



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Papel de la ciclina O en la ataxia-telangiectasia

Dr. Gabriel Gil Gómez

Institut Municipal d'Investigació Mèdica



1. Resumen del proyecto

La ataxia-telangiectasia (AT) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por déficits neurológicos e inmunitarios, telangiectasias, predisposición al desarrollo de tumores e hipersensibilidad a la radiación gamma. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen que codifica por ATM, una proteína que forma parte de la respuesta celular al daño genético (*DNA damage response*, DDR). La ciclina O es una proteína que también participa en la DDR y es necesaria para la apoptosis en respuesta al daño genético. Forma complejos activos como proteína cinasa, junto con Cdk1 y Cdk2. Sus niveles están regulados por el eje ATM-p53 y su *down*-regulación conlleva la alteración de la DDR y, en consecuencia, de los *checkpoints* celulares dependientes de daño genético. Recientemente se ha descrito que la ciclina O es necesaria para la sobreduplicación del centriolo que tiene lugar en las células multiciliadas, y su deficiencia conlleva la aparición de enfermedades derivadas de la falta de cilios funcionales (ciliopatías). El proyecto se encaminaba a establecer relaciones genéticas y bioquímicas entre ATM, la proteína cinasa relacionada DNA-PK y la ciclina O, con el fin de entender la patología de la AT y definir posibles dianas terapéuticas. También se proponía la generación de modelos de ratón deficientes en ciclina O y ciclina O/ATM para estudiar las relaciones genéticas entre ambas proteínas.

2. Resultados

Objetivo 1. Crosstalk entre ATM y la ciclina O en la respuesta celular al daño genético (DDR).

Objetivo 2. Mecanismo bioquímico del crosstalk entre ATM y la ciclina O.

Resultados previos del laboratorio indicaban que el gen codificante para la ciclina O está regulado por el eje ATM-p53 y que su *down*-regulación comportaba la alteración de la DDR. La generación de ratones KO para la ciclina O (objetivo 4)

permitió establecer cultivos de células deficientes en ciclina O (tales como fibroblastos embrionarios, MEF, y células T activadas) y estudiar la DDR en estas condiciones.

Los resultados obtenidos indican que la pérdida de la ciclina O da lugar a una serie de cambios bioquímicos que modifican la DDR, afectando a los *checkpoints* celulares sensibles a daño genético, particularmente el de G2/M. Así, los MEF KO para ciclina O muestran una salida de mitosis más rápida cuando se generan roturas de la doble cadena del DNA (*double strand breaks*, DSB) en respuesta al tratamiento con radiación gamma. Por otra parte, tardan más en volver a entrar en ciclo celular una vez el daño genético ha sido reparado. Estos hechos demuestran que las células KO para ciclina O presentan alterado el *checkpoint* de G2/M.

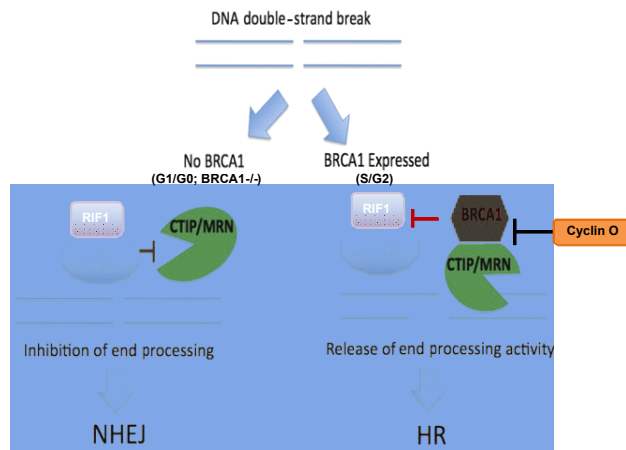
Experimentos bioquímicos mostraron que tanto ATM como la proteína cinasa relacionada DNA-PK se activan de forma deficiente en MEF KO para ciclina O en respuesta a radiación gamma. En estas células también comprobamos que proteínas de la DDR fosforiladas por ATM, tales como H2AX o Nbs1 mostraban un patrón de fosforilación anómalo, compatible con una deficiencia en la activación de ATM y DNA-PK. En contra de lo esperado, observamos que Chk2, cinasa sustrato de ATM, era fosforilada normalmente, mientras que Chk1, sustrato de ATR, era hiperfosforilada en respuesta al tratamiento con radiación gamma en células ciclina O KO. Estas observaciones, sumada al hecho de que la fosforilación de la H2AX en respuesta a radiación gamma vuelve a sus niveles normales en células KO para ciclina O en las que se ha silenciado la DNA-PK y se ha inhibido ATM mediante un inhibidor específico, sugiere que ATM y DNA-PK tienen papeles bioquímicos compartidos y que en ausencia de ambas cinasas, un tercer miembro de la familia, ATR, es capaz de retomar sus funciones en células deficientes en ciclina O.

La regulación de la activación de ATR para la ciclina O permite predecir que las tasas de resección de los extremos del DNA en los DSB, primer paso de su proceso de reparación por recombinación homóloga (HDR), estarían incrementados en células KO para la ciclina O. Esto se comprobó indirectamente, demostrando que estas células presentan una mayor incorporación de fosfo-RPA en el DNA y una mayor generación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) después de su exposición a la radiación gamma. La prueba directa consistió en la medida de la longitud de los segmentos de ssDNA generados después de la irradiación mediante la técnica SMART, lo que mostró que la pérdida de la ciclina O conlleva la generación de segmentos terminales de ssDNA más largos de forma dependiente de dosis génica. Mediante técnicas proteómicas hemos podido demostrar que este efecto está mediado por la regulación dependiente de ciclina O de los niveles de fosforilación de la S326 de CtIP, proteína que se une a los extremos rotos del DNA y que debe ser fosforilada en la S326 para poder interactuar con la proteína BRCA1, esencial en el proceso de reparación de los DSB mediante HDR.

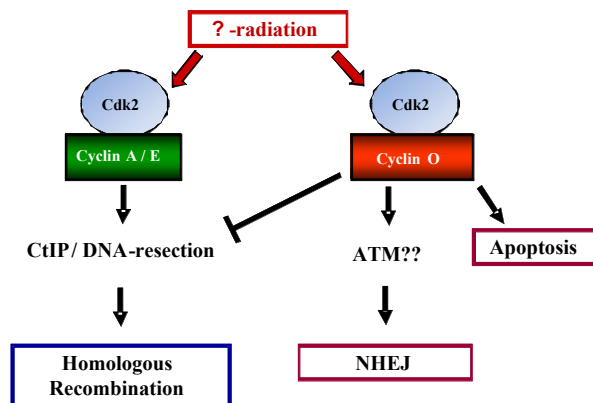
Todos estos hallazgos sugieren que la falta de ciclina O haría que las células repararan los DSB a través del sistema de alta fidelidad HDR en lugar de utilizar el sistema rápido y potencialmente mutagénico de ligación de extremos no homólogos (NHEJ). Pudimos comprobar que durante la resolución del *checkpoint* de G2/M, las células deficientes en ciclina O entraban en fase M con menos daño genético que las WT, lo que es compatible con el mayor tiempo de recuperación (o sea, reparación) que presentan y con la utilización del mecanismo de HDR. Este hecho se ha comprobado mediante la medida de la tasa de localización de las proteínas que intervienen en la HDR en los *foci* nucleares donde están los DSB, que se encuentra incrementada en el caso de los MEF ciclina O KO. La medida directa de las tasas de reparación por HDR mediante genes reportero también es compatible con esta hipótesis.

De esta parte podemos concluir que la ciclina O estaría regulando el tipo de mecanismo de reparación de las roturas de doble cadena utilizado por la célula.

Así, a través de la activación preferencial de la rama ATM/Chk2 *versus* ATR/Chk1, la ciclina O inhibiría la reparación por HDR, favoreciendo el sistema NHEJ rápido y de baja fidelidad.



La ciclina O regula la elección del mecanismo de reparación del DNA mediado por BRCA1-CTIP. Adaptado de ALY Y GANESAN, 2011.



La composición de los complejos de Cdk2 determinan la respuesta celular al daño genético.

Objetivo 3. El papel de la ciclina O en la ruta de estrés del retículo (ER)

Estímulos tales como el estrés oxidativo, reductor o la liberación de Ca^{2+} de las reservas del retículo conducen a la activación de la ruta de estrés del retículo. El trabajo que hemos realizado durante estos años muestra que la ciclina O es

inducida como respuesta a estímulos que causan estrés del retículo endoplásmico como consecuencia del acúmulo de proteínas mal plegadas. Con el fin de dilucidar su papel bioquímico, hemos utilizado las herramientas mencionadas anteriormente derivadas de ratones KO para la ciclina O (objetivo 4).

Nuestros resultados muestran que la ciclina O estaría involucrada en la activación de la ruta de las cinasas de estrés JNK y p38 como consecuencia de la instauración del estrés reticular. En la ruta ER se ha demostrado que JNK y p38 se activan a través de una ruta que implica a la proteína transmembrana del retículo IRE1. Esta proteína interacciona con TRAF2, que a su vez sería la responsable de la activación de la MAP3K Ask1, la cual activaría a JNK y p38 a través de MEK4/7 y MEK3/6, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados muestran que esta no es la única vía de activación de JNK/p38. La ciclina O es necesaria para la activación de JNK y p38 de forma independiente de Ask1.

Que la pérdida de ATM conlleve la aparición de estrés oxidativo en las neuronas nos hace pensar que la inhibición de los complejos de ciclina O evitarían la activación de la ruta de estrés reticular que acaba en muerte celular. Este estrés oxidativo se ha propuesto como agente causal de la muerte neuronal responsable de la degeneración cerebelar característica de los pacientes con AT. Así, la ciclina O podría constituir una diana terapéutica contra la que diseñar inhibidores capaces de bloquear la muerte celular inducida por estrés oxidativo/estrés reticular.

Objetivo 4. Estudio *in vivo* del papel de la ciclina O en la tumorigénesis y la neurodegeneración de los pacientes con AT

El cuarto objetivo del proyecto proponía la generación de ratones KO para la ciclina O con el fin de estudiar su papel *in vivo*. Posteriormente se proponía cruzarlos con los ratones KO para ATM que recapitulan algunos de los hallazgos clínicos de la enfermedad humana, como la tendencia a desarrollar tumores o la esterilidad, pero que no resultan buenos modelos para los aspectos neurodegenerativos de la enfermedad.

Los ratones KO para la ciclina O son viables y nacen con una frecuencia casi mendeliana, indicando que no hay mortalidad embrionaria. El hecho más distintivo de estos ratones es que el 80% de los homocigotos mueren antes del primer mes de vida posnatal debido al desarrollo de hidrocefalia. Si este síndrome aparece cuando la caja craneal comienza a estar bien osificada, el ratón se adapta y puede vivir sin problemas neurológicos aparentes con una esperanza de vida idéntica a los WT.

Mediante técnicas de RMI pudimos constatar que la hidrocefalia es de tipo no obstructivo, resultando afectados únicamente los ventrículos laterales (1 y 2) del cerebro. También demostramos que el fenotipo es 100% penetrante, es decir, que los ratones homocigotos que superan el primer mes de vida, aunque no presenten evidencias, sufren hidrocefalia grave. Lo más sorprendente es que los ratones heterocigotos también muestran signos claros de hidrocefalia desde la juventud. En edad adulta, todos los heterocigotos son claramente hidrocefálicos, lo que demuestra que son haploinsuficientes para el gen de la ciclina O.

Además de la hidrocefalia, los ratones KO muestran signos de sufrimiento y daño neuronal. También muestran una corteza cerebral delgada, que ha perdido su estructura típica en 6 capas. Un hallazgo que comparten con los heterocigotos son las malformaciones en el hipocampo. En esta región se detecta una falta grave de neuronas en algunas zonas, así como defectos en su plegamiento.

Respecto a los cruces con los ratones KO para ATM, el estudio por RMI no pudo ser completado debido a la dificultad de la obtención de suficientes ratones doble KO, aunque sabemos que son viables. Se realizó el análisis de algunas de las combinaciones génicas y se pudo constatar que la ausencia completa de ATM conduce a la disminución del volumen de los ventrículos cerebrales laterales y tercero. En cambio, el cuarto ventrículo está agrandado, quizás como reflejo de la pérdida neuronal a nivel del cerebelo, una de las características de los pacientes AT humanos. La pérdida de un solo alelo de la ciclina O (ATM Hom/Ciclina O Het)

es suficiente para revertir completamente el fenotipo, alcanzando los ventrículos tamaños similares a los del WT/WT, lo que confirma una interacción genética entre ATM y ciclina O.

En cuanto a otros tejidos, hemos podido comprobar que de acuerdo con evidencias previas, las células T activadas deficientes en ciclina O son radorresistentes, igual que otros tipos celulares en proliferación, como los fibroblastos. No así células quiescentes como los timocitos, que presentan una sensibilidad a la radiación gamma indistinguible de los WT.

Recientemente hemos podido llegar a comprender la razón del desarrollo de hidrocefalia en los ratones KO para la ciclina O. Otra función recientemente descrita de la ciclina O la sitúa como reguladora esencial del proceso de formación de cilios en las células multiciliadas que recubren epitelios como el de las vías aéreas, el oviducto y el epéndimo, epitelio que recubre los ventrículos cerebrales. Los cilios del epéndimo son necesarios para la circulación del líquido cefalorraquídeo. Si no existen o no funcionan correctamente, este fluido no puede circular y se estanca, dando lugar a las hidrocefalias. Experimentos recientes han mostrado que, de acuerdo con los pacientes humanos con mutaciones en el gen, los ratones KO para ciclina O están prácticamente desprovistos de cilios en los epitelios anteriormente nombrados, confirmándose así el papel esencial de la ciclina O en la ciliogénesis y su papel causal de otra enfermedad rara: la discinesia ciliar primaria ORPHA244 y de la hidrocefalia a presión normal ORPHA314928.

Por otra parte, y conforme a los resultados moleculares descritos en los objetivos 1 y 2, los ratones KO para la ciclina O presentan una incidencia de tumores espontáneos inferior a la de los WT y, posiblemente, un espectro tumoral diferente.

3. Relevancia y posibles implicaciones

Este proyecto de investigación ha sido muy útil para determinar las relaciones entre un nuevo miembro de la familia de las ciclinas (ciclina O) y la respuesta celular al daño genético (*DNA damage response*, DDR). Hemos hallado evidencias que demuestran que la ciclina O es un regulador de ATM y de la DDR.

Nuestras evidencias bioquímicas y genéticas sugieren que la inhibición de los complejos de la ciclina O resultan en un bloqueo de la función de ATM, pero que en el contexto de la inhibición concomitante de la DNA-PK, sus funciones son llevadas a cabo por ATR.

Por otra parte, el fenotipo de los ratones KO para la ciclina O indica que esta proteína es crucial para la decisión celular de escoger entre los dos mecanismos de reparación de los DSB: la ligación de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HDR). La NHEJ es un proceso rápido y eficiente para reparar los DSB, que son las lesiones del DNA más peligrosas para la célula, pero es un proceso que a menudo introduce mutaciones o puede causar translocaciones. La HDR es un mecanismo fiel y sin errores, pero solo puede funcionar en aquellas etapas del ciclo celular en las que existe una copia íntegra del cromosoma de donde recuperar la información perdida (final de S, G2 y M).

La inhibición de los complejos de la ciclina O favorece la resección de los extremos del DNA roto y, como consecuencia, su reparación por HDR. La menor frecuencia de aparición de tumores espontáneos en los ratones KO concuerda con los hallazgos moleculares que indican que las células de estos ratones tienden a utilizar la HDR, mecanismo libre de errores, para reparar los DSB.

La predicción sería entonces que un inhibidor selectivo de los complejos de la ciclina O con Cdk1 y Cdk2 tendría propiedades antimutagénicas y antitumorales.

En el contexto de los pacientes de AT, la falta de la proteína ATM funcional conduce a una variedad de patologías consecuencia de la imposibilidad de reparar a través de HDR (linfomas, esterilidad, etc.). La inhibición farmacológica de los complejos de la ciclina O en combinación con inhibidores de la DNA-PK forzaría a la célula a que ATR realizara las funciones de las dos cinasas, favoreciendo la reparación del DNA mediante HDR.

Además, los estudios preliminares por RMI de ratones homocigotos para ATM y heterocigotos para la ciclina O indican que las anomalías en los tamaños de los ventrículos cerebrales, particularmente el cuarto, que es mayor en ratones homocigotos para ATM y WT para ciclina O, vuelven a valores normales. Si se confirmara que esta observación es debida a la recuperación de la pérdida neuronal en el cerebelo, implicaría que inhibidores de los complejos de la ciclina O podrían ser útiles para tratar la neurodegeneración de los pacientes de AT que conduce a la ataxia.

Nuestros resultados previos muestran que la ciclina O puede formar complejos activos con Cdk1 y Cdk2. Existen inhibidores de estas cinasas que se encuentran en ensayos clínicos como fármacos antitumorales. El problema es que no discriminan entre los complejos Cdk2-ciclina A y Cdk2-ciclina E necesarios para el ciclo celular normal de los complejos Cdk2-ciclina O. Sin embargo, en los últimos años se ha progresado en la obtención de moléculas capaces de inhibir selectivamente Cdk2, pero no Cdk1, y viceversa, a pesar del elevado grado de homología existente entre ambas cinasas. Quizás en un futuro no lejano aparecerán nuevas moléculas capaces de inhibir selectivamente los diferentes complejos Cdk2-ciclina. Esto nos permitiría comprobar si nuestras predicciones son correctas y podemos aportar un poco de esperanza para los afectados por esta enfermedad hasta ahora devastadora e incurable.

4. Bibliografía científica generada

Garcia-Fernandez, R.A.; Garcia-Palencia, P.; Sanchez Maria, A.; Sanchez, Maria A.; Gil-Gómez, G.; Sanchez, B. ; Rollan, E.; Martin-Caballero, J. i Flores, J.M.

Combined loss of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1} enhances tumorigenesis in mice.

Lab. Invest. (2011) 91: 1634-1642

Hinarejos, P.; Piñol, I.; Torres, A.; Prats, E.; Gil-Gómez, G. i Puig-Verdie, L.

Highly crosslinked polyethylene in total knee arthroplasty. In vivo study of particles in synovial fluid.

J Arthroplasty. (2013) 28: 1333-1337

Tajes M.; Eraso-Pichota A.; Rubio-Moscardó F.; Guivernau B.; Ramos-Fernández E.; Bosch-Morató M.; Guix FX.; Clarimón J.; Miscione GP.; Boada M.; Gil-Gómez G.; Suzukig T.; Molina H.; Villà-Freixa. J; Vicente R. i Muñoz F.J.

Methylglyoxal Produced by Amyloid β -Peptide-Induced Nitrotyrosination of Triosephosphate Isomerase Triggers Neuronal Death in Alzheimer Disease.

J Alzheimers Dis (2014) 41:273-288

García-Fernández RA; García-Palencia P; Suarez C; Sánchez MA; Gil-Gómez G.; Sánchez B; Rollán E; Martín-Caballero J i Flores JM.

Cooperative role between p21^{cip1/waf1} and p27^{kip1} in premature senescence in epithelial proliferative lesions in mice.

Histol and Histopathol (2014) 29: 397- 406

Piñol, I.; Torres, A.; Gil-Gomez, G. ; Prats, E.; Puig-Verdie, L. i Hinarejos, P.

Polyethylene particles in joint fluid and osteolysis in revision total knee arthroplasty.

Knee (2014) 21:402-405

Jung C; Núñez M; Balsiger A; Plata C; Roset R; Pardo-Pastor C; Garrido M; Rojas S; Muñoz F; Alameda F; Lloreta J; Valverde M.A i Gil-Gómez G.

Loss of Ccno resumes human diseases characterized by impaired multiciliogenesis (en preparación).

Núñez M; Balsiger A; Garrido M; Huertas P i Gil-Gómez G

Cyclin O regulates DNA repair by Homologous Recombination by Modification of the DNA Resection Rate through Phosphorylation of CtIP (en preparación).