins and NF-kappaB collide. *Cell* 2009; 136: 19-21.
6. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5785-99.
7. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90.
8. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 401-12.
9. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid R. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101: 1163-74.
10. Baldwin A. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-6.
11. Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 107-14.
12. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3629-39.
13. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308.
14. Rubio MF, Werbajh S, Cafferata EG, et al. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene* 2006; 25: 1367-77.
15. Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8479-84.
16. Anzick S, Kononen J, Walker R, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997; 277: 965-8.
17. Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF-kB coactivator. *FEBS Lett* 2000; 485: 195-9.
18. Yan J, Tsai SY, Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 387-94.
19. Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* 2000; 89: 217-23.
20. Colo GP, Rubio MF, Nojek IM, et al. The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action. *Oncogene* 2008; 27: 2430-44.
21. Colo GP, Rosato RR, Grant S, Costas MA. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2007; 581: 5075-81.