

WT1 : SEXO, VIDA Y MUERTE

ANADULCE HERNÁNDEZ HERRERA, ALEJANDRA MARIVEL AGUIRRE CAVAZOS, HERMINIO FUENTES VÉLEZ,
CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA, LAURA TREJO ÁVILA, PABLO ZAPATA BENAVIDES

La proteína WT1 (tumor de Wilms) es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación celular y la apoptosis.^{1,2} La WT1 modula la expresión de genes relacionados con estos procesos y su interacción con otras proteínas le confiere la capacidad de realizar funciones biológicas distintas (figura 1).³ Estudios recientes han demostrado que WT1 modula un grupo de genes responsables de la diferenciación sexual.⁴

El gen *wt-1* se localiza en el cromosoma 11p13, está constituido por 50 Kb, contiene 10 exones y genera un RNAm de 3.5 Kb. Posee tres sitios de inicio de la traducción, lo que origina tres isoformas de la proteína con diferente peso molecular: 62-64 kDa, 52-54 kDa y 36-38 kDa. La proteína típica de WT1 es la isoforma de 52-54 kDa. En su extremo carboxilo terminal presenta un dominio de unión al DNA formado por cuatro dedos de zinc de tipo Kruppel, codificados por los exones 7-10. Los dedos de zinc 2-4 de WT1 presentan alta homología en su secuencia de aminoácidos, con los presentes, en el factor de transcripción *Early Growth Response 1* (EGR1). En su extremo aminoterminal se localiza un dominio de transactivación rico en prolina y glutamina,^{5,6} un dominio de dimerización y un dominio de represión. Durante el proceso de maduración, su RNAm puede sufrir dos *splicing* (empalmes) alternativos: uno en el exón 5, donde se insertan o eliminan 17 aminoácidos entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al DNA, su función específica aún no es clara. El segundo *splicing* alternativo ocurre entre el exón 9 y 10, en donde se insertan o eliminan tres aminoácidos: Lys-Thr-Ser -KTS- (figura 2).^{5,7,8} La inserción de estos tres aminoácidos (KTS) altera el espacio existente entre

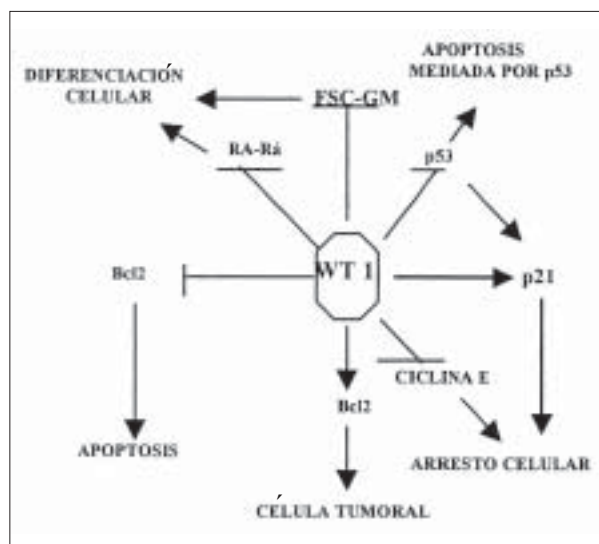


Fig.1. Representación esquemática de las vías de señalización de los diferentes procesos biológicos que son modulados por la WT1.

el tercero y cuarto dedo de zinc, ampliando la gama de genes que pueden ser activados o reprimidos por su unión a una secuencia consenso en sus promotores,^{9,10} sin embargo, la activación o represión de estos genes depende también de la arquitectura del promotor y de la estirpe celular.³⁴ En general, la isoforma KTS (+) está asociada con procesos de maduración del RNAm, mientras que la isoforma KTS (-) está asociada al proceso de transcripción.¹³

En algunos mamíferos el gen *wt-1* puede generar más de 24 isoformas mediante la combinación de splicings, sitios de inicio de la traducción y edi-

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.

ción del RNA. En los peces, este proceso es más simple, solamente se ha observado la expresión de dos isoformas originadas por la inserción o deleción de los tres aminoácidos.¹¹

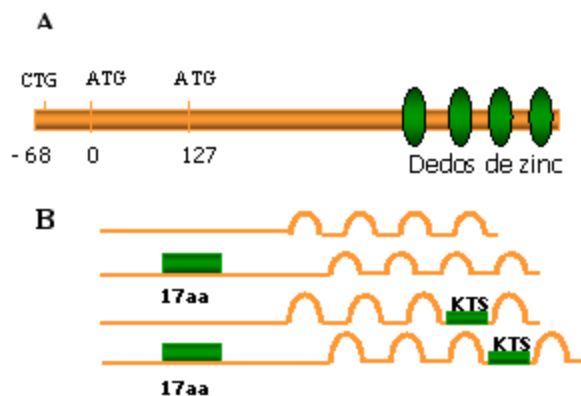


Fig. 2. Organización de las diferentes isoformas de WT1.

La isoforma de 36-38 kDa del WT1 se ha detectado recientemente en líneas celulares y en especímenes de los tumores de Wilms. Esta proteína carece de 127 aminoácidos en la porción aminoterminal. La ausencia de los 127 aminoácidos origina la pérdida del dominio de dimerización y parte del dominio de represión. En este marco, que da lugar a la proteína 36-38 kDa, también se generan las cuatro isoformas por medio de los splicing alternativos. La isoforma pequeña de WT-1 KTS (-) de 36-38 kDa tiene la capacidad de transactivar 1.5 veces más que el WT1 KTS (-) de 52-54 kDa. Sin embargo, la función biológica de esta proteína aún no se ha determinado claramente.¹²

Propiedades transactivadoras del WT1 (KTS-)

La función transactivadora del WT1 se realiza por la interacción de sus cuatro dedos de zinc con el DNA blanco. Las isoformas KTS (-) presentan mayor afinidad al DNA. El WT1 se une a una secuencia consenso llamada WTE (elemento de respuesta a WT1, 5'-CGGTGGGAGT-3),^{9,13} y reprime la expresión de genes relacionados con el crecimiento y proliferación celular como se muestra en la tabla I.

Se ha demostrado que WT1 tiene la capacidad de inducir a la proliferación o arresto celular, diferenciación celular, diferenciación sexual y bloquear la apoptosis, a través de activación transcripcional.

La capacidad de WT1 KTS (-) de inducir arresto en el ciclo celular se debe a la activación de p21 (un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina);¹⁴ un aumento en la expresión de Bcl-2 por acción de WT1 favorece la proliferación celular y resistencia a quimioterapia² (ver figura 1). El promotor de Bcl-2 contiene dos elementos consenso para la unión de WT: la unión al sitio -1460 funciona como un elemento represor en células HeLa (células provenientes de tumor de cervix), mientras que la unión del WT1 al sitio -1807 funciona como un elemento activador de la expresión en una línea celular de rhabdomyosarcoma.^{15,16,2} Esto demuestra la capacidad del WT1 para reprimir o activar la expresión de un mismo gen, dependiendo del sitio de unión, el tipo de célula y de otros factores aún no conocidos.

Tabla I. Algunos genes que son reprimidos o activados por el WT1

Reprimidos	Activados
EGFR	MIS
IGF-II	SRY
IGFR	Dax-1
c-myc, n-myc	E-cadherina
PDGF	p21
TGF	AMPHIREGULINA
RAR	Bcl-2
CSF	Ciclina-E
Bcl-2	WT 1
EGR 1	
IGFR	
WT 1	

La asociación entre el WT1 y p53 modula sus respectivas propiedades reguladoras de la transcripción. En ciertos tipos celulares, p53 bloquea la función del WT1, reprimiendo su actividad transcripcional,¹⁷ mientras que el WT1 ejerce un efecto cooperativo en la transcripción activada por p53. Los dedos de zinc 1 y 2 del WT1 favorecen la estabilidad de p53.¹⁸

WT1 en diferenciación sexual

Los productos del gen *wt1* son esenciales para la diferenciación sexual masculina. Las mutaciones de WT1 originan dos tipos de anomalías en el sistema genitourinario: el síndrome Denys Drash y el síndrome Frasier. Los pacientes con estos síndromes presentan reversión sexual de varón a mujer, pseu-

dohermafroditismo y criptorquidismo. La pérdida de la función del WT1 por mutaciones en líneas germinales está asociada con efectos moderados de la diferenciación sexual (criptorquidismo). Si estas mutaciones producen dominantes negativos, se asocia con efectos severos en el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual (pseudohermafroditismo macho). El papel del WT1 en la determinación y diferenciación sexual se debe a la activación de los genes *sry*, *mis*, *sf1* y *dax*, por la isoforma KTS- (figura 3).

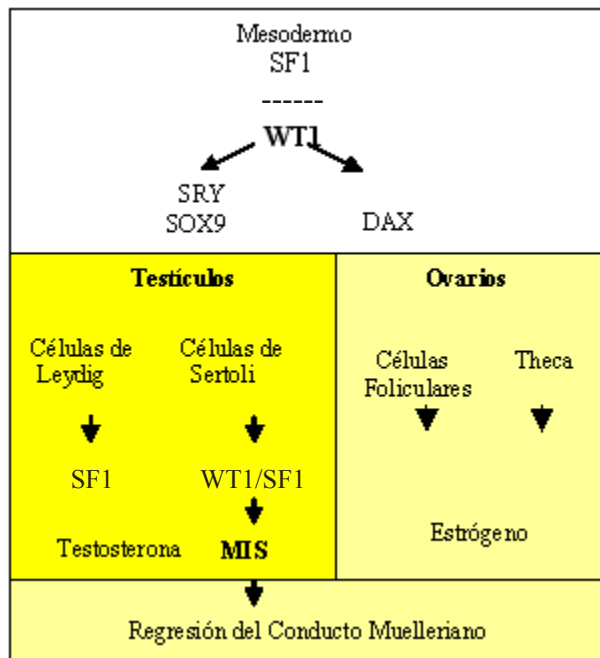


Fig. 3. Vía molecular de la diferenciación sexual. El WT1 modula algunos genes involucrados en el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual en mamíferos.

Tumor de Wilms

La proteína WT1 está inactiva en aproximadamente el 15% de los tumores de Wilms esporádicos. El tumor de Wilms (nefroblastoma) es la neoplasia infantil de mayor prevalencia en Estados Unidos (1 en 10,000 niños).¹⁹ Este tejido renal presenta diferentes fases de desarrollo, sugiriendo que el tumor de Wilms puede estar relacionado con un programa de diferenciación anormal en el riñón. El tumor de Wilms está formado de restos nefrogénicos (islas residuales de tejido inmaduro encontradas en algunos riñones) y el tejido renal, el cual rodea al tumor de Wilms.²⁰ El 10% de los tumores de Wilms espo-

rádicos presentan una delección del exón 1, lo cual altera la función transactivadora de la proteína, expresada en niveles elevados.²¹ En la mayoría de los casos de tumor de Wilms, éstos son unilaterales, esporádicos, en ocasiones se encuentran asociados a los síndromes WARG, Denys Drash (DDS) y Beckwith-Widemann (BWS). Estos síndromes son originados por una mutación constitutiva en el gen *wt-1*.

WT1 en tumorigénesis

Sólo el 15% de los tumores de Wilms presentan mutaciones en el gen *wt-1*, se dedujo que en estos casos actuaba como un gen supresor del tumor. Estudios recientes han demostrado que el gen *wt1* está sobreexpresado en muchos tipos de leucemias, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica aguda y síndromes mielodisplásicos.^{22,23,24,25,26,27} En la leucemia linfoblástica aguda humana (ALL), el *wt-1* se encuentra sobreexpresado diez veces más que en células normales, actuando como un oncogén, por tal razón ha sido considerado como un antígeno tumoral en este tipo de neoplasias.^{28,27,19} Esta sobreexpresión se asocia con un pronóstico desfavorable. Se ha reportado la expresión de *wt-1* en tumores sólidos como cáncer de ovario, útero, pulmón, testículo, tiroides, melanoma y cáncer de mama.^{29,1,30,31} La sobreexpresión de la proteína en estos tipos de tumores y la inhibición de proliferación celular observada por el bloqueo de la expresión de este gen con oligonucleótidos antisentidos y ribozimas, revelan su posible papel oncogénico, sin embargo, reportes recientes indican que WT-1 reprime la tumorigenicidad de muchas líneas celulares.³² Es posible que un desbalance entre las diferentes isoformas del WT1 sea el factor responsable que determine la capacidad del WT1 para actuar como gen supresor de tumor o como factor oncogénico.

Cáncer de mama

Se han realizado algunos estudios de la expresión del WT1 en el cáncer de mama. Silberstein y cols. encontraron expresión de *wt-1* en el tejido normal de mama y baja o nula expresión de *wt-1* en el tejido tumoral por inmunohistoquímica y RT-PCR. También reportaron ausencia del exón 5 en el tejido tumoral,³¹ sin embargo, Fabre y cols. encontraron que la pérdida de la heterocigocidad es un evento

raro en las etapas tempranas de cáncer de mama, pero más común en cáncer invasivo.¹⁶ Todos los estudios referentes a la expresión del *wt1* en cáncer mamario subsecuentes al de Silberstein encontraron resultados contradictorios a éste, Loeb y cols. encontraron una alta expresión de *wt-1* en carcinomas primarios, pero no en el epitelio normal.²⁸ Huang y cols. demostraron una metilación aberrante de las islas CpG en el promotor y primer exón de *wt-1* en cinco de 20 (25%) carcinomas mamarios,²⁵ Miyoshi y cols. determinaron que la alta expresión de *wt1* predice un pobre pronóstico en pacientes con cáncer.³³

Nuestro grupo se ha enfocado principalmente al estudio del potencial oncogénico del *wt1* en el cáncer de pulmón y cáncer de mama. En este último, hemos observado que la expresión del gen *wt-1* es importante para el mantenimiento de la proliferación celular y su capacidad para modular la expresión de genes involucrados en el desarrollo y mantenimiento neoplásico, como la ciclina D (proteína involucrada en el ciclo celular que se encuentra sobre expresada en el 20% de los cánceres de mama) y la proteína anti-apotótica Bcl-2, que induce resistencia a la quimioterapia. La expresión de Bcl2 está fuertemente correlacionada con la expresión del receptor de estrógeno, el cual es importante para determinar la respuesta a la terapia hormonal, por tal razón consideramos que el WT1 puede tener potencial como marcador de tumor y puede ser considerado en un futuro como un blanco terapéutico.

Resumen

El gen del tumor de Wilms (*wt-1*) codifica para un factor de transcripción, miembro de la familia de dedos de zinc, implicado en el desarrollo sexual y en tumorigénesis. Se ha observado que tiene la capacidad de actuar como un gen supresor de tumor o como un oncogén, alterando el crecimiento celular y la apoptosis. Se ha estudiado el potencial oncogénico de WT1 en células leucémicas, cáncer de mama, ovarios y de pulmón, y es considerado en estas neoplasias como un antígeno tumoral; por estas razones es un potencial marcador de tumor y un posible blanco terapéutico.

Palabras clave: *Wt1*, Cáncer, Diferenciación sexual, Apoptosis.

Abstract

The Wilms tumor suppressor gene (WT1) encodes a cys-is-zinc finger transcription factor, implicated in normal sexual development and tumorigenesis. The WT1 gene has the ability to act as both a tumor suppressor gene and as an oncogene, thus altering cellular growth and apoptosis. The oncogene potential has been observed in leukemic cells, as well as in breast, lung and ovarian cancer, acting in these malignant conditions as a tumor antigen. For these reasons, the WT1 gene is a potential tumor marker and a possible therapeutic agent.

Keywords: *Wt1*, Cancer, Sexual differentiation, Apoptosis.

Referencias

1. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.* 1998.12:3217-3225
2. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the *bcl-2* proto-oncogene. *EMBO J.* 1999. 18:3990-4003
3. Lee SB and Heaver DA, Wilms tumor and the *wt1* gene. *Exp Cell.* 2001. 264:74-99.
4. Kim J, Prawitt D, Bardeseey N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J. The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates *Dax-1* gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol.* 1999. 19:2289-2299
5. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H and Lewis WH. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990. 60:509-520.
6. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP. Homozygous deletion in Wilms Tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature.* 1990.343:774-778.
7. Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2000. 4:257-2569.
8. Mrowka C, Schedl A. Wilms' tumor suppressor

- gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *J Am Soc Nephrol*.2000. 16:S106-115
9. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol*. 1995.15:1489-1498
 10. Wang ZY, Qiu, QQ, Gurrieri M, Huang J, Deuel TF. Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995.10: 1243-1247.
 11. Hastie ND. Life, sex, and WT1 isoforms—three amino acids can make all the difference. *Cell*. 2001. 106:391-394.
 12. SchRNAhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem*.1999. 274:23456-23462.
 13. Rauscher FJ 3rd Tumor suppressor genes which encode transcriptional repressors: studies on the EGR and Wilms' tumor (WT1) gene products. *Adv Exp. Med. Biol*. 1993. 348:23-29.
 14. Englert, C, Maheswaran, S, Garvin, AJ, Kreidberg J, Haber DA. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res*.1997.57: 1429-1434.
 15. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem*. 1997.272:19609-19614.
 16. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher F.J III, Saunders GF, Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res*.1995. 55: 5386-5389.
 17. Maheswaran, S., Park, S., Bernard, A., Morris, J. F., Rauscher, F. J., Hill, D. E., and Haber, D. A. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.1993. 90:5100-5104.
 18. Maheswaran S, Englert C, Bennet P, Heinrich G, Haber DA. The WT-1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev*.1995. 9:2143-2156.
 19. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*.1999. 13:393-399.
 20. Beckwith JB, Kiviat, N and Bonadio, JF Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr. Pathol*. 1990. 10:1-36.
 21. Bruening W, Moffett P, Chia S, Heinrich G, Pelletier J. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett*. 1996. 393:41-47.
 22. Bergmann L, Miething C, Maurer U, et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. 1997. 90:1217-1225.
 23. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*.1994.84:3071-3079.
 24. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood*.1998 15;91(8):2969-76.
 25. Menssen HD, Renkl H-J, Rodeck U, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*.1995.9:1060-1067.
 26. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. Expression of the candidate Wilms' tumor gene, Wt-1, in human leukemia cells. *Leukemia*.1993. 7:970-977.
 27. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, et al. A. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*.1997.11:639-643
 28. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res*.2001. 61:921-925.
 29. Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Invest* 1993

- 11:393-399
30. Lee TH, Pelletier J. Functional characterization of WT1 binding sites within the human vitamin D receptor gene promoter. *Physiol Genomics*. 2001. 7:187-200.
 31. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT Jr, Daniel CW Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*. 1997. 94:8135:8137.
 32. Zapata-Benavides P, Tuna M, López-Berestein G, Tari AM. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2002 295:784-790
 33. Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H, Noguchi S. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2002.8:1167-1171.