

CICLE CEL·LULAR I CÀNCER

NEUS AGELL, ROSA ALIGUÉ I ORIOL BACHS

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Universitat de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. 08036 Barcelona.

RESUM

La proliferació cel·lular està regulada per una sèrie de factors de progressió (cinases dependents de ciclins) que s'activen com a resposta als senyals proliferatius extracel·lulars. En les cèl·lules tumorals, l'activació d'aquestes cinases està desregulada de tal manera que proliferen independentment dels senyals externs. A més, les cèl·lules tenen uns mecanismes de vigilància o *check-points* que controlen la fidelitat de la duplicació del material genètic i la seva distribució en les cèl·lules filles durant el cicle cel·lular. Les cèl·lules tumorals també tenen alteracions en aquests sistemes de vigilància, de manera que presenten una elevada inestabilitat genètica.

SUMMARY

Cellular proliferation is regulated by progression factors (cyclin-dependent kinases) that are activated in response to extracellular proliferative signals. In tumoral cells activation of these kinases is deregulated and as a consequence they proliferate independently of the extracellular signals. Furthermore, during cell cycle check-points are activated that control the fidelity of DNA replication and its segregation in the two daughter cells. Tumoral cells have also alterations in those check-points leading to a genetic instability.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules d'un organisme pluricel·lular adult es poden trobar en un estat no proliferatiu (quiescent o fase G0), o poden estar proliferant. La proliferació cel·lular té lloc mitjançant una sèrie de processos que se succeeixen en allò que anomenem *cicle cel·lular*. Durant el cicle cel·lular les cèl·lules creixen, dupliquen el material genètic i, després, es divideixen donant lloc a dues cèl·lules filles que contenen teòricament el mateix contingut genètic que la cèl·lula mare. El cicle cel·lular es divideix en quatre fases: 1) fase G1, en què la cèl·lula rep i interpreta una gran part dels senyals del seu entorn, creix i inicia la programació del cicle cel·lular; 2) fase S, en què la cèl·lula replica el DNA; 3) fase G2, o de preparació per a la mitosi, i 4) fase M o mitosi, en què la cèl·lula reparteix el material genètic duplicat i la resta del contingut cel·lular entre les dues cèl·lules filles.

En un organisme pluricel·lular, la decisió que ha de prendre una cèl·lula en sortir de quiescència i entrar en cicle cel·lular, o viceversa, és un procés sotmès a una regulació molt precisa i que respon a una gran diversitat de senyals externs (de *control social*) que es transmeten gràcies a factors de creixement, hormones, citocines, a la interacció cèl·lula-cèl·lula i a les interaccions cèl·lula-matriu extracel·lular (Assoian, 1997; Pardee, 1989; Wu *et al.*, 1996). Aquests senyals externs, gràcies als sistemes de transducció de senyals, convergeixen en els anomenats *factors promotors del cicle cel·lular*, que s'encarreguen d'activar i regular la progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular. La integració d'aquests senyals externs té lloc durant la fase G1 del cicle cel·lular, de manera que és durant aquesta

fase que la cèl·lula pren la decisió de sortir a quiescència, diferenciar-se o continuar en cicle i proliferar. Un cop passat el punt de restricció de la fase G1, la cèl·lula queda compromesa a continuar el cicle cel·lular i a donar dues cèl·lules filles de manera independent dels senyals externs. En els últims anys s'ha avançat molt en el coneixement, la regulació i la funció d'aquests factors. La gran majoria dels factors de progressió són cinases dependents de ciclins anomenades CDKS – *cyclin-dependent-kinases* – (Sherr, 1994; Morgan, 1997).

D'altra banda, les cèl·lules eucariotes han desenvolupat uns mecanismes de vigilància intracel·lular o *check-points* que controlen que els diferents processos del cicle cel·lular tinguin lloc correctament. Els mecanismes de vigilància recullen informació intracel·lular i, a través d'un sistema de transducció de senyals, l'envien als factors promotors del cicle cel·lular. Si els diferents processos del cicle cel·lular no es produeixen correctament, aquest s'atura a corregir els defectes i en el cas que no es puguin corregir es dispara un procés que conduirà a l'apoptosi. Els mecanismes de vigilància asseguren, doncs, que la replicació del material genètic i la repartició a les dues cèl·lules filles tingui lloc correctament, i per tant són essencials per a mantenir la integritat del genoma (Hartwell, 1992; Elledge, 1996). D'una banda, els mecanismes de vigilància asseguren també que es produeixi una alternança correcta entre les fases del cicle cel·lular de manera que, per exemple, no es repliqui dues vegades el genoma sense passar per una mitosi (Hartwell i Weinert, 1997; Nasmyth, 1996). En cèl·lules tumorals, la regulació per senyals externs i els mecanismes de vigilància es troben alterats.

REGULACIÓ DE LA PROGRESSIÓ I MECANISMES DE VIGILÀNCIA DEL CICLE CEL·LULAR

Cinases dependents de ciclins: funcions i regulació

La progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular està regulada per una sèrie de cinases que van actuant de manera relativament seqüencial. Aquestes cinases estan formades per una subunitat catalítica d'expressió constant i una subunitat reguladora que apareix en moments específics del cicle cel·lular i que s'anomena *ciclina*. La unió de la subunitat reguladora a la catalítica és imprescindible per a la seva activitat i

per això s'anomenen *cinases dependents de ciclins*. Durant la fase G1, es formen i s'activen els complexos CDK4-6/ciclina D i CDK2/ciclina E; durant la fase S, en el complex CDK2/ciclina A; al final del G2, la CDK1 (CDC2)/ciclina A, i seguidament en entrar a la mitosi fins a la metafase, el complex CDC2/ciclina B (figura 1). La inactivació d'aquesta última cinasa reprograma la cèl·lula per a començar un nou cicle cel·lular (Sherr, 1994; Morgan, 1997).

La funció i els substrats de cada una d'aquestes cinases en les diferents fases del cicle cel·lular han estat objecte de nombrosos estudis en els darrers anys. Les cinases del G1, CDK4-6/ciclina D i CDK2/ciclina E, tenen com a funció coneguda la fosforilació de

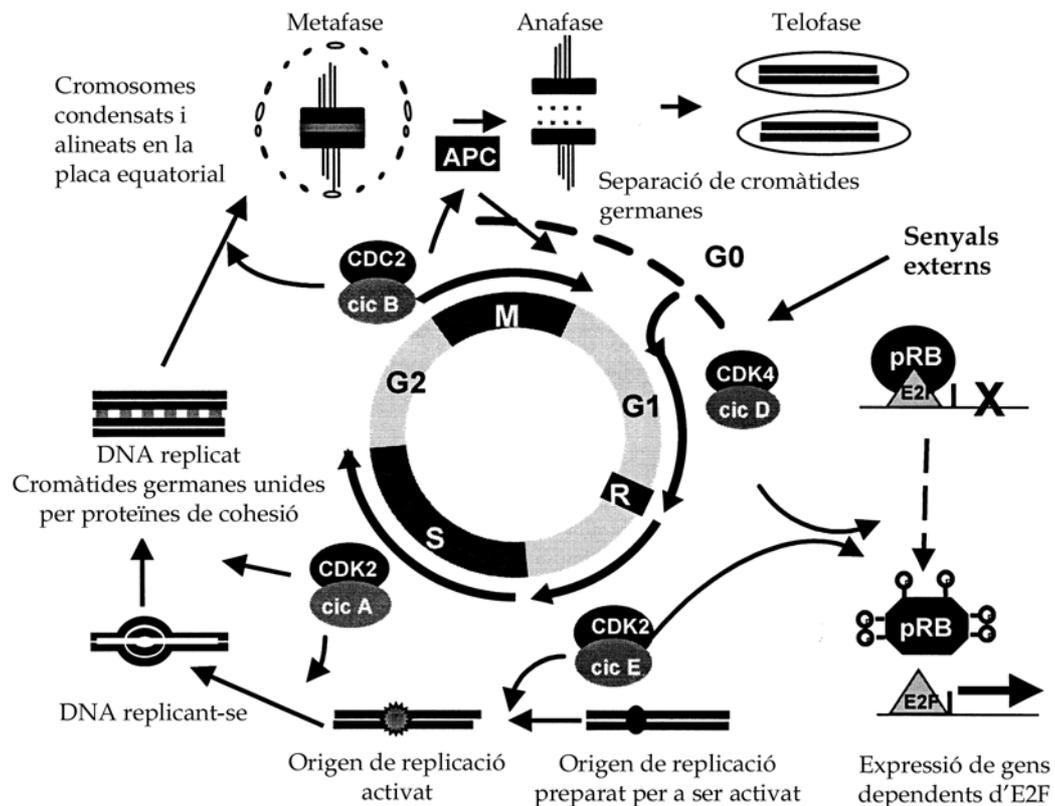


FIGURA 1. Esquema de la funció de les CDKS en les diferents fases del cicle cel·lular.

la proteïna del retinoblastoma (pRb) (Lundberg i Weinberg, 1998). Els llocs de fosforilació per aquestes cinases són diferents (Harbour *et al.*, 1999). La fosforilació per CDK4 sembla no ser essencial per a la progressió del cicle, mentre que la fosforilació per CDK2 és imprescindible. La pRb en forma hipofosforilada segresta proteïnes, entre aquestes, factors de transcripció de la família de l'E2F. La fosforilació de pRb per part de les cinases del G1 permet l'alliberament d'aquests factors de transcripció que són importants per a l'expressió de gens de fase S. Entre els gens de fase S hi ha gens que codifiquen per proteïnes directament implicades en la replicació del DNA (p. ex.: PCNA, DNA polimerasa α , ribonucleòtid reductasa) o per proteïnes reguladores del cicle cel·lular (ciclina A, ciclina E, cdc2) (Grana *et al.*, 1998; Lavia i Jansen, 1999). La CDK2/ciclina E, a més de fosforilar pRb, té una altra funció essencial, que és la de participar en l'activació dels orígens de replicació del DNA, si bé els substrats clau en aquest procés no són encara del tot coneguts (Jallepalli i Kelly, 1997). L'activació d'aquests orígens de replicació ha de ser altament regulada, ja que s'ha d'aconseguir que totes les seqüències de DNA es repliquin però que ho facin tan sols un cop. La CDK2/ciclina A és imprescindible durant la fase S i se sap que continua fosforilant pRb, i segurament alguns enzims de replicació del DNA. La cdc2/ciclina B fosforila la lamina B, la histona H1, proteïnes associades a microtúbuls, i altres substrats durant la mitosi, i permet d'aquesta manera, entre d'altres, el trencament de la coberta nuclear, la condensació dels cromosomes i la formació del fus mitòtic (Morgan, 1997; Dunphy, 1999). A la vegada, l'activitat CDC2 és important per a desencadenar posteriorment la sortida de la mitosi, que té lloc gràcies a la fosforilació retardada i l'activació consegüent del complex APC (complex promotor de l'anafase).

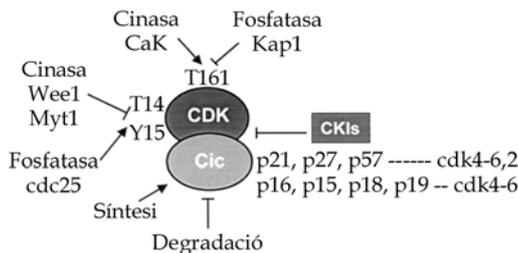
APC és una E3 lligasa d'ubiquitina que s'encarrega d'ubiquitinitzar i induir la degradació de proteïnes que impedeixen la segregació de les cromàtides germanes, i de la mateixa ciclina B. Així doncs, l'activació de l'APC per la cdc2 desencadena la separació de les cromàtides germanes (transició metafase-anafase) i la inactivació de la mateixa cdc2 i per tant la reversió de totes les fosforilacions induïdes per cdc2 – sortida de mitosi – (Nasmyth, 1999). La baixada d'activitat CDKS fa que el retinoblastoma es defosforili i la cèl·lula quedi reprogramada a G1.

La integració dels estímuls externs durant el G1, en cas de donar un senyal global proliferatiu, és el que condueix precisament a l'activació de les diverses CDKS en les diferents fases del cicle cel·lular. Atès que les CDKS han d'integrar, d'una banda, gran varietat de senyals externs durant la fase G1, i de l'altra, senyals interns provinents de l'activació dels diferents *check-points* durant tot el cicle cel·lular, la seva regulació és molt complexa (Morgan, 1997) (figura 2). Aquesta pot tenir lloc en la síntesi i degradació de les ciclins, la formació dels complexos CDK/ciclina, les fosforilacions activadores i fosforilacions inhibidores, la unió de proteïnes inhibidores (Sherr i Roberts, 1995), i la localització intracel·lular (Pines, 1999). La fosforilació activadora més coneguda correspon a la d'una treonina (treonina 160 o 161) situada a la regió (*T loop*) de la molècula que està bloquejant el centre actiu. La cinasa que fosforila aquest aminoàcid és una cinasa nuclear d'activitat constitutiva i que s'ha anomenat CAK (cinasa activadora de les CDKS). Les fosforilacions inhibidores corresponen a un residu tirosina (tirosina 15 en el cas de la cdc2), que en ser fosforilat interfereix en la transferència del fosfat al substrat i un residu treonina (treonina 14 en la cdc2) que en ser fosforilat interfereix en la unió de l'ATP. Les cinases responsables de fosforilar aquests residus són respectiva-

ment la *wee1* i la *myt1*, mentre que la fosfatasa responsable de la defosforilació i, per tant, de l'activació de les CDKS, és una fosfatasa dual anomenada *cdc25*. D'aquesta fosfatasa, hi ha tres isoformes, *cdc25A*, *cdc25B* i *cdc25C*, que actuen seqüencialment al llarg del cicle cel·lular (*cdc25A* en G1, *cdc25B* en fase S i G2 i *cdc25C* en l'entrada a mitosi) (Morgan, 1997). Les proteïnes inhibidores s'han agrupat en dues famílies, la primera família inclou les proteïnes inhibidores *Ink4* (inhibidors de CDK4-6) que s'uneixen i inhibeixen específicament a les subunitats catalítiques CDK4 i CDK6. La seva unió impedeix la unió de les ciclines D. Pertanyen a aquesta família les proteïnes *p16^{Ink4a}*, *p15^{Ink4b}*, *p18^{Ink4c}* i *p19^{Ink4d}*. La segona família anomenada *Cip/Kip*, està formada per tres membres, *p21^{Cip1}*, *p27^{Kip1}* i *p57^{Kip2}* (Sherr i Roberts, 1995). Els membres d'aquesta família poden unir-se a totes les CDKS, però sempre que estiguin formant complexos amb les ciclines corresponents. Si bé aquestes proteïnes es van considerar inhibidores de tots els complexos CDK/ciclines, hi ha actualment suficients evidències experimentals que demostren que *p21^{Cip1}* i *p27^{Kip1}* no inhibeixen CDK4/ciclina D i que fins i tot poden resultar essencials perquè s'activi, ja que afavoreixen la formació dels complexos i la seva translocació al nucli (Sherr i Roberts, 1999).

Per tal d'esbrinar com les cèl·lules tumorals proliferen independentment dels senyals externs, és molt important conèixer quins senyals externs, i a través de quins sistemes de transducció, regulen les CDKS en cèl·lules normals (Roussel, 1998) (figura 3).

Els factors de creixement, a través de l'activació de la via Ras/Raf/MEK/ERK1,2, induïxen la transcripció de la ciclina D1 (Lavoie *et al.*, 1996), i al seu torn a través de la via PI3K/PKB/GSK3 provoquen un increment de la vida mitjana de la ciclina D1 (Diehl *et al.*, 1998). Tot això provoca, doncs, un increment dels nivells de ciclina D1. L'associació de la ciclina D1 a la CDK4 i la posterior translocació al nucli d'aquests complexos és també induïda per factors mitogènics i de manera dependent de Ras (Villalonga *et al.*, 1999). La participació de Ras en aquests dos últims processos pot ser deguda, almenys en part, a l'activació de l'expressió de *p21^{Cip1}*, ja que aquesta proteïna pot ajudar a la formació dels complexos a la vegada que els proveeix un senyal NLS (Sherr i Roberts, 1999). Ja que l'activació de la via Ras/Raf/MEK/ERK1,2 en resposta a agents mitogènics és transitòria (Bottazzi *et al.*, 1999), els nivells de *p21^{Cip1}* no són, en aquestes condicions, prou alts per a inhibir els complexos CDK2/ciclina E que es puguin anar formant. Aquests complexos es formen ja a meitat de la fase G1, atès que, encara que no es coneixen les vies de transducció implicades, hi ha una expressió de ciclina E dependent de factors mitogènics i independent de fosforilació de pRb. D'altra banda, durant la fase G1 és clau la inactivació de la *p27^{Kip1}*, que es troba en nivells elevats en cèl·lules quiescents, i que per tant podria unir-se a complexos CDK2/ciclina E i inactivar-los (Sherr i Roberts, 1995). La cèl·lula aconsegueix inactivar la *p27^{Kip1}* almenys de dues maneres. La primera seria segregant-la en els complexos CDK4/ciclina D, de manera que com més complexos CDK4/ciclina D hi hagi menys *p27^{Kip1}* lliure quedarà. Així



-Assemblatge Ciclin-CDK -Localització intracel·lular

FIGURA 2. Esquema dels diferents mecanismes de regulació de les CDKS.

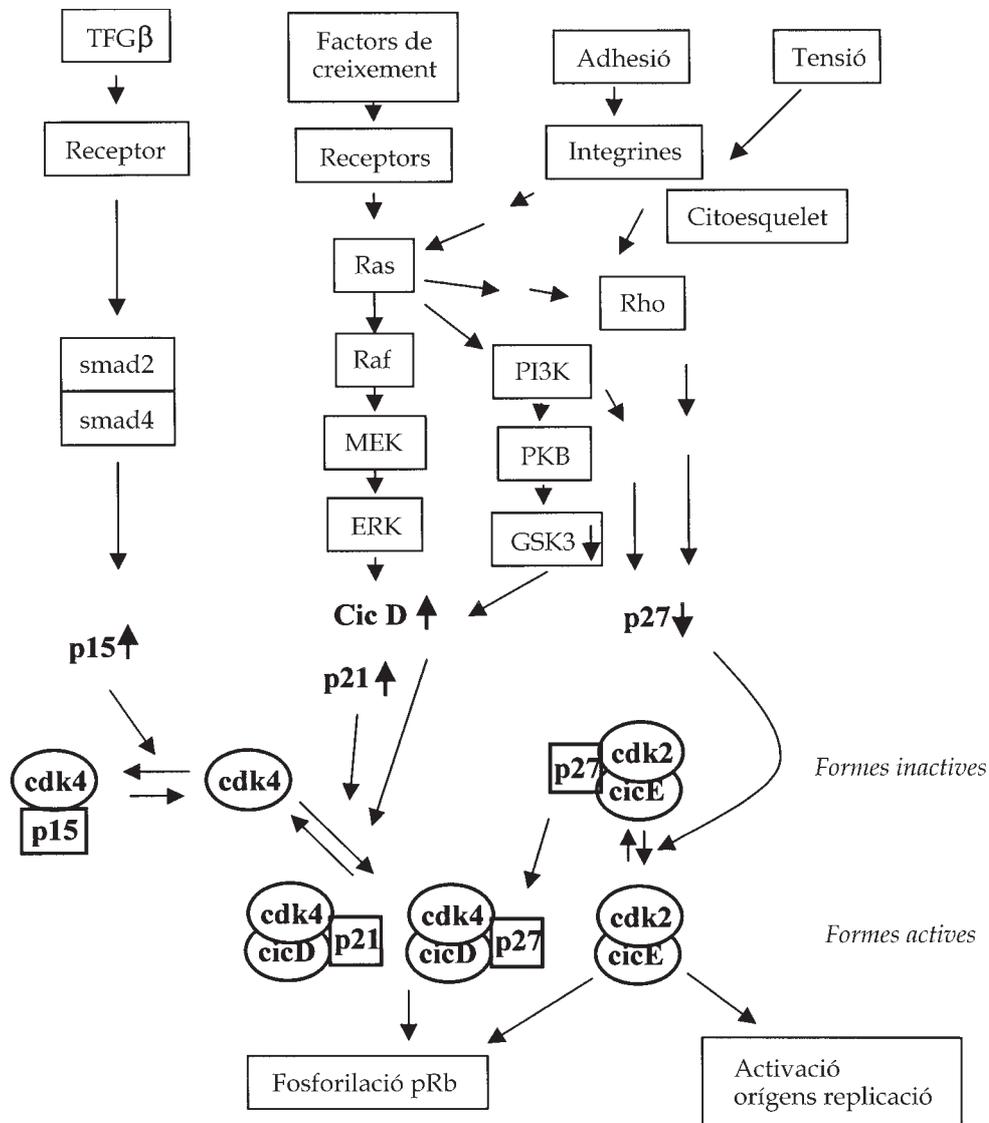


FIGURA 3. Esquema d'alguns exemples de vies de transducció de senyals que regulen l'activitat de la CDK4 i la CDK2. L'increment dels nivells de p15^{Ink4b} provoquen un desplaçament de l'equilibri dels complexos CDK4 cap a CDK4/ p15^{Ink4b}. L'activació de la ERK indueix un increment en la transcripció de la ciclina D1. La disminució de l'activitat GSK3 provoca una estabilització de la ciclina D1. L'activació de PI3K i Rho intervé en l'activació de la degradació de p27^{Kip1} i provoca un desplaçament dels complexos CDK2 cap a CDK2/ciclina E lliures de p27^{Kip1}.

doncs, CDK4/ciclina D té una segona funció durant el G1, a part de la de fosforilar el pRb, la de segrestar p27^{Kip1} i permetre l'activació de CDK2/ciclina E. Aquesta funció seria in-

dependent de l'activitat catalítica cinasa (Sherr i Roberts, 1999). Els factors mitogènics que indueixen un increment de ciclina D1 en conseqüència també estan col·laborant de

manera indirecta a l'activació de CDK2/ciclina E. La segona manera d'inactivar p27^{Kip1} és per degradació. La proteïna p27^{Kip1} és degradada pel proteasoma i de manera dependent d'ubiquitina. Per tal que sigui reconeguda pel sistema d'ubiquitinació, ha de ser primer fosforilada per la CDK2/ciclina E (Montagnoli *et al.*, 1999). Així doncs, això funcionaria com un *loop* positiu d'activació de la mateixa CDK2/ciclina E. A més, l'expressió d'un dels components de l'enzim E3 lligasa encarregat d'ubiquitinitzar la p27^{Kip1} és dependent de factors mitogènics (Carrano *et al.*, 1999). Com hem esmentat abans, la cèl·lula no tan sols necessita factors mitogènics solubles per a proliferar, sinó també l'adhesió a la matriu extracel·lular, de tal manera que cèl·lules normals en suspensió queden aturades en G1. Com es tradueix l'adhesió en l'activació de la maquinària de cicle cel·lular? Sabem que l'activació de les integrines per la matriu extracel·lular provoca una activació de les ERK i de la PI3K, i per tant col·laborarà a produir un increment de ciclina D1 (Assoian, 1997). A la vegada, l'activació de les integrines provoca una activació de la *small-GTPasa*, anomenada Rho, que s'ha vist implicada en l'activació de la degradació de la p27^{Kip1}. Molt recentment s'ha proposat també que canvis de tensió en els teixits de què formen part les cèl·lules es poden traduir en canvis en la forma cel·lular i en la tensió del citoesquelet que activarien també Rho i col·laborarien en la degradació de p27^{Kip1} (Huang i Ingber, 1999). D'altra banda, les cèl·lules responen no tan sols a senyals mitogènics sinó també a senyals antimitogènics. Així, per exemple, el TGFβ (*transforming growth factor β*) té un efecte negatiu sobre la proliferació perquè activa l'expressió de p15^{Inkb}. Aquesta proteïna s'uneix a CDK4 i impedeix que formi complexos amb ciclina D1. En conseqüència, la CDK4 queda inactivada com a cinasa a la vegada que no pot segrestar p27^{Kip1}, i queda prou p27^{Kip1} lliure per

a unir-se i inhibir la CDK2/ciclina E (Massagué, 1998). Hem vist així diferents exemples de com els senyals externs acaben convergent gràcies a diversos sistemes de transducció de senyals en la maquinària de progressió del cicle cel·lular, especialment de la fase G1. Tal com es veurà posteriorment, alteracions en aquests sistemes de transducció del senyal o en la mateixa maquinària del cicle cel·lular faran que aquest funcioni de manera independent dels senyals externs i, per tant, que les cèl·lules puguin adquirir característiques tumorals.

Mecanismes de vigilància o *check-points*

Les cèl·lules eucariotes han desenvolupat *check-points* o mecanismes de vigilància intracel·lulars que controlen que els diferents processos del cicle cel·lular tinguin lloc correctament (Hartwell i Weinert, 1997; Elledge, 1996). S'han descrit diversos mecanismes de vigilància: 1) *de dany al DNA*, les cèl·lules no repliquen el DNA o no entren en mitosi si el DNA està danyat; 2) *de replicació del DNA*, la cèl·lula no entra en mitosi si el DNA no està del tot replicat; 3) *de fus mitòtic*, la cèl·lula no surt de mitosi si el fus mitòtic no és correcte.

Actualment, es coneixen bastants gens implicats en els sistemes de vigilància els quals es troben conservats en la majoria de les cèl·lules eucariotes que s'han analitzat. Les funcions d'aquests gens i de les proteïnes corresponents s'han deduït inicialment a partir d'estudis realitzats amb mutants de llevat, tant de *Saccharomyces cerevisiae* com de *Schizosaccharomyces pombe*. Per tant, malgrat que ens referirem als gens humans implicats en els sistemes de vigilància, en ocasions indicarem els gens homòlegs de llevat per tal de descriure evidències funcionals.

Els components dels sistemes de vigilància es poden agrupar dintre de tres tipus: *sensors*, implicats en la detecció del dany al

DNA, de defectes en la replicació del DNA o d'anomalies del fus mitòtic; *transductors del senyal*, formats principalment per cinases que segons l'anomalia detectada activen diferents vies, i *efectors*, que són els substrats finals dels sistemes de vigilància, generalment són components reguladors del cicle cel·lular i tenen com a funció aturar el cicle cel·lular en resposta a les diverses anomalies. Com a efectors també s'inclouen els components que participen en la reparació del DNA i en l'apoptosi.

Check-point de resposta al dany al DNA durant la fase G1

Les proteïnes sensores d'aquests danys sembla ser que reconeixen DNA de cadena senzilla i/o talls en el DNA (Weinert, 1998). En llevat, la principal proteïna sensora d'aquest dany és la Rad1. En mamífers el gen *Rad1* dona lloc, a causa de l'*splicing* alternatiu, a dues proteïnes, Rad1A i Rad1B. La Rad1A presenta un domini N-terminal amb activitat exonucleasa i un domini C-terminal associat a la funció de reconeixement d'anomalies al DNA. La Rad1B, com es veurà després, és un sensor dels defectes en la replicació (Parker *et al.*, 1998).

Les proteïnes sensores activen diferents vies transductores del senyal. Si bé el mecanisme d'aquesta activació encara no es coneix, hi ha evidències experimentals que demostren que les proteïnes sensores són necessàries per tal que es doni la unió entre proteïnes de la via transductora (Paciotti *et al.*, 1998). Dins d'aquests grups de proteïnes transductores, trobem les de la família ATM: ATM, ATR, DNA-PK, i les proteïnes d'activació dependent d'ATM com p53 i c-Abl.

El gen *ATM* va ser identificat el 1995 com el gen mutat en la malaltia recessiva ataxia-telangiectasia (AT) i va ser anomenat ATM (AT mutat) (Savitsky *et al.*, 1995). Els pacients amb AT presenten un espectre ampli

de defectes, com ara degeneració neuronal, alta freqüència de limfomes, leucèmies i esterilitat. A més, també presenten una alta sensibilitat a les radiacions ionitzants, les quals indueixen trencaments a la doble cadena de DNA. El gen *ATM* presenta alta homologia amb els gens *Rad3* i *MEC1* de llevat – *S. pombe* i *S. cerevisiae*, respectivament – (Hoekstra, 1997). La proteïna ATR i la DNA-PK, cinasa dependent de DNA (Hoekstra, 1997; Wang, 1998), formen part de la família ATM per l'homologia que presenten en el domini catalític carboxi-terminal. Aquest domini està relacionat amb la PI3K (Savitsky *et al.*, 1995). Pacients amb AT presenten mutacions puntuals, truncaments o canvis de pauta de lectura que eliminen la funció PI3K del domini carboxi-terminal de la proteïna. La funció principal de la família ATM implica la fosforilació mediada pel domini PI3K de diferents substrats per tal d'activar la via de senyalització de dany al DNA. Malgrat l'homologia de seqüència i l'activitat cinasa del domini carboxi-terminal, hi ha diferències quant al paper dels components de la família ATM *in vivo*. Tal com hem descrit, la funció d'ATM s'associa principalment a una resposta a dany al DNA provocada per radiació ionitzant. D'altra banda, DNA-PK té un paper essencial en la reparació de trencaments de doble cadena de DNA (Wang, 1998; Blunt *et al.*, 1995). Respecte a ATR es creu que pot tenir un paper en la resposta a dany al DNA causat pels raigs UV (Wright *et al.*, 1998).

La família de cinases ATM regulen altres proteïnes, de les quals una de les més conegudes és la proteïna supressora de tumors p53 (Wang, 1998). L'activació de p53 és deguda a un increment del nivells de proteïna a través de la seva estabilització. Resultats recents suggereixen que l'activació de p53 induïda per radiació ionitzant i dependent d'ATM es dona a través de fosforilació de la ser15 de p53 (Shieh *et al.*,

1997) i es correlaciona amb la disrupció de la interacció de la p53 amb mdm2, un regulador negatiu de p53. El regulador mdm2 inhibeix la funció de p53 a través de dos mecanismes: primer, inhibint la funció transactivadora de p53 i, segon, regulant la degradació de p53 (Wang, 1998). El trencament de la interacció p53-mdm2 a través de la fosforilació de la ser15 porta, per tant, a l'activació i l'estabilització de p53. ATM no és l'únic activador de la p53, ja que, l'acumulació i l'activació de p53 a través de UV està intacta en cèl·lules ATM^{-/-}. L'exposició a UV també induïx la fosforilació de la ser15 de p53 (Shieh *et al.*, 1997). Actualment no se sap si la fosforilació de la ser15 de p53

induïda per UV o radiació ionitzant es dona a través de diferents vies.

L'activació de p53 augmenta l'expressió de la proteïna p21^{Cip1}, la qual s'uneix i inhibeix el complex CDK2-ciclina E i dona com a resultat un bloqueig en fase G1 del cicle cel·lular. D'altra banda, en resposta a dany al DNA, p53 també activa l'expressió de GADD45. Aquesta s'uneix al PCNA i a p21^{Cip1}, proteïnes importants per a la replicació del DNA i el creixement cel·lular. GADD45 estimula la reparació per escissió *in vitro* i inhibeix l'entrada de les cèl·lules a la fase S (Smith *et al.*, 1996). Per tant, malgrat que no es coneix en detall com intervé GADD45, es considera un enllaç entre el sis-

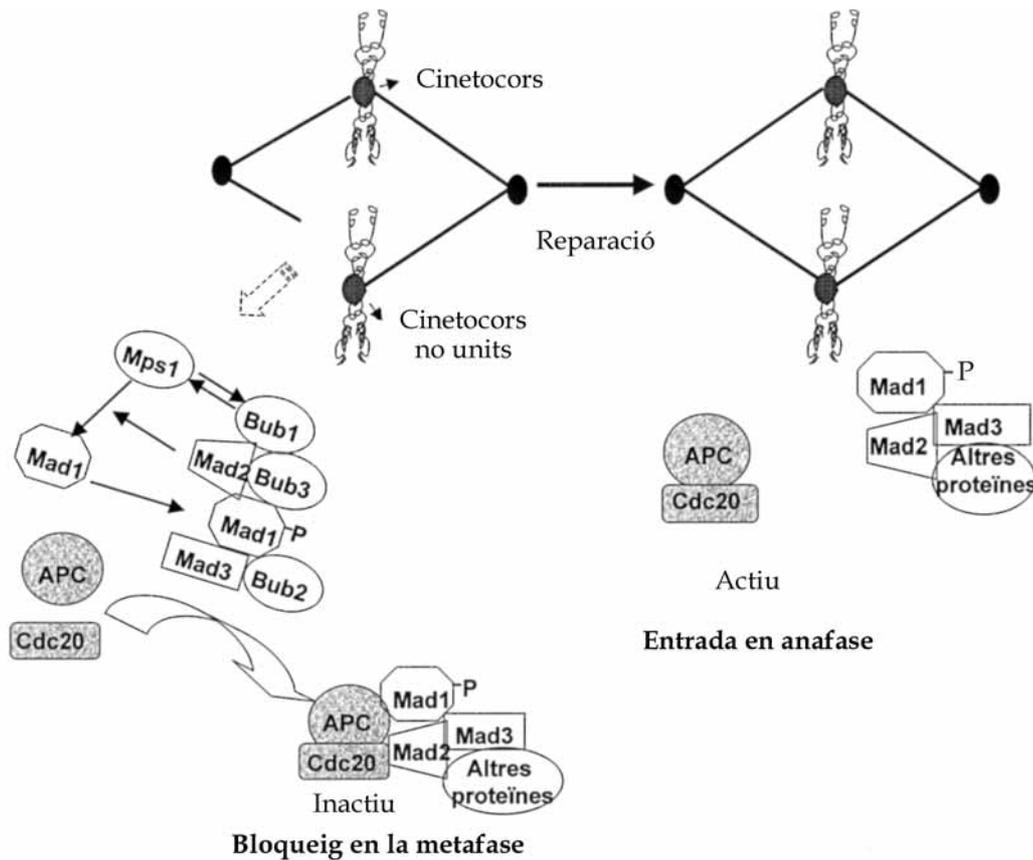


FIGURA 4. Esquema de les funcions p53 en el *check-point* de dany al DNA en les fases G1 i G2 del cicle cel·lular.

tema de vigilància de dany a DNA dependent de p53 i la reparació del DNA durant la fase G1 (figura 4). L'activitat cinasa de c-Abl s'incrementa quan les cèl·lules són exposades a radiació ionitzant o a metilmetà-sulfonat (MMS). Contràriament la c-Abl no s'activa en resposta a radiació UV. L'activació de c-Abl per radiació ionitzant és dependent de la funció d'ATM, ja que en cèl·lules deficientes en ATM, c-Abl no s'activa. Diverses observacions han suggerit que ATM fosforila directament c-Abl activant-ne l'activitat tirosina cinasa (Wang, 1998).

Check-point de resposta al dany al DNA durant les fases S i G2 i a defectes de replicació del DNA

La transició G2/M és inhibida a través de l'activació de dos mecanismes de vigilància: el que detecta els defectes de replicació o dany al DNA durant la fase S, i el que detecta el dany al DNA durant la fase G2. En el llevat s'ha implicat la DNA polimerasa α i el factor de replicació RF5 com a principals sensors de defectes en la replicació del DNA, i la proteïna DBP11 com a sensora de dany al DNA durant la fase S (Elledge, 1996). En mamífers, en canvi, no hi ha evidències que la DNA polimerasa α i RFC (homòleg de RF5), siguin sensors del sistema de vigilància. La rad1B, la segona forma d'*splicing* del gen *Rad1* de mamífers, sí que s'ha implicat com a sensor de defectes de replicació (Parker *et al.*, 1998).

Moltes de les molècules transductores del senyal que s'activen quan es produeix dany al DNA (ATM, p53, p21^{Cip1}, GADD45) actuen tant en la fase G1 com en la fase G2 inhibint proteïnes reguladores del cicle cel·lular diferents i específiques de cadascuna de les dues fases. Per exemple, p53 activa l'expressió de la proteïna 14-3-3 σ , la qual actua inhibint la progressió G2/M en unir-se a la cinasa mitòtica cdc2 i transportar-la fora del

nucli, i queda inaccessible als seus substrats (Chan *et al.*, 1999). GADD45 també actua en el mecanisme de vigilància que bloqueja la transició G2/M en resposta a dany al DNA provocat per raigs UV o agents genotòxics com el MMS, però no és necessari si el dany es provoca per radiació ionitzant. El bloqueig de la transició G2/M induïda per GADD45 quan es provoca dany al DNA durant la fase G2 és dependent de p53 (Wang *et al.*, 1999). GADD45 inhibeix l'activitat del complex CDC2-ciclina B en unir-se específicament a la cinasa cdc2 i provocar la dissociació del complex (Zhan *et al.*, 1999) (figura 4).

Hem d'assenyalar que malgrat que aquestes vies transductores mencionades són importants perquè es troben alterades en cèl·lules tumorals, com es descriu en l'apartat següent, no són les úniques vies. La transició G2/M està també regulada per vies de transducció que s'activen pels mecanismes de vigilància que detecten específicament anomalies de la fase S i la fase G2 (figura 5). Aquests mecanismes es van identificar inicialment en llevat, però tant les proteïnes transductores del senyal com les efectores es troben molt conservades en cèl·lules humanes. El principal component d'aquesta via transductora és la proteïna Chk1 (Rhind i Russell, 1998). Chk1 és una serina/treonina cinasa que és fosforilada i s'activa en resposta a raigs UV, radiació ionitzant o agents genotòxics com el MMS. L'activació de Chk1 és complementària a la resposta de dany al DNA d'ATM i p53. La cinasa Chk1 atura l'entrada en mitosi inhibint l'activitat de la cinasa mitòtica CDC2. En resposta a radiació ionitzant, Chk1 fosforila la ser216 de la cdc25C (Sánchez *et al.*, 1997; Furnari *et al.*, 1997). Aquesta fosforilació és necessària per a la resposta del sistema de vigilància quan es produeix dany al DNA, ja que la sobreexpressió de la cdc25C amb la ser216 mutada a alanina anul·la el bloqueig en fase G2. La fosforilació de la

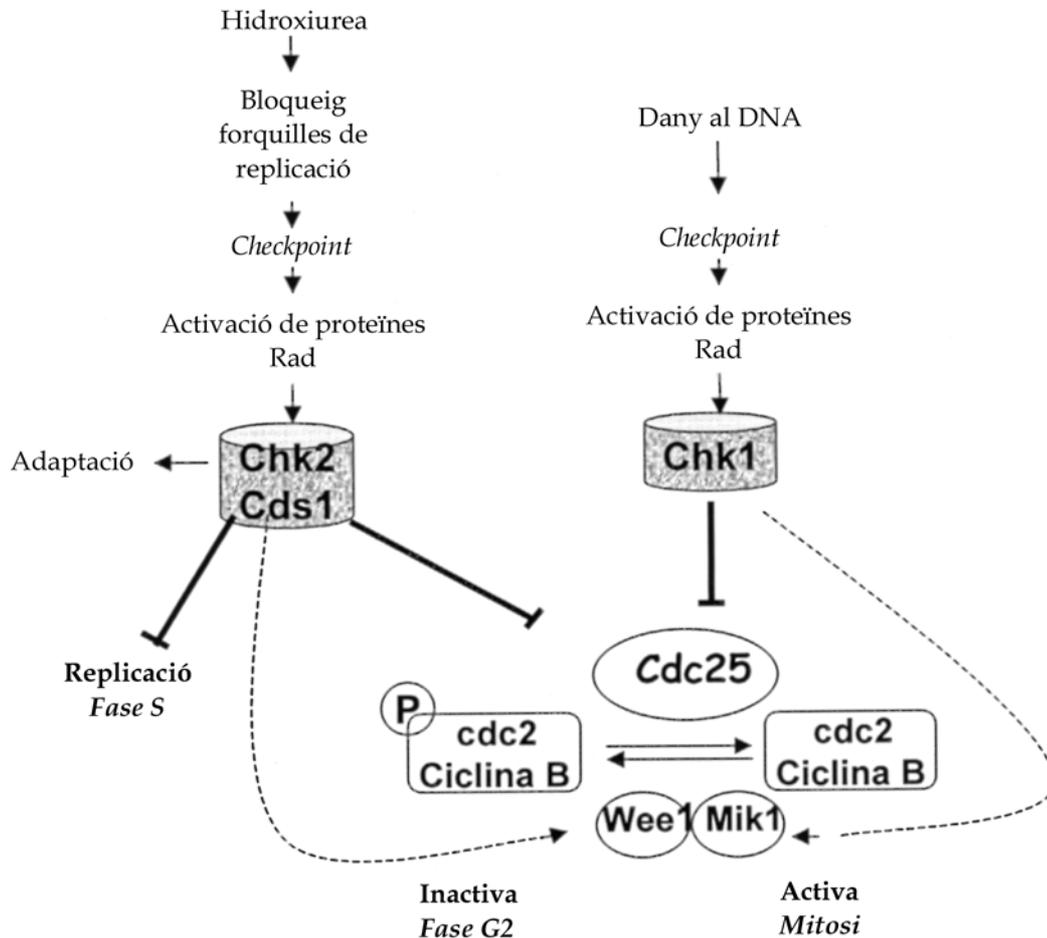


FIGURA 5. Esquema de la regulació de la transició G2/M per Chk1 i Chk2 en resposta a l'activació dels *check-points* de dany al DNA i de defectes en la replicació del DNA.

ser216 deguda a la cinasa Chk1 no varia l'activitat fosfatasa de la cdc25C, i aquesta fosforilació genera la formació d'un fosfoepítotop que indueix la unió de la proteïna adaptadora 14-3-3 (diferent a la 14-3-3σ que s'indueix per p53). Aquesta unió provoca la sortida del nucli de la cdc25C i com a conseqüència la inactivació de la cinasa cdc2 i el bloqueig en fase G2 (López *et al.*, 1999).

En el llevat, el mecanisme de vigilància que detecta els defectes de replicació o el dany al DNA durant la fase S i actua bloquejant l'entrada en mitosi, està principalment regulat per l'activació de la cinasa Cds1 i la inactivació del complex cdc2-ciclina B a través de la fosforilació de cdc2 (Zeng *et al.*, 1998; Rhind i Russell, 1998) (figura 5). Inicialment es va proposar que Cds1 regulava positivament l'activitat de les cinases Wee1 i Mik1, les quals actuen fosforilant la tyr15 de cdc2. No obstant això, també s'ha observat que Cds1 regula la fosfatasa cdc25 a través de la mateixa fosforilació que Chk1 (Rhind i Russell, 1998). L'homòleg humà de Cds1,

està principalment regulat per l'activació de la cinasa Cds1 i la inactivació del complex cdc2-ciclina B a través de la fosforilació de cdc2 (Zeng *et al.*, 1998; Rhind i Russell, 1998) (figura 5). Inicialment es va proposar que Cds1 regulava positivament l'activitat de les cinases Wee1 i Mik1, les quals actuen fosforilant la tyr15 de cdc2. No obstant això, també s'ha observat que Cds1 regula la fosfatasa cdc25 a través de la mateixa fosforilació que Chk1 (Rhind i Russell, 1998). L'homòleg humà de Cds1,

també anomenat Chk2, presenta característiques més àmplies que Cds1 (Sánchez *et al.*, 1997; Blasina *et al.*, 1999). Chk2 s'activa en resposta al dany a DNA en qualsevol fase del cicle cel·lular. S'activa en tractar amb agents que provoquen defectes de replicació i dany al DNA mitjançant radiació ionitzant o raigs UV. Els estudis realitzats per tal d'esbrinar les vies d'activació de Chk2 han suggerit que Chk2 s'activa a través de dues vies, una dependent i una altra d'independent d'ATM (Matsuoka *et al.*, 1998). En cèl·lules sense ATM també s'ha observat la fosforilació i l'activació de Chk2 en resposta a dany al DNA induït per UV, però no si el dany és causat per radiació ionitzant (Matsuoka *et al.*, 1998). El substrat principal de Chk2 és la fosfatasa cdc25. Estudis *in vitro* han demostrat que Chk2 és capaç de fosforilar les diferents cdc25 que actuen en diferents fases del cicle cel·lular i que s'autofosforila (Matsuoka *et al.*, 1998). Estudis exhaustius amb la cdc25C indiquen que Chk2 fosforila el residu de ser216 igual que la cinasa Chk1 (Matsuoka *et al.*, 1998). Per tant, a

causa d'aquesta fosforilació, el complex mitòtic cdc2-cilina B queda inhibit i les cèl·lules queden bloquejades en fase G2.

Check-point activat per defectes en el fus mitòtic

A la sortida de la mitosi actua el tercer mecanisme de vigilància o *check-point* de fus mitòtic, que detecta els defectes del fus mitòtic i segregació cromosòmica, bloquejant la transició metafase-anafase. El *check-point* de fus mitòtic pot sensar una gran varietat de defectes del fus, des de la no-unió d'un sol cinetocor al fus, fins a defectes massius, induïts per la despolimerització dels microtúbuls a través de drogues com el nocodazole o la colquicina. S'han descrit dos models que generen el senyal que activa el mecanisme de vigilància quan els cinetocors no s'uneixen al fus mitòtic: l'absència de tensió als cinetocors i la presència de cinetocors no units al fus *per se*. El primer model es basa en els resultats que indiquen que la manca de tensió es tradueix en un senyal

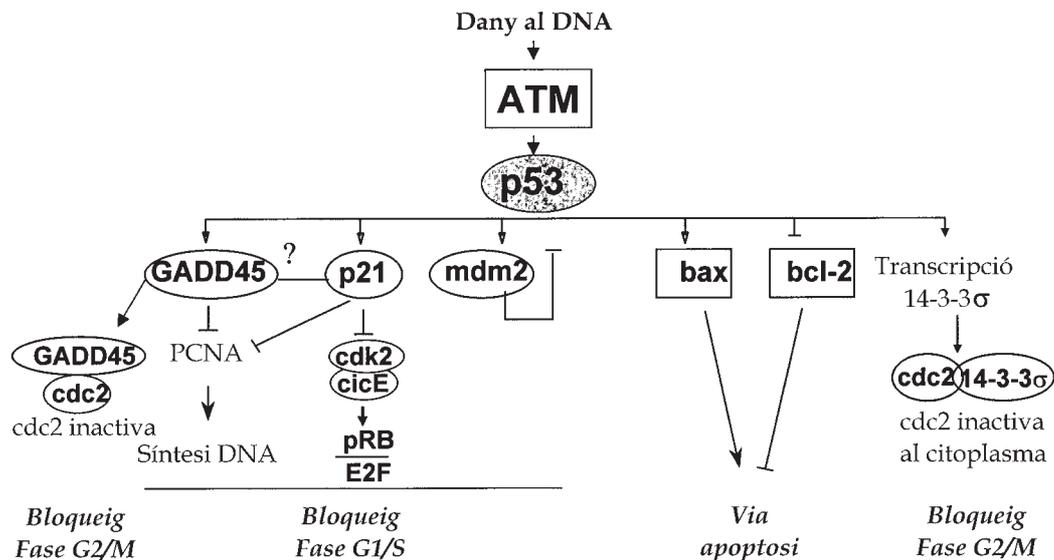


FIGURA 6. Esquema dels mecanismes de bloqueig en metafase induït per l'activació del *check-point* de fus mitòtic.

que provoca canvis en la fosforilació de components del cinetocor (reactivitat positiva a l'anticòs 3F3/2, contra un fosfoepítotp encara no identificat). Respecte al segon model, quan el cinetocor no s'uneix al fus mitòtic es troben les proteïnes Mad2 i Bub3 associades al cinetocor. Altres evidències que indiquen que els defectes en la unió dels microtúbuls als cinetocors són sensats per al mecanisme de vigilància del fus mitòtic i que el cinetocor està implicat a generar el senyal, provenen de l'anàlisi de components del cinetocor com Ndc10. Aquest és un component integral del cinetocor essencial, a diferència de Mad2 i Bub3. Cèl·lules que no tenen Ndc10 no formen cinetocors i no es bloquegen en mitosi en presència d'agents que trenquen el fus mitòtic. Aquests resultats suggerien que la formació del cinetocor és necessària per a la generació del senyal que activa el mecanisme de vigilància o per a organitzar la resposta de transducció del mecanisme (Amon, 1999).

La fosforilació de proteïnes és el mecanisme de transducció del senyal suggerit en detectar-se la desunió dels cinetocors als microtúbuls. Estudis genètics en el llevat varen identificar inicialment dues proteïnes cinaeses, Mps1 i Bub1, necessàries per al bloqueig en resposta a defectes de fus mitòtic, i Mad1, proteïna fosforilada específicament en resposta a l'activació d'aquest mecanisme de vigilància (Amon, 1999; Hardwick i Murray, 1995). Altres proteïnes implicades en la transducció del senyal són Mad2, Bub3 i cdc20 (figura 6).

Els substrats del sistema de vigilància del fus mitòtic són les proteïnes que activen la progressió i la finalització de la mitosi. Un cop els cromosomes s'han unit al fus mitòtic durant la metafase, la cèl·lula entrarà en anafase, es donarà la separació de les cromàtides germanes, i posteriorment la finalització de la mitosi. Tal com ja s'ha explicat, la transició metafase-anafase, o separació de

les cromàtides germanes, s'activa per un procés degradant mediat per la ubiquitinització per part del complex promotor de l'anafase (APC), dels reguladors de la cohesió de les cromàtides germanes (pds1/cut2). Posteriorment, APC també s'encarrega d'induir la degradació de ciclina B i permet la transició a la telofase.

Per tant, l'activació dels sistemes de vigilància del fus mitòtic ha d'inhibir aquest complex de degradació o l'accessibilitat als seus substrats per tal de parar la progressió de la mitosi. El complex APC s'activa en primer lloc per la proteïna cdc20 per tal de degradar les proteïnes pds1/cut2. Posteriorment, l'APC s'uneix a la proteïna cdh1/Hct1 per tal d'activar la degradació de la ciclina B (Fang *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). Les alteracions del fus mitòtic regulen la interacció de cdc20 amb els components del sistema de vigilància del fus mitòtic com Mad2 i APC, inhibeixen l'activitat ubiquitinitzadora del complex i provoquen un bloqueig en metafase (Amon, 1999; Fang *et al.*, 1998).

ALTERACIONS EN LA MAQUINÀRIA DE CICLE CELLULAR EN CÈL·LULES TUMORALS

Alteracions en la resposta a senyals externs

Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per la capacitat de proliferar en llocs i en moments que no són els adequats i, per tant, es considera que les cèl·lules tumorals proliferen fent cas omís dels senyals externs que regulen el cicle cel·lular. Malgrat aquesta presumpció, no hi ha estudis clars que defineixin per a cada tipus concret de cèl·lula tumoral quina sensibilitat manté respecte de tots els senyals externs. És a dir, manca definir per a cada tipus cel·lular tumoral quina

és la resposta als factors de creixement positius, als factors de creixement negatius, a l'ancoratge a la matriu extracel·lular, i a la inhibició per contacte.

No obstant això, hi ha informació abundant sobre les alteracions dels nivells d'expressió de gens implicats en el control del cycle cel·lular en cèl·lules tumorals. La major part de les alteracions de la maquinària reguladora del cycle cel·lular són d'origen genètic. S'han descrit lesions cromosòmiques (amplificacions, translocacions o delecions), o mutacions puntuals, que afecten els gens de manera que o bé no expressen les proteïnes o bé expressen proteïnes anòmales, hiperactives o inactives. També s'han descrit alteracions de l'expressió d'origen epigenètic. En aquests casos, els gens no estan afectats, però en canvi l'expressió de la proteïna està alterada. En aquest grup inclouem les alteracions produïdes per alteracions primàries d'elements reguladors que operen *up-stream* de la maquinària de cycle cel·lular i la inactivació d'algunes d'aquestes proteïnes reguladores per l'acció de proteïnes víriques.

La investigació sobre les alteracions de la maquinària reguladora del cycle cel·lular en tumors s'ha centrat especialment en la maquinària reguladora de les fases G1 i S. Això és degut al fet que són les fases més sensibles als senyals reguladors externs i, per tant, s'ha suposat que haurien d'estar preferentment afectades en els tumors. Dins d'aquestes fases del cycle cel·lular operen dues grans rutes; la ruta que regula l'activitat de pRb (p16-CDK4/6-ciclins D-pRb), que actua sobre l'expressió de gens necessaris per a la progressió del cycle cel·lular, i la ruta que regula l'activitat CDK2 (p21^{Cip1}/p27^{Kip1}-ciclins E/A-CDK2), implicades en l'inici i la progressió de la replicació del DNA. Tal com s'ha esmentat en la introducció, aquestes dues rutes tenen una certa independència, però també tenen interrelacions a dife-

rents nivells: CDK2-ciclina E igual que CDK4-ciclina D, també fosforila pRb, i el nivell de ciclina D-CDK4 segresten p27^{Kip1}, que és un inhibidor dels complexos ciclina E-CDK2.

Alteracions de l'expressió de components de la ruta p16-CDK4/6-ciclina D-pRb

Durant els últims anys s'han realitzat nombrosos estudis que analitzaven les alteracions dels components de la primera de les rutes mencionades, la de p16-CDK4/6-ciclina D-pRb. La major part d'aquests estudis s'han fet a nivell genètic i normalment comprenen sèries àmplies d'un mateix tipus de tumor i es limita a l'anàlisi d'un gen o d'un nombre molt reduït de gens. Més recentment, s'han publicat estudis dels nivells de proteïnes reguladores del cycle cel·lular en sèries no tan àmplies de tumors primaris o línies tumorals. Totes aquestes anàlisis han permès establir que la majoria de les cèl·lules tumorals, si no totes, tenen alteracions de l'expressió d'almenys un dels components d'aquesta via i per tant s'assumeix que aquesta ruta està desregulada. En els tumors humans s'han descrit alteracions de tots els components de la via, encara que en diferents proporcions, fet que indica que tots els components són susceptibles de ser alterats, encara que la rellevància de cadascuna de les alteracions en el procés onco-genètic està per determinar.

Els nivells d'expressió de pRb es troben freqüentment alterats en una gran varietat de tumors (Sellers i Kaelin-WG, 1997). La inactivació dels dos al·lells de pRb està descrita en retinoblastomes hereditaris i esporàdics i també en un nombre important d'altres tipus de tumors: carcinomes de pulmó, de vesícula biliar i de mama; osteosarcomes i glioblastomes. En altres tipus de tumors s'ha trobat alteracions en únicament un sol al·lel de pRb (leucèmia limfocítica crònica, carci-

noma hepàtic, esofàgic, d'ovari, d'endometri, de pròstata i de cap i coll, i mieloma múltiple). En canvi, hi ha una sèrie de càncers en què la presència d'alteracions de pRb és molt infreqüent: leucèmia mieloide aguda, leucèmia limfocítica aguda, carcinoma gàstric, renal, pancreàtic i colorectal. En la majoria dels casos les alteracions són genètiques, sobretot delecions i mutacions intragèniques. És interessant el fet que la proteïna E7 del virus del papiloma humà, que és capaç de produir càncer de cèrvix, s'uneix a pRb i la incapacita per a unir-se als factors de transcripció E2Fs. La proteïna E7 procedent de les soques víriques (HPV16 i 18) associades a un risc elevat de càncer de cèrvix, s'uneix més fort a pRb que les E7 elaborades per soques de baix risc (Dyson *et al.*, 1989).

L'expressió de ciclines i CDKS també s'ha trobat alterada en un nombre creixent de tumors (Hall i Peters, 1996). L'alteració més freqüent és la sobreexpressió de la ciclina D1. En pràcticament tots els casos aquesta sobreexpressió es produïda per amplifcació gènica, encara que s'han descrit casos en què la sobreexpressió és conseqüència d'una translocació. La sobreexpressió de ciclina D1 s'ha descrit en un nombre important d'adenomes de paratiroides i en el càncer de mama. També en carcinomes escamosos de cap i coll, d'esòfag i pulmó; carcinomes de fetge i vesícula, i en sarcomes. Un significat especial té la sobreexpressió trobada en els limfomes del mantell. Menys freqüentment s'han trobat amplifcacions del gen que codifica per la CDK4. Aquestes alteracions s'han descrit essencialment en glioblastomes i sarcomes. Mutacions de CDK4 que donen lloc a una CDK4 constitutivament activa s'han descrit en alguns casos de melanoma.

També s'han trobat alteracions de l'expressió d'inhibidors del cicle cel·lular. La pèrdua d'expressió de p16^{Ink4a} es troba en-

tre el 25 i el 70 % dels tumors: càncers de cap i coll, d'esòfag, de tracte biliar, de pulmó, còlon i mama; leucèmies; limfomes, i glioblastomes. En el càncer pancreàtic la freqüència arriba fins al 95 %. La transmissió hereditària d'al·lels mutants de p16^{Ink4a} dona lloc a una predisposició a l'aparició de melanomes i càncers de fetge i pàncrees. En pràcticament tots els casos l'alteració és de tipus genètic: delecio homozigòtica, delecio hemizigòtica més mutació intragènica o delecio hemizigòtica més hipermetilació del promotor (Serrano, 1997). En un nombre significatiu de melanomes i altres tipus de tumors l'inhibidor p15^{Ink4b} codelecciona amb p16^{Ink4a}. No obstant això, les alteracions de p15^{Ink4b} en absència de pèrdua de p16^{Ink4b} són infreqüents (Sellers i Kaelinwg, 1997).

Alteracions de l'expressió de components de la ruta p21^{Cip1}/p27^{Kip1}-CDK2-ciclines E/A

Estudis similars als anteriors s'han realitzat amb la finalitat d'establir si es presenten alteracions de la via p21^{Cip1}/p27^{Kip1}-CDK2-ciclines E/A en cèl·lules tumorals. Tal com passa en l'altra ruta, s'han descrit alteracions de l'expressió de tots els components d'aquesta via en freqüències diferents. Malgrat això, en aquest cas no sembla que totes les cèl·lules tumorals, ni la gran majoria, tinguin alteracions en aquesta via.

L'alteració més freqüent del gen de la ciclina E en tumors és l'amplifcació gènica. Com a conseqüència, aquests tumors sobreexpressen en molts casos la proteïna. També s'han descrit mutacions puntuals i en alguns casos s'han evidenciat mecanismes post-transcripcionals que condueixen a una acumulació de ciclina E. Entre el 13 % i el 21 % de càncers d'ovari presenten amplifcació del gen de la ciclina E. En els tumors gàstrics, el percentatge és d'un 15 %, i en els carcinomes colorectals, del 10 %. En tota una

altra sèrie de tumors s'han vist nivells alts de ciclina E quan s'analitzen per immunohistoquímica, encara que no és clar si aquests increments representen simplement alts nivells de proliferació o sobreexpressió de la proteïna (Donnellan i Chetty, 1999).

L'expressió de ciclina A també està alterada en alguns tipus de tumors, encara que la freqüència és baixa. En alguns casos és per amplificació, però s'han descrit alguns casos de translocació (Huuhtanen *et al.*, 1999).

En molts tipus de tumors s'han trobat la pèrdua d'expressió de p27^{Kip1} o la disminució dels nivells d'aquesta proteïna. En general, aquestes alteracions no són produïdes per aberracions genètiques, si no que en general són produïdes per mecanismes post-transcripcionals anòmals, concretament a una taxa elevada de la degradació de la proteïna. Aquesta disminució dels nivells de p27^{Kip1} es correlaciona força amb l'agressivitat del tumor i és un factor de mal pronòstic en els carcinomes gàstrics, de mama, de pròstata i de còlon. En altres tipus de tumors encara no es disposa d'informació fiable que permeti establir el valor pronòstic de la disminució de p27^{Kip1}. Baixos nivells de p27^{Kip1} també s'associen a les transicions de no invasiu a invasiu i de tumor localitzat a metastàtic (Tsihlias *et al.*, 1999).

També s'han trobat alteracions dels nivells de p21^{Cip1} en els tumors, encara que la freqüència és baixa. Les alteracions trobades són pèrdues d'expressió o nivells baixos de la proteïna. Semblantment al que passa amb la p27^{Kip1}, les alteracions no són de tipus genètic, si no de tipus epigenètic, però en aquest cas encara no es coneix si són alteracions que afecten la degradació de la proteïna o d'altres tipus. A diferència del que passa amb la p27^{Kip1}, el valor pronòstic de les alteracions de p21^{Cip1} en tumors no està demostrat. És interessant el fet que la proteïna E7 del virus del papiloma, implicada en

la gènesi del càncer de cèrvix, també s'uneix a la p21^{Cip1} i inhibeix la seva capacitat d'inhibició dels complexos ciclina-CDK (Tsihlias *et al.*, 1999).

Les alteracions de CDK2 són poc freqüents i essencialment s'han descrit sobreexpressions i algun tipus de mutacions puntuals.

Alteracions en els mecanismes de vigilància. Inestabilitat genètica

És ben acceptat actualment que una cèl·lula es torna cancerosa com a resultat d'acumular una sèrie de mutacions en gens que controlen la proliferació i/o la mort cel·lular. Per tant, el càncer és una malaltia hereditària de la cèl·lula. Es veu el procés de tumorogènesi com un procés d'evolució cel·lular, de manera que hi intervenen fenòmens de generació de mutacions i de selecció i expansió clonal de les cèl·lules amb més avantatges proliferatius. Però continua havent-hi controvèrsia sobre si les taxes de mutació normals són o no prou altes per tal de produir la variabilitat genètica suficient per a la producció de tumors (Hartwell, 1992; Loeb, 1999). Siguin o no suficients les taxes de mutació normals, la majoria de cèl·lules tumorals presenten una gran inestabilitat genètica (Lengauer *et al.*, 1998). S'ha de tenir en compte que *inestabilitat genètica* és un concepte dinàmic. Per tant, no vol dir tenir una gran acumulació de mutacions sinó tenir una taxa de mutació elevada, estar contínuament adquirint noves mutacions.

És clar que alteracions en els mecanismes de reparació del DNA poden donar lloc a una elevada taxa de mutació. Així és el cas d'alteracions en els sistemes de reparació d'errors de replicació del DNA o sistema MMR (*MisMatch Repair*). Individus amb alteracions en aquests gens presenten una elevada taxa de mutació puntual que es presenta tant en seqüències de DNA que codifi-

quen per a gens com en seqüències de microsatèl·lits, i per això es diu que presenten inestabilitat de microsatèl·lits. La inestabilitat en microsatèl·lits serveix d'indicador de l'increment de mutació puntual, i les cèl·lules que el presenten es diu que tenen un fenotip mutador. Precisament, diversos tipus de càncers com és el càncer colorectal hereditari tipus no-poliposi o HNPCC (*Hereditary NonPolyposis Colon Cancer*) i alguns càncers colorectals esporàdics, de carcinoma d'endometri o de sarcoma uterí, presenten aquest fenotip mutador (Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993). D'altra banda, alteracions en el sistema més general de reparació de dany al DNA, com és el de reparació per escissió de nucleòtids o NER (*Nucleotid Excision Repair*) que repara lesions en el DNA causades per llum ultraviolada o carcinògens químics, es troba alterat en els individus que tenen la malaltia *xeroderma pigmentosum* (XP). La predisposició a l'aparició de tumors de pell és més elevada en aquests pacients (Kraemer *et al.*, 1999).

A part d'aquests errors en sistemes de reparació del DNA, i ja que els *check-points* són els mecanismes de què disposa una cèl·lula per tal de controlar la fidelitat en la transmissió del seu material genètic, sembla molt probable que una part gran de la inestabilitat genètica sigui deguda a alteracions en el *check-points* del cicle cel·lular (Hartwell, 1992; Sherr, 1996; Lengauer *et al.*, 1998; Elledge, 1996). Alteracions en el *check-point* de dany al DNA produiria diferents tipus de mutacions depenent del tipus de dany al DNA produït. Podria anar des de mutacions puntuals, fins a delecions o translocacions. Alteracions en el *check-point* de no-replicació del DNA (entrada a mitosi sense acabar la replicació de DNA), podrien conduir a delecions i fins i tot a pèrdua de cromosomes sencers. Alteracions en el *check-point* de fus mitòtic podria conduir a aneuploides i poliploides. En realitat estudis de cariotip

demostran que la majoria de càncers tenen pèrdues o guanys de cromosomes (Mitelman *et al.*, 1999). A més, mitjançant estudis moleculars s'ha comprovat que la pèrdua d'heterozigosi, o sigui la pèrdua d'un dels al·lels paternals, és molt comú en tumors i està acompanyada normalment de guany de l'al·lel oposat. De mitjana els càncers de còlon, mama, pàncrees i pròstata han perdut un 25 % dels seus al·lels, i és normal en tumors la pèrdua del 50 % dels al·lels. S'ha demostrat també en alguns casos que la presència d'aneuploides no és una cosa estàtica sinó que en cultivar les cèl·lules canceroses que provenen de tumors aneuploides, les pèrdues o els guanys de cromosomes es produeixen entre 10-100 vegades més ràpid que en cèl·lules que provenen de tumors amb cariotip normal. Curiosament, queden exclosos de presentar aquesta inestabilitat cromosòmica els tumors que tenen inestabilitat de microsatèl·lits, o sigui el fenotip mutador de què parlàvem abans (Lengauer *et al.*, 1997).

El *check-point* que s'ha estudiat més en cèl·lules tumorals és el de dany al DNA. Com s'ha vist abans, molècules com ATM, p53, mdm2, p21^{Cip1} i GADD45 estan implicades en el fet induir una aturada en la fase G1 del cicle cel·lular en el cas d'haver-hi dany al DNA. D'altra banda, si el dany es detecta en G2 l'aturada s'ha de realitzar abans d'entrar en mitosi. ATM i p53 estan també implicades en aquest procés, juntament amb chk1, cdc25C, i diferents membres de la família de proteïnes 14-3-3. Moltes d'aquestes molècules s'han vist alterades en diversos tumors. Mutacions en ATM es presenten en els pacients amb el síndrome hereditari AT (Savitsky *et al.*, 1995). Els malalts d'AT presenten una incidència més elevada de tumors, en particular de limfomes. A més, delecions de la regió del cromosoma 11, on es localitza aquest gen, tenen lloc amb certa freqüència en càncers de mama, ovari,

còlon i coll uterí. L'alteració de p53 és potser el cas més emblemàtic (Levine, 1997). Es troba mutada en el 50 % de tots els tumors, si bé és un succés que normalment apareix tard en el desenvolupament del tumor en humans. Exemples de tumors que presenten freqüència elevada de mutació de p53 són els de càncer de còlon, pulmó, mama, fetge, ovari, bufeta, cervell, estómac, esòfag, sarcomes, limfomes i leucèmies. Si bé en còlon i carcinomes s'observen delecions, la majoria de les alteracions en p53 són mutacions puntuals que originen substitucions aminoacídiques. Aquestes substitucions causen alteracions en la molècula que normalment inactiven com a factor de transcripció. A la vegada els tetràmers formats entre molècules de p53 mutada i p53 normals són inactius de manera que les mutacions puntuals inactivadores de p53 acostumen a tenir un efecte dominant (Levine, 1997). La proteïna mutada, encara que inactiva, acostuma a ser molt més estable, de manera que els tumors amb p53 mutada presenten nivells elevats de p53. Les línies tumorals amb p53 mutada presenten una inestabilitat genètica incrementada, a la vegada que una major resistència als agents tòxics. Això últim és degut, segurament, a la falta d'inducció d'apoptosi (Bates i Vousden, 1996). Per últim, individus amb la malaltia hereditària Li-Fraumeni hereten un al·lel mutat de p53 i són molt més susceptibles a l'aparició de diversos tipus de càncer (Akashi i Koeffler, 1998). A part de per mutació, la funció de p53 pot ser inactivada per interacció amb oncogens virals com E6 de papilomavirus, T antígen gran de SV40 i E1B d'adenovirus (Hoppe-Seyler i Scheffner, 1999; Moran, 1993). El que s'aconsegueix amb aquesta interacció és, en realitat, inestabilitzar la proteïna p53 de manera que no s'arriba a acumular i per tant no pot fer la seva funció. Així doncs, la infecció per aquests virus podria provocar, entre d'altres, una inactiva-

ció del *check-point* de dany al DNA i per tant incrementar la inestabilitat genètica. Una altra proteïna que incrementa la degradació de p53 i per tant la inactivació del *check-point* és mdm-2, que es troba sobreexpressada en 30 % dels sarcomes i en un percentatge més baix de gliomes i altres càncers humans (Leach *et al.*, 1993). Aquesta sobreexpressió és normalment deguda a amplificació gènica. Per últim, la proteïna p19^{ARF}, codificada conjuntament amb p16^{Ink4a}, pel gen *MTS1*, pot col·laborar també en l'estabilització de p53 en bloquejar la interacció entre p53 i mdm-2 (Zhang *et al.*, 1998). Aquesta estabilització de p53 es creu que no seria, però, en resposta a dany al DNA, sinó a algun altre tipus d'alteració com, per exemple, sobreexpressió de Ras (Palmero *et al.*, 1998). En molts tumors hi ha una manca d'expressió de p19^{ARF} i el locus *MTS1* es troba mutat o deleccionat en un elevat percentatge de càncers de pàncrees i vies biliars, d'esòfag i bufeta i en famílies amb susceptibilitat hereditària a melanomes i càncers de pàncrees. Això suggereix un mal funcionament dels *check-points* i de la inducció d'apoptosi dependents de p53 en aquests tumors (Chin *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1996). Mutacions o delecions de p21^{Cip1} són poc freqüents en tumors, i això potser és degut al fet que sigui una proteïna que també té una funció activadora del cicle cel·lular i per tant la seva pèrdua no provoqui un avantatge proliferatiu clar. El que sí que s'ha observat són baixos nivells proteics de p21^{Cip1} en alguns tumors, i això molts cops està correlacionat amb alteracions en p53 (Matsushita *et al.*, 1996). En els casos en què no ho està, seria interessant d'analitzar l'existència d'alteracions en el promotor de p21^{Cip1} o en el seu sistema de degradació, de manera que, tot i tenint p53 funcional, no s'incrementen els nivells de p21 després de l'activació del *check-point* de dany al DNA.

Quant a alteracions en molècules impli-

caades en l'aturada en G2 en resposta a dany al DNA, a part de la mateixa p53, s'ha vist que chk1 està codificada per un gen localitzat en la regió cromosòmica 11q22-23, en què es troben freqüentment pèrdues d'heterozigosi en tumors humans (Flaggs *et al.*, 1997). En canvi, si bé les fosfatases cdc25A i cdc25B s'han trobat sobreexpressades en diversos tipus de tumors, no hi ha una expressió diferencial de cdc25C en teixits normals o neoplàsics (Hernández *et al.*, 1998; Gasparotto *et al.*, 1997).

Pel que fa al *check-point* de no-replicació del DNA, els elements claus no es coneixen tant, si bé es creu que hi ha molts elements comuns al de dany al DNA en G2, així doncs, les alteracions en ATM i p53 descrites abans que es troben en tumors també estarien afectant aquest *check-point*. La cinasa cdc25A o chk2 és la que funcionaria en lloc de la chk1 per tal de prevenir l'entrada a mitosi. La chk2 s'ha clonat recentment en humans, però no s'han estudiat encara possibles alteracions en cèl·lules tumorals (Matsuoka *et al.*, 1998; Blasina *et al.*, 1999).

L'últim *check-point* considerat és el del fus mitòtic; com s'ha esmentat abans, mitjançant aquest *check-point* les cèl·lules asseguren una segregació cromosòmica acurada. S'han trobat alteracions en aquest *check-point* en la majoria de càncers colorectals que tenen inestabilitat cromosòmica (Cahill *et al.*, 1998), en una proporció elevada de línies tumorals de pulmó (Takahashi *et al.*, 1999), i en alguns càncers de mama (Li i Benezra, 1996). En el cas del càncer colorectal s'ha vist una correlació entre alteració del *check-point* i inactivació del gen *hBUB1* (Cahill *et al.*, 1998), mentre que en el cas de càncer de mama s'ha observat una expressió baixa del gen *hsMAD2* (Li i Benezra, 1996). Per últim, és interessant ressaltar que, tot i que el *check-point* de fus mitòtic funcioni incorrectament, hi ha sempre una adaptació de manera que finalment les cèl·lules surten

de la mitosi sense separar les cromàtides germanes. La presència de p53 funcional és llavors important per tal d'enviar aquestes cèl·lules adaptades a apoptosi i evitar així que es generin poliploides (Lanni i Jacks, 1998; Cross *et al.*, 1995).

Significat funcional de les alteracions de la maquinària reguladora del cicle cel·lular i dels *check-points* en la gènesi de tumors

En general es creu que les alteracions de la maquinària reguladora del cicle cel·lular i les alteracions en algun dels *check-points* són fets essencials per a l'adquisició del fenotip neoplàsic. En principi, s'assumeix que les alteracions dels nivells d'algunes proteïnes de les vies p16-ciclina D-CDK4-pRb o p21/p27-ciclina E/A-CDK2 poden desregular aquestes vies i afavorir d'aquesta manera l'oncogènesi. No obstant això, hi ha una manca important de treballs que analitzin les conseqüències d'aquestes alteracions sobre el control de la proliferació de les cèl·lules tumorals. De fet, evidències recents indiquen que cèl·lules tumorals que no tenen p16^{Ink4a}, o nivells baixos de pRb, regulen l'expressió de gens dependents d'E2F d'una manera similar a les cèl·lules normals. Per tant, és molt possible que les alteracions de les proteïnes reguladores del cicle afectin essencialment la resposta de les cèl·lules als senyals externs que regulen la proliferació més que a l'expressió de gens dependents d'E2F. Hi ha treballs que indiquen que moltes cèl·lules tumorals poden presentar una proliferació independent dels senyals externs (factors de creixement, dependència de l'ancoratge a la matriu extracel·lular o inhibició per contacte). No obstant això, la connexió entre les alteracions dels nivells de proteïnes reguladores del cicle cel·lular i la proliferació independent de senyals externs encara és força desconeguda, ja que manca

analitzar sistemàticament aquesta relació en la majoria de les cèl·lules tumorals. A més, no es pot oblidar que les proteïnes reguladores del cicle cel·lular poden participar en funcions encara desconegudes que podrien tenir una implicació important en l'aparició del fenotip neoplàsic.

També està assumit que l'alteració de la funcionalitat dels *check-points* pot produir inestabilitat genètica i, com a conseqüència, afavorir la transformació neoplàstica. En alguns casos, això està ben demostrat. Per exemple, hi ha moltes evidències que indiquen que l'alteració de l'activitat de proteïnes del *check-point* de dany al DNA té repercussions importants en l'oncogènesi a través d'acumulacions d'errors genètics. El cas de les alteracions de p53 n'és un exemple ben conegut. Hi ha certes evidències que suggereixen que alteracions en el *check-point* de mitosi també poden generar anomalies en el nombre de cromosomes i, en conseqüència, inestabilitat genètica. Malgrat això, la implicació d'altres *check-points* en la gènesi d'inestabilitat genètica encara és molt desconeguda.

BIBLIOGRAFIA

- AKASHI, M.; H. P. KOEFFLER (1998). «Li-Fraumeni syndrome and the role of the p53 tumor suppressor gene in cancer susceptibility». *Clin. Obstet. Gynecol.*, núm. 41, pàg. 172-199.
- AMON, A. (1999). «The spindle checkpoint». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 9, pàg. 69-75.
- ASSOIAN, R. K. (1997). «Anchorage-dependent Cell Cycle Progression». *J. Cell. Biol.*, núm. 136, pàg. 1-4.
- BATES, S.; K. H. VOUSDEN (1996). «p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 6, pàg. 12-18.
- BLASINA, A.; W. DE IVI; M. C. LAUS; W. H. LUYTEN; A. E. PARKER; C. H. MCGOWAN (1999). «A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase». *Curr. Biol.*, núm. 9, pàg. 1-10.
- BLUNT, T.; N. J. FINNIE; G. E. TACCIOLI; G. C. SMITH; J. DEMENGEOT; T. M. GOTTLIEB; R. MIZUTA; A. J. VARGHESE; F. W. ALT; P. A. JEGGO; A. ET (1995). «Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation». *Cell*, núm. 80, pàg. 813-823.
- BOTTAZZI, M. E.; X. Y. ZHU; R. M. BOHMER; R. K. ASSOIAN (1999). «Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase». *J. Cell. Biol.*, núm. 146, pàg. 1255-1264.
- CAHILL, D. P.; C. LENGAUER; J. YU; G. J. RIGGINS; J. K. WILLSON; S. D. MARKOWITZ; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1998). «Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers». *Nature*, núm. 392, pàg. 300-303.
- CARRANO, A. C.; E. EYTAN; A. HERSHKO; M. PAGANO (1999). «SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27». *Nat. Cell. Biol.*, núm. 1, pàg. 193-199.
- CHAN, T. A.; H. HERMEKING; C. LENGAUER; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1999). «14-3-3sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage». *Nature London*, núm. 401, pàg. 616-620.
- CHIN, L.; J. POMERANTZ; R. A. DEPINHO (1998). «The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene—two products—two pathways». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 23, pàg. 291-296.
- CROSS, S. M.; C. A. SANCHEZ; C. A. MORGAN; M. K. SCHIMKE; S. RAMEL; R. L. IDZERDA; W. H. RASKIND; B. J. REID (1995). «A p53-dependent mouse spindle checkpoint». *Science*, núm. 267, pàg. 1353-1356.
- DIEHL, J. A.; M. G. CHENG; M. F. ROUSSEL; C. J. SHERR (1998). «Glycogen synthase kinase 3 beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization». *Genes Dev.*, núm. 12, pàg. 3499-3511.
- DONNELLAN, R.; R. CHETTY (1999). «Cyclin E in human cancers». *FASEB J.*, núm. 13, pàg. 773-780.
- DUNPHY, W. G. (1999). «The decision to enter mitosis». *Trends Cell. Biol.*, núm. 4, pàg. 202-207.
- DYSON, N.; P. M. HOWLEY; K. MUNGER [et al.] (1989). «The human papiloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product». *Science*, núm. 243, pàg. 934-937.
- ELLEDDGE, S. J. (1996). «Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis». *Science*, núm. 274, pàg. 1664-1672.
- FANG, G.; H. YU; M. W. KIRSCHNER (1998). «Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1». *Mol. Cell*, núm. 2, pàg. 163-171.
- (1998). «The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation». *Genes Dev.*, núm. 12, pàg. 1871-1883.
- FLAGGS, G.; A. W. PLUG; K. M. DUNKS; K. E. MUNDT; J. C. FORD; M. R. QUIGGLE; E. M. TAYLOR; C. H. WESTPHAL; T. ASHLEY; M. F. HOEKSTRA; A. M. CARR (1997).

- «Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes». *Curr. Biol.*, núm. 7, pàg. 977-986.
- FURNARI, B.; N. RHIND; P. RUSSELL (1997). «Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase [see comments]». *Science*, núm. 277, pàg. 1495-1497.
- GASPAROTTO, D.; R. MAESTRO; S. PICCININ; T. VUKOSAVLJEVIC; L. BARZAN; S. SULFARO; M. BOIOCCHI (1997). «Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers». *Cancer Res.*, núm. 57, pàg. 2366-2368.
- GRANA, X.; J. GARRIGA; X. MAYOL (1998). «Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3365-3383.
- HALL, M.; G. PETERS (1996). «Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer». *Adv. Cancer Res.*, núm. 68, pàg. 67-108.
- HARBOUR, J. W.; R. X. LUO; A. D. SANTI; A. A. POSTIGO; D. C. DEAN (1999). «CDK phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1». *Cell*, núm. 98, pàg. 859-869.
- HARDWICK, K. G.; A. W. MURRAY (1995). «Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast». *J. Cell. Biol.*, núm. 131, pàg. 709-720.
- HARTWELL, L. (1992). «Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells». *Cell*, núm. 71, pàg. 543-546.
- HARTWELL, L. H.; T. A. WEINERT (1997). «Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events». *Science*, núm. 246, pàg. 629-634.
- HERNÁNDEZ, S.; L. HERNÁNDEZ; S. BEA; M. CAZORLA; P. L. FERNÁNDEZ; A. NADAL; J. MUNTANÉ; C. MALLOFRÉ; E. MONTERRAT; A. CARDESA; E. CAMPO (1998). «cdc25 cell cycle-activating phosphatases and c-myc expression in human non-Hodgkin's lymphomas». *Cancer Res.*, núm. 58, pàg. 1762-1767.
- HOEKSTRA, M. F. (1997). «Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 7, pàg. 170-175.
- HOPPE-SEYLER, F.; M. SCHEFFNER (1999). «E6 Protein». A: TOMMASINO, M. (ed.). *Papillomaviruses in Human Cancer: The Role of E6 and E7 Oncoproteins*. Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience, Springer (Austin, Texas), pàg. 71-102.
- HUANG, S.; D. E. INGBER (1999). «The structural and mechanical complexity of cell-growth control». *Nature Cell Biology*, núm. 1, pàg. E131-E138.
- HUUHTANEN, R. L.; C. P. BLOMQUIST; T. O. BOHLING; T. A. WIKLUND; E. J. TUKIAINEN; M. VIROLAINEN; B. TRIBUKAIT; L. C. ANDERSSON (1999). «Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness». *Cancer Res.*, núm. 59, pàg. 2885-2890.
- IONOV, Y.; M. A. PEINADO; S. MALKHOSYAN; D. SHIBATA; M. PERUCHO (1993). «Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis». *Nature*, núm. 363, pàg. 558-561.
- JALLEPALLI, P. V.; T. J. KELLY (1997). «Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: a replication switch?». *Curr. Opin. Cell Biol.*, núm. 9, pàg. 358-363.
- KRAEMER, K. H.; M. M. LEE; J. SCOTTO (1999). «DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum». *Carcinogenesis*, núm. 5, pàg. 511-514.
- LANNI, J. S.; T. JACKS (1998). «Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption». *Mol. Cell Biol.*, núm. 18, pàg. 1055-1064.
- LAVIA, P.; D. P. JANSEN (1999). «E2F target genes and cell cycle checkpoint control». *Bioessays*, núm. 21, pàg. 221-230.
- LAVOIE, J. N.; G. LALLEMAIN; A. BRUNET; R. MULLER; J. POUYSSEGUR (1996). «Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44 (MAPK) and negatively by the p38/HOG (MAPK) pathway». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 20608-20616.
- LEACH, F. S.; T. TOKINO; P. MELTZER; M. BURRELL; J. D. OLINER; S. SMITH; D. E. HILL; D. SIDRANSKY; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1993). «p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas». *Cancer Res.*, núm. 53, pàg. 2231-2234.
- LENGAUER, C.; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1997). «Genetic instability in colorectal cancers». *Nature*, núm. 386, pàg. 623-627.
- (1998). «Genetic instabilities in human cancers». *Nature*, núm. 396, pàg. 643-649.
- LEVINE, A. J. (1997). «P53, the cellular gatekeeper for growth and division». *Cell*, núm. 88, pàg. 323-331.
- LI, Y.; R. BENEZRA (1996). «Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2». *Science*, núm. 274, pàg. 246-248.
- LOEB, L. A. (1999). «Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis». *Cancer Res.*, núm. 51, pàg. 3075-3079.
- LÓPEZ, G. A.; B. FURNARI; O. MONDESERT; P. RUSSELL (1999). «Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein [see comments]». *Nature*, núm. 397, pàg. 172-175.
- LUNDBERG, A. S.; R. A. WEINBERG (1998). «Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-CDK complexes». *Mol. Cell Biol.*, núm. 18, pàg. 753-761.
- MASSAGUE, J. (1998). «TGF-beta signal transduction». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 67, pàg. 753-791.

- MATSUOKA, S.; M. X. HUANG; S. J. ELLEDGE (1998). «Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase». *Science*, núm. 282, pàg. 1893-1897.
- MATSUSHITA, K.; S. KOBAYASHI; M. KATO; Y. ITOH; K. OKUYAMA; S. SAKIYAMA; K. ISONO (1996). «Reduced messenger RNA expression level of p21 CIP1 in human colorectal carcinoma tissues and its association with p53 gene mutation». *Int. J. Cancer*, núm. 69, pàg. 259-264.
- MITELMAN, F.; B. JOHANSSON; F. MERTENS (1999). *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. Nova York: Wiley-Liss. Vol. 2.
- MONTAGNOLI, A.; F. FIORE; E. EYTAN; A. C. CARRANO; G. F. DRAETTA; A. HERSHKO; M. PAGANO (1999). «Ubiquitination of p27 is regulated by CDK-dependent phosphorylation and trimeric complex formation». *Genes Dev.*, núm. 13, pàg. 1181-1189.
- MORAN, E. (1993). «Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53». *FASEB J.*, núm. 7, pàg. 880-885.
- MORGAN, D. O. (1997). «Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors». *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, núm. 13, pàg. 261-291.
- NASMYTH, K. (1996). «Viewpoint: putting the cell cycle in order». *Science*, núm. 274, pàg. 1643-1645.
- (1999). «Separating sister chromatids». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 24, pàg. 98-104.
- PACIOTTI, V.; G. LUCCHINI; P. PLEVANI; M. P. LONGHESE (1998). «Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 4199-4209.
- PALMERO, I.; C. PANTOJA; M. SERRANO (1998). «p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras [letter]». *Nature*, núm. 395, pàg. 125-126.
- PARDEE, A. B. (1989). «G1 events and regulation of cell proliferation». *Science*, núm. 246, pàg. 447-458.
- PARKER, A. E.; D. W. VAN, I.; M. C. LAUS; I. OOSTVEEN; J. YON; P. VERHASSET; W. H. LUYTEN (1998). «A human homologue of the Schizosaccharomyces pombe rad1+ checkpoint gene encodes an exonuclease». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 18332-18339.
- PINES, J. (1999). «Four-dimensional control of the cell cycle». *Nature Cell Biol.*, núm. 1, pàg. E73-E79.
- RHIND, N.; P. RUSSELL (1998). «The Schizosaccharomyces pombe S-phase checkpoint differentiates between different types of DNA damage». *Genetics*, núm. 149, pàg. 1729-1737.
- RHIND, N.; P. RUSSELL (1998). «Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in Schizosaccharomyces pombe». *Mol. Cell Biol.*, núm. 18, pàg. 3782-3787.
- ROUSSEL, M. F. (1998). «Key effectors of signal transduction and G1 progression». *Adv. Cancer Res.*, núm. 74, pàg. 1-24.
- SÁNCHEZ, Y.; C. WONG; R. S. THOMA; R. RICHMAN; Z. WU; W. H. PIWNICA; S. J. ELLEDGE (1997). «Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to CDK regulation through Cdc25 [see comments]». *Science*, núm. 277, pàg. 1497-1501.
- SAVITSKY, K.; S. A. BAR; S. GILAD; G. ROTMAN; Y. ZIV; L. VANAGAITE; D. A. TAGLE; S. SMITH; T. UZIEL; S. SFEZ; A. ET (1995). «A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase». *Science*, núm. 268, pàg. 1749-1753.
- SAVITSKY, K.; S. SFEZ; D. A. TAGLE; Y. ZIV; A. SARTIEL; F. S. COLLINS; Y. SHILOH; G. ROTMAN (1995). «The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 4, pàg. 2025-2032.
- SELLERS, W. R.; J. KAELEN-WG (1997). «Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer [see comments]». *J. Clin. Oncol.*, núm. 15, pàg. 3301-3312.
- SERRANO, M. (1997). «The tumor suppressor protein p16INK4a». *Exp. Cell Res.*, núm. 237, pàg. 7-13.
- SERRANO, M.; H. LEE; L. CHIN; C. C. CORDON; D. BEACH; R. A. DEPINHO (1996). «Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality». *Cell*, núm. 85, pàg. 27-37.
- SHERR, C. J. (1994). «G1 phase progression: cycling on cue [see comments]». *Cell*, núm. 79, pàg. 551-555.
- (1996). «Cancer cell cycles». *Science*, núm. 274, pàg. 1672-1677.
- SHERR, C. J.; J. M. ROBERTS (1999). «CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression». *Genes Dev.*, núm. 13, pàg. 1501-1512.
- SHERR, C.; J. ROBERTS (1995). «Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases». *Genes Dev.*, núm. 9, pàg. 1149-1163.
- SHIEH, S. Y.; M. IKEDA; Y. TAYA; C. PRIVES (1997). «DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2». *Cell*, núm. 91, pàg. 325-334.
- SHIRAYAMA, M.; W. ZACHARIAE; R. CIOSK; K. NASMYTH (1998). «The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in Saccharomyces cerevisiae». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 1336-1349.
- SMITH, M. L.; H. U. KONTNY; Q. ZHAN; A. SREENATH; P. M. O'CONNOR; J. FURNACE-AJ (1996). «Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin». *Oncogene*, núm. 13, pàg. 2255-2263.
- TAKAHASHI, T.; N. HARUKI; S. NOMOTO; A. MASUDA; S. SAJI; H. OSADA (1999). «Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and p55CDC, in human lung cancers». *Oncogene*, núm. 18, pàg. 4295-4300.
- THIBODEAU, S. N.; G. BREN; D. SCHAID (1993). «Microsatellite

- llite instability in cancer of the proximal colon [see comments]». *Science*, núm. 260, pàg. 816-819.
- TSIHLIAS, J.; L. KAPUSTA; J. SLINGERLAND (1999). «The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer». *Annu. Rev. Med.*, núm. 50, pàg. 401-423.
- VILLALONGA, P.; E. RIUS; O. BACHS; N. AGELL (2000). «Lys61 N-Ras is able to induce full activation and nuclear accumulation of CDK4 in NIH3T3 cells». *Oncogen*, núm. 19, pàg. 690-699.
- WANG, J. Y. (1998). «Cellular responses to DNA damage». *Curr. Opin. Cell Biol.*, núm. 10, pàg. 240-247.
- WANG, X. W.; Q. ZHAN; J. D. COURSEN; M. A. KHAN; H. U. KONTNY; L. YU; M. C. HOLLANDER; P. M. O'CONNOR; J. FORNACE-AJ; C. C. HARRIS (1999). «GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 96, pàg. 3706-3711.
- WEINERT, T. (1998). «DNA damage checkpoints update: getting molecular». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 8, pàg. 185-193.
- WRIGHT, J. A. ; K. S. KEEGAN; D. R. HERENDEEN; N. J. BENTLEY; A. M. CARR; M. F. HOEKSTRA; P. CONCANNON (1998). «Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 95, pàg. 7445-7450.
- WU, F.; S. BUCKLEY; K. C. BUI; A. YEE; H. . WU; J. LIU; D. WARBURTON (1996). «Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells». *Am. J. Physiol.*, núm. 270, pàg. L879-L888.
- ZENG, Y.; K. C. FORBES; Z. Q. WU; S. MORENO; H. PIWNICAWORMS; T. ENOCH (1998). «Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1». *Nature*, núm. 395, pàg. 507-510.
- ZHAN, Q.; M. J. ANTINORE; X. W. WANG; F. CARRIER; M. L. SMITH; C. C. HARRIS; J. FORNACE-AJ (1999). «Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45». *Oncogene*, núm. 18, pàg. 2892-2900.
- ZHANG, Y.; Y. XIONG; W. G. YARBROUGH (1998). «ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways». *Cell*, núm. 92, pàg. 725-734.