

REPRESSIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR: ANTIMITÒGENS I ANTIONCOGENS

JOAN MASSAGUÉ

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Howard Hughes Medical Institute, Nova York, EUA

Text de la conferència de la sessió inaugural del curs 1993-1994, pronunciada a la Sala Prat de la Riba del IEC el dia 11 de novembre de 1993.

La proliferació cel·lular es troba restringida no només per les limitacions en el subministrament de factors mitògens o l'activitat de llurs receptors, sinó també per l'acció dels inhibidors del creixement. En el disseny general, els sistemes implicats en promoure la inhibició del creixement cel·lular són semblants: ambdós involucren a xarxes de factors paracrins i receptors associats en el circuit del senyal de transducció. Les lesions genètiques que interrompen els senyals inhibitoris són tan significatives en llur contribució a la transformació maligna com aquestes lesions que activen oncogens. Aquesta idea està reforçada per l'estudi dels gens supressors de tumors.

GENS SUPRESSORS DE TUMORS

Freqüentment, un estat patològic, en aquest cas el càncer, aporta llum sobre un important

procés fisiològic. Els darrers cinc anys, un gran nombre de dades han conduït a la conclusió que les cèl·lules perden freqüentment informació genètica crítica durant l'evolució des de l'estat normal al maligne. La funció normal dels gens perduts és restringir el creixement cel·lular per tal de mantenir-lo normal; aquesta pèrdua allibera a les cèl·lules de les restriccions imposades per aquests gens. Per tant, s'han anomenat gens supressors de tumors.

Algunes estratègies experimentals independents han demostrat l'existència de gens supressors de tumors. Els experiments de fusió cel·lular, iniciats fa vint anys, han demostrat que híbrids creats per fusió de cèl·lules normals i tumorals freqüentment presenten un fenotip no maligne. Les cèl·lules normals semblen donar informació que normalitza el patró de creixement de llurs companyes malignes. Per implicació, la informació d'aquest creixement normalitzat o supressor de tumors es troba silenciosa o absent dins el genoma de les cèl·lules canceroses.

El tumor ocular, retinoblastoma, ha proporcionat una nova percepció dels mecanismes genètics d'aquests gens supressors. El model de 1971 de Knudson (Knudson, 1988) el qual postula que calen dues alteracions genètiques complementàries a fi de provocar el retinoblastoma, ha estat més específic degut al descobriment que ambdues còpies d'un gen normalment presents en el cromosoma 13q14, el gen del retinoblastoma (*Rb*), sofreixen mutacions que inactiven la funció Rb. D'acord amb això, per a aquest i molts altres gens supressors, es requereix una nul·lització funcional per desencadenar el sobrecreixement cel·lular tumoral.

SUPRESSIÓ DE LA MALIGNITAT

Com supprimeixen aquest gens i llurs productes la malignitat? El model més atractiu és aquell en què les proteïnes supressores de tumors actuen com a transductores de senyals que afecten la cèl·lula i provoquen l'aturada de la proliferació. Els senyals extracel·lulars són freqüentment duts a terme per sèries de factors difusibles, incloent-hi el TGF- β . La resposta cel·lular, un cessament del creixement, es pot obtenir mitjançant una aturada a un punt específic del seu cicle de creixement, per la diferenciació a l'etapa final, cèl·lula post-mitòtica, o per l'obligació de programar la mort cel·lular/apoptosi.

Les proteïnes supressores de tumors semblarien ésser parts essencials de la maquinària que capacita la cèl·lula per adquirir i processar aquests senyals anti-proliferatius i respondre apropiadament al creixement fluctuant, diferenciant-se, o morint. Quan una proteïna supressora és suprimida de la maquinària, les cèl·lules perden la seva capacitat de respondre als senyals exògens, és a dir, les ignoren i continuen una proliferació activa.

Les funcions bioquímiques de la majoria de

proteïnes supressores de tumors encara no s'entenen prou bé. Tal i com es descriu més endavant, el pRb, el producte del gen retinoblastoma, pot actuar transduint els senyals inhibitoris del creixement iniciats per la TGF- β , que determinen, a la llarga, el tancament dels gens promotors del creixement, com ara els que instrueixen la producció d'enzims per la síntesi de DNA. La deleció del pRb del circuit de senyalització de la cèl·lula pot succeir mitjançant una mutació cromosòmica del *Rb* o pel segrest del pRb per part d'una oncoproteïna vírica. Una conseqüència d'això pot ésser la pèrdua de sensibilitat del TGF- β .

INHIBIDORS DEL CREIXEMENT

La descripció sobre una xarxa complexa de senyalització que capacita la cèl·lula per rebre i processar senyals exògens d'inhibició del creixement evita un aspecte important, la natura precisa d'aquests senyals exògens. Quines substàncies bioquímiques transporten aquests senyals negatius cap a la superfície cel·lular i a través d'ella?

De fet, les cèl·lules es troben sota la influència de diferents classes d'inhibidors del creixement, que són, molts d'ells, polipèptids difusibles. Alguns, incloent-hi el TGF- β , els interferons i l'oncostatina M, poden fer decreixer la taxa del trànsit cel·lular a través del cicle proliferatiu d'una forma totalment reversible. Altres, com el factor de creixement nerviós (NGF) o el factor de creixement semblant a la insulina (IGF) poden facilitar la diferenciació cel·lular amb una sortida permanent del cicle cel·lular. Un tercer grup, com és el TNF- α , poden induir la mort cel·lular. Tanmateix altres podrien limitar el creixement cel·lular mitjançant la disminució de l'expressió o l'activitat dels mitògens o llurs receptors. Els mediadors de la inhibició pel contacte cèl·lula-cèl·lula no s'han identificat,

però ja s'han sumat a la llista. La proliferació cel·lular pot ésser inhibida fisiològicament de moltes formes.

En realitat, molts dels inhibidors són multifuncionals i llurs capacitats per reprimir el creixement cel·lular depenen, en gran part, del tipus de cèl·lula i altres variables del context on actuen. Això complica la tasca d'identificació dels components cel·lulars que transduïxen específicament els senyals antiproliferatius. Alterant el balanç de certes classes de molècules es podria afavorir la diferenciació terminal o simplement desencoratjar la proliferació cel·lular. El que es qualifiqui un factor com a inhibidor del creixement pot ésser imprecís si hom considera que fins i tot els mitògens típics, com ara l'EGF, poden inhibir la proliferació de certes cèl·lules.

RECEPTORS DE LA FAMÍLIA TGF- β

Des de fa aproximadament una dècada, el factor de transformació del creixement- β (TGF- β) ha acaparat l'atenció dels biòlegs. Durant aquest temps, s'ha trobat una gran família de polipèptids relacionats amb el TGF- β , els membres de la qual tenen un ampli repertori d'efectes sobre la proliferació cel·lular, diferenciació i organització. Aquests factors extraordinàriament adaptables actuen mitjançant mecanismes que romanen com un enigma, un fet que canviarà ara que els seus receptors han estat clonats. Encara que el sistema receptor que emergeix no és simple, i entendre el seu mecanisme d'actuació amb detall portarà un considerable esforç, les noves perspectives proporcionades per les recents troballes són dignes de comentari.

El TGF- β uneix al menys tres proteïnes de membrana distribuïdes extensament, referides als receptors de tipus I, II i III, que coexisteixen en molts tipus cel·lulars i mostren diferents

propietats bioquímiques (Segarini *et al.*, 1988; Massagué, 1992). Les activines i les proteïnes morfogenètiques d'os, que estan relacionades amb el TGF- β , també uneixen parells de proteïnes de membrana d'una mida semblant als receptors I i II del TGF- β (Mathews i Vale, 1991; Attisano *et al.*, 1992). Aquestes observacions plantegen qüestions sobre el paper funcional d'aquestes proteïnes, les possibles interaccions, llurs papers com a mediadors de les diverses respostes biològiques vers llurs lligands.

El progrés cap a la resolució d'aquestes qüestions es deu la recent clonació dels receptors de tipus II i III. Els receptors del tipus II són proteïnes transmembrana serina/treonina quinases (Massagué, 1992). Els receptors del tipus II per la TGF- β han estat identificats en mamífers (Lin *et al.*, 1992) per l'activina en mamífers (Mathews i Vale, 1991; Attisano *et al.*, 1992), *Xenopus* (Mathews *et al.*, 1992), i la proteïna morfogenètica d'os a *Caenorhabditis elegans* (Georgi *et al.*, 1990). Aquesta família també inclou el producte Daf-1 de *C. elegans* que controla el desenvolupament larvari en resposta a un lligand no identificat (Georgi *et al.*, 1990). El receptor del tipus III, també conegut com a betaglicà, és un proteoglicà ancorat a la membrana que té un nucli proteic unit al TGF- β , a més d'un domini citoplasmàtic curt amb una estructura de senyal no perceptible (Segarini i Seyedin, 1988; López-Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991).

Els receptors del tipus II poden unir lligands, lliures al medi o presentats per betaglicans, i que estan estructuralment relacionats amb els receptors tirosina-quinasa que actuen com a homodímers sobre els lligands d'unió (Ullrich i Schlessinger, 1990). Existeixen evidències que indiquen que els receptors de tipus II requereixen l'associació amb els receptors de tipus I per fer senyals. A més, els estudis amb un taulell de cèl·lules mutants que són deficients en receptors TGF- β (Laiho *et al.*, 1991) mostren que el receptor I requereix el receptor II per unir lligands,

i ambdós components del receptor són requerits per a la senyalització (Wang *et al.*, 1991). Aquestes evidències identifiquen els receptors de tipus I com a proteïnes de membrana que poden unir lligands amb una alta afinitat només en presència dels receptors de tipus II, amb els quals formen un senyal complex.

INHIBICIÓ DEL SENYAL DE CREIXEMENT

El TGF- β ocupa un lloc destacat a la llista dels coneguts inhibidors del creixement. Des de fa temps es coneguda la inhibició del creixement de les cèl·lules de molts llinatges, particularment de les cèl·lules epitelials. Altres membres de la família del TGF- β que tenen, a la majoria dels casos, poca o cap activitat inhibidòria del creixement, encara que un membre de la família, la substància inhibidòria Müllariana (MIS) induïx la regressió del primordi del tracte reproductiu femení en embrions mascles de mamífers (Behringer *et al.*, 1990). A més, un altre membre de la família, l'activina, és també inhibidòria de certes línies cel·lulars.

Diferents línies cel·lulars epitelials i mesenquimàtiques responen al TGF- β reduint la velocitat de progressió a través de la fase G1 tardana del cicle proliferatiu. Això allarga la duració del cicle que, en alguns casos, acaba en una completa aturada abans del començament de la fase S. Un candidat diana per als senyals inhibitoris del creixement del TGF- β en aquestes cèl·lules és el pRB. El TGF- β pot impedir a la cèl·lula entrar en el cicle dependent de fosforilació del pRB programada per a la fase tardana G1 (Laiho *et al.*, 1990). El TGF- β sembla actuar impedit l'activació d'una quinasa pRB específica de G1, més que estimulando una fosfatasa de pRB. Com que el cicle cel·lular dependent de fosforilació està pensat per inactivar la funció supressiva del creixement del pRB al final de la G1, és possible que el TGF- β aturi el

cicle cel·lular mitjançant la conservació del pRB en l'estat supressiu del creixement sota fosforilació.

El pRB sembla estar implicat en la mediatització de la regulació baixa de la transcripció del *c-myc* pel TGF- β en els queratinòcits. Aquest efecte és significatiu degut al fet que el *c-Myc* és necessari per a la progressió dels queratinòcits en la fase S (Pietenpol *et al.*, 1990). Aquests mecanismes basats en el pRB, tanmateix, no semblen operar en altres cèl·lules que, o bé són deficientes en la funció pRB, o bé són refractàries en la regulació transcripcional del *c-myc* pel pRB (Kim *et al.*, 1991). Clarament, el TGF- β deu inhibir el creixement cel·lular per més d'un mecanisme.

Encara es desconeix com els factors inductors de la diferenciació estimulen les cèl·lules a abandonar el cicle cel·lular i iniciar programes de diferenciació terminal. En casos com el de la miogènesi, la diferenciació pot ésser provocada *in vitro* mitjançant l'eliminació de mitògens del medi; tanmateix és possible que certs factors encara no identificats puguin iniciar activament aquest procés *in vivo*. Com a justificació, es pensa que la diferenciació miogènica durant el desenvolupament té lloc en ambients rics en mitògens, on factors addicionals serien requerits per contrarestar l'acció antidiferenciativa dels mitògens.

Altres processos diferencials són provocats o al menys intensificats per l'acció de factors com el NGF en la diferenciació neural o l'IGF en la diferenciació adipogènica. Irònicament, ambdós factors actuen mitjançant els receptors tirosina quinasa del tipus que estan implicats normalment en la inducció de la proliferació cel·lular. De la mateixa manera, el NGF no només pot actuar com a mitògen d'altres tipus cel·lulars sinó que llurs receptors estan codificats pel gen *trk*, que pot convertir-se en un potent oncogen si és alterat apropiadament (Cordon-Cardo *et al.*, 1991; Hempstead *et al.*, 1991). Una subunitat accessòria del receptor NGF està estructuralment relacionada amb proteïnes que

uneixen el TNF- α (Smith *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991). Tanmateix les subunitats senyalitzadores del receptor TNF- α encara no han estat identificades. Donat el precedent establert pel NGF, serà interessant veure si en l'acció de les cèl·lules assassines sobre el TNF- α (Perez *et al.*, 1990) intervé també un membre dels receptors de la família tirosina quinasa.

CONCLUSIONS

A part de les aproximacions d'aquests resultats mitjançant l'estudi dels inhibidors del creixement o dels gens supressors de tumors, és clar que la regulació negativa del creixement és un procés complex que implica molts components que actuen part del temps dins del context cel·lular. S'espera que la convergència d'ambdues aproximacions permetrà dirigir aquesta complexitat cap a l'estudi dels mitògens i oncogenes.

BIBLIOGRAFIA

- ATTISANO, L.; J.L. WRANA; S. CHEIFETZ; J. MASSAGUÉ (1992). *Cell*, núm. 68, pàg. 97-102.
- BEHRINGER, R.R.; R.I. CATE; G.J. FROELICK; R.D. PALMITER; R.I. BRINSTER (1990). «Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance». *Nature*, núm. 345, pàg. 167-170.
- CORDON-CARDO C.; P. TAPLEY; S. JING; V. NANDURI; E. O'ROURKE; F. LAMBALLE; K. KOVARY; R. KLEIN; K.R. JONES; L.F. REICHART; M. BARBACID (1991). «The *trk* tyrosine kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3». *Cell*, núm. 66, pàg. 173-183.
- GEORGI, L.L.; P.S. ALBERT; D.L. RIDDLE (1990). *Cell*, núm. 61, pàg. 635-645.
- HEMPSTEAD, B.L.; D. MARTIN-ZANCA; D.R. KAPLAN; L.F. PARADA; M.V. CHAO (1991). «High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* protooncogene and the low-affinity NGF receptor». *Nature*, núm. 350, pàg. 678-683.
- KIM, S.-J.; H.-D. LEE; P.D. ROBBINS; K. BUSAM; M.B. SPORN; A.B. ROBERTS (1991). «Regulation of transforming growth factor β gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 3052-3056.
- KNUDSON, A.G. (1988). «Statistical study of retinoblastoma». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 68, pàg. 820-823.
- LAIHO, M.; F.M.B. WEIS; F.T. BOYD; R.A. IGNOTZ; J. MASSAGUÉ (1992). «Responsiveness to transforming growth factor- β restored by complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 9108-9112.
- LAIHO, M.; J.A. DECAPRIO; J.W. LUDLOW; D.M. LIVINGSTON; J. MASSAGUÉ (1990). «Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation». *Cell*, núm. 62, pàg. 175-185.
- LEWIS, M.; L.A. TARTAGLIA; A. LEE; G.L. BENNET; G.C. RUCE; G.H.W. WONG; E.Y. CHEN; D.V. GOEDDEL (1991). «Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptor demonstrate one receptor is species specific». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 2830-2834.
- LIN, H.Y.; X.-F. WANG; E. NG-EATON; R.A. WEINBERG; H.F. LODISH (1992). *Cell*, núm. 68, pàg. 775-785.
- LÓPEZ-CASILLAS, F.; S. CHEIFETZ; J. DOODY; J.L. ANDRES; W. LANE; J. MASSAGUÉ (1991). *Cell*, núm. 67, pàg. 785-795.
- MASSAGUÉ, J. (1992). «Negative regulators of growth». *Cur. Op. Gen. Develop.*, núm. 2, pàg. 28-32.
- MATHEWS, L.S.; W. VALE (1991). «Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane kinase». *Cell*, núm. 65, pàg. 973-982.
- MATHEWS, L.S.; W.W. VALE; C.R. KINTNER (1992). *Science*, núm. 255, pàg. 1702-1705.
- PEREZ, C.; I. ALBERT; K. DEFAY; N. ZACHARIADES; L. GOODIND; M. KRIEGLER (1990). «A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor kills by cell-to-cell contact». *Cell*, núm. 63, pàg. 251-258.
- PIETENPOL, J.A.; R.W. STEIN; E. MORAN; P. YACIUK; R. SCHLEGEL; R.M. LYONS; R.M. PITTELKOW; K. MÜNGER; P.M. HOWLEY; H.L. MOSES (1990). «TGF- β inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming protein with pRB binding domains». *Cell*, núm. 61, pàg. 777-785.
- SEGARINI, P.R.; S.M. SEYEDIN (1988). *J. Biol. Chem.*, núm. 263, pàg. 8366-8370.
- SMITH, C.A.; T. DAVIS; D. ANDERSON; L. SOLAM; M.P. BECKMANN; R. JERZY; S.K. DOWER; D. COSMAN; R.G. GOODWIN (1990). «A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins». *Science*, núm. 248, pàg. 1019-1023.
- ULLRICH, A.; J. SCHLESSINGER (1990). *Cell*, núm. 61, pàg. 203-212.
- WANG, X.-F., H.Y. LIN, E. NG-EATON, J. DOWNWARD, H.F. LODISH; R.A. WEINBERG (1991). *Cell*, núm. 67, pàg. 797-805.