

SEÑALIZACIÓN CELULAR BÁSICA

J. Pilar Fernández Valerón¹, Leandro Fernández Pérez², Domingo Navarro Bosch³ y Ricardo Chirino Godoy³

¹ Profesora Asociada de Bioquímica y Biología Molecular

² Profesor Titular de Farmacología

³ Profesor Titular de Fisiología

^{1,3} Departamento de Bioquímica y Fisiología

² Departamento de Ciencias Clínicas

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC)

jfernandez@dbbf.ulpgc.es

ÍNDICE

1. ASPECTOS DE INTERÉS GENERAL
 - 1.1 Tipos y moléculas de señalización
 - 1.2 El receptor
 - 1.3 Segundos mensajeros
 - 1.4 Proteínas transductoras de la señal

 2. RECEPTORES LIGADOS A CANALES IÓNICOS
 - 2.1 Receptor Nicotínico de Acetilcolina en la placa motora
 - 2.2 Mecanismo de acción de algunas neurotoxinas
 - 2.3 Conexiones activadoras e inhibitoras

 3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)
 - 3.1 Activación de la Adenilato Ciclasa: AMPc
 - 3.2 Kinasas dependientes de AMPc
 - 3.3 Los fosfolípidos de Inositol y sus segundos mensajeros: IP3 y DAG
 - 3.4 Calmodulina. Importancia de la concentración citosólica de Ca⁺²

 4. RECEPTORES DE MEMBRANA LIGADOS A ENZIMAS
 - 4.1 Receptores con actividad tirosina kinasa. Autofosforilación
 - 4.2 Proteínas adaptadoras
 - 4.3 Ras
 - 4.4 MAP Kinasas como efectoras de Ras
 - 4.5 Receptor de Insulina y Receptor de la Hormona de Crecimiento

 5. RECEPTORES INTRACELULARES
 6. CONCLUSIÓN
 7. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA
-

1. ASPECTOS DE INTERÉS GENERAL

1.1 Tipos y moléculas de señalización

La coordinación de la actividad celular para el correcto funcionamiento de un organismo, no sólo es necesaria sino que es imprescindible. Para cumplir este objetivo existe un complejo entramado donde unas células envían señales a otras y estas señales ejercen una función en las células que las reciben, produciéndose una respuesta fisiológica y por tanto un cambio en la actividad celular. En este capítulo repasaremos someramente las moléculas implicadas en estas rutas, principalmente en lo que se refiere a la trasducción de señales intracelular

En la comunicación celular, el papel protagonista gira entorno a las moléculas que actúan como "señalizadores", así se ha de producir su síntesis y liberación por parte de las células productoras, transporte hasta la célula diana, detección de la señal por una proteína receptora, respuesta de la célula a la señal que recibe y por último desaparición de esta señal. Las moléculas sobre las que recae esta función son muchas y de variado origen, entre ellas se encuentran hormonas, factores de crecimiento, citoquinas...etc. (Tabla)

Existen dos grandes sistemas de señalización intercelular: el sistema endocrino y el sistema nervioso. Estos dos grandes sistemas de señalización se hallan interconectados en la vida celular y en ellos radica la inmensa mayoría de las comunicaciones, pero desde nuestra perspectiva podemos clasificar la señalización en tres tipos:

Tabla 1. Algunas moléculas de señalización

Hormonas	Órgano/tejido/célula de secreción	Función o actividad
Peptídicas		
Insulina Glucagón	Páncreas Páncreas	Estimula la captación y utilización de la glucosa Estimula la producción de glucosa en el hígado
Con función amina		
Adrenalina (epinefrina) Tiroxina	Médula adrenal Tiroides	Controla las respuestas al estrés, aumenta la frecuencia cardíaca Estimula el metabolismo en muchos tejidos
Esteroides		
β -Estradiol Testosterona Aldosterona	Ovario Testículo Corteza adrenal	Regula la actividad de los tejidos y órganos sexuales femeninos Regula la actividad de los tejidos y órganos sexuales masculinos Regula la retención de sodio y la presión sanguínea
Icosanoides		
Prostaglandinas Leucotrienos	Mayoría de tejidos Leucocitos	Contracción de la musculatura lisa; fiebre; inflamación. Constricción bronquial; implicados en reacciones de hipersensibilidad

- En la **señalización endocrina** la molécula de señalización u hormona es producida por una glándula y vertida a la sangre por donde viaja hasta alcanzar ciertas células distantes de su lugar de origen sobre las que ejerce su acción.
- En la **señalización nerviosa** el mediador o neurotransmisor se sintetiza en los terminales axónicos de las células nerviosas, es secretado en la conexión sináptica y ejerce su acción sobre células vecinas (otra célula nerviosa, célula muscular ...etc.).
- La **señalización paracrina** se caracteriza porque el mediador difunde durante una corta distancia y ejerce su acción sobre células vecinas. Como variante de ésta, en la señalización autocrina la molécula de señalización ejerce su acción sobre la misma célula que lo produce. Muchos factores de crecimiento actúan de esta manera.

Hay otros tipos de comunicación, por ejemplo, la molécula de señalización es sintetizada e incorporada a la membrana plasmática donde es expuesta al exterior y ejerce su acción por contacto con otra célula. A este tipo de comunicación se le llama yuxtacrino, o también estas moléculas de señalización pueden pasar de una célula a otra, a través de uniones *gap*.

Las moléculas que participan en la señalización entre células son de naturaleza variable, y según ésta se comportan en cuanto a su receptor, así tenemos las liposolubles que difunden a través de la membrana plasmática e interaccionan con sus receptores en el citosol o núcleo celular, afectando principalmente a la transcripción de genes específicos. A esta clase pertenecen las hormonas esteroideas (cortisol, progesterona, estradiol, y testosterona), ácido retinoico y tiroxina. Las hidrosolubles no pueden atravesar la membrana plasmática y por tanto se unen a receptores de superficie. Aquí encontraremos dos grupos de moléculas: hormonas peptídicas como insulina, factores de crecimiento y glucagón y pequeñas moléculas cargadas como la epinefrina y la histamina, que pueden funcionar como hormonas o neurotransmisores. En el tercer lugar tenemos las hormonas lipofílicas que se unen a receptores de superficie como es el caso de las prostaglandinas.

1.2 El receptor

Independientemente de la variante de que se trate, e independientemente de la naturaleza del señalizador, es necesario para que se produzca este evento celular, la existencia de una proteína específica que va a reconocer y a unirse al mediador. Esta proteína es el receptor (R). Así, la molécula de señalización actúa como ligando uniéndose al receptor, produciendo un cambio conformacional en éste, que desencadena la secuencia de reacciones que lleva en última instancia a una respuesta celular específica.

Sólo las células que poseen el receptor adecuado para un determinado ligando responderán a éste. Estas células reciben el nombre de células dianas, e igualmente podríamos hablar de tejidos dianas, órganos dianas...etc. Por tanto, existe una especificidad de unión ligando-receptor, como también la hay en la respuesta que se produce. Es común encontrarnos en la vida celular, con el hecho de que distintos ligandos produzcan el mismo efecto en un tipo celular (p. Ej. epinefrina y glucagón en hepatocitos producen liberación de glucosa a la sangre), tanto como que un mismo complejo ligando-receptor modulen distintas respuestas dependiendo del tipo tisular (la epinefrina en células musculares de corazón eleva el ratio de contracción).

Para una mejor aproximación a este complejo campo, nosotros estudiaremos algunos ejemplos en la señalización de los cuatro grandes grupos de receptores, que son:

- **Receptores ligados a canales iónicos:** la unión del ligando resulta en un cambio en el potencial eléctrico de la membrana. Los neurotransmisores como la Acetilcolina (AcCo) funcionan de esta manera.
- **Receptores ligados a proteínas G (GPCRs):** la unión del ligando activa una proteína G que desencadena la producción de segundos mensajeros o modula la activación de un canal iónico. Ejemplos de ligandos de este tipo de receptores son la epinefrina, serotonina y glucagón.
- **Receptores ligados a enzimas:** este tipo de receptores pueden tener actividad enzimática en su dominio citosólico o bien estar estrechamente relacionados con otras proteínas que desarrollan esta actividad enzimática. Los factores de crecimiento humanos, interferones y citoquinas son los candidatos a unirse a este tipo de receptores.
- **Receptores intracelulares:** son los receptores típicos de las hormonas esteroideas por las características antes mencionadas de este tipo de ligandos.

En el estudio de los acontecimientos mediados por los complejos ligando-receptor ha sido fundamental el uso de moléculas análogas de estos ligandos, que funcionan como agonistas (mimetizan las acciones de la hormona, dando lugar a una respuesta fisiológica específica) o como antagonistas (compiten con la hormona por el receptor, uniéndose a éste y bloqueando la respuesta celular).

1.3 Segundos mensajeros

Los efectos de la unión de muchas de estas hormonas están mediadas en el interior celular por la regulación en la concentración de otras moléculas de bajo peso molecular denominadas

segundos mensajeros. Estas moléculas incluyen al AMPc, GMPc, diacilglicerol (DAG), 1,4,5-inositol trifosfato (IP3), varios fosfolípidos de inositol y el calcio (Ca^{+2}).

La concentración de estas moléculas incide en la regulación del metabolismo celular, actividad enzimática o no enzimática de proteínas, y transcripción de genes específicos implicados en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, además de proporcionar a la molécula señalizadora una forma de transducción y amplificación de esta señal en el interior celular. En este aspecto de la señalización profundizaremos en adelante.

1.4 Proteínas transductoras de la señal

Si es cierto que en el contexto que aquí nos ocupa, es fundamental la presencia de moléculas señalizadoras y proteínas especializadas en su recepción, no lo es menos que en el interior celular hay unas determinadas proteínas, así como los antes mencionados segundos mensajeros, que son imprescindibles para el engranaje de esta maquinaria señalizadora. Haremos pues una introducción de las tres principales clases de estas proteínas:

- Las proteínas **GTPasas** ciclan entre un estado inactivo, en el que se encuentran unidas a GDP, y un estado activo unidas a GTP. Tienen capacidad GTPasa intrínseca, lo que les permite en cierta manera ser reguladoras de su propia actividad. Entre las GTPasas existen dos tipos de proteínas:
 - las proteínas G triméricas que se acoplan directamente al receptor activado, y
 - las proteínas G monoméricas, cuya activación por el receptor ocurre con la intervención de otras proteínas.
- Proteínas **quinasas**, se encuentran en el citosol o asociadas a la membrana plasmática y tras su activación por parte del receptor desencadenan una serie de fosforilaciones modulando la actividad en otras proteínas u enzimas. En general a la actividad por parte de estas proteínas se oponen las fosfatasas.
- Proteínas **adaptadoras**. En las cascadas de transducción de señales, participan numerosos complejos proteicos que se ven ayudados por proteínas adaptadoras. Este tipo de proteínas no tienen actividad catalítica ni activan directamente efectores, pero poseen diferentes combinaciones de dominios que permiten el contacto entre las proteínas que interactúan en una cascada. Entre estos dominios, son frecuentes los de unión a residuos de fosfotirosina (SH_2 y PTB), secuencias ricas en prolina (SH_3 y WW), y una secuencia única con residuos hidrofóbicos en el C-terminal (PDZ).

2. RECEPTORES LIGADOS A CANALES IÓNICOS

Nos encontramos con que los receptores ligados a canales iónicos no son más que canales iónicos regulados por un ligando desde el exterior de la célula. En todos los casos este ligando es un neurotransmisor, por eso se dice que son canales regulados por transmisor. Los neurotransmisores clásicos son aminoácidos o derivados de estos y tienden a acumularse en el axón neuronal en vesículas sinápticas. Como el potencial de acción generado en la membrana neuronal no es capaz por si mismo de producir la exocitosis de estas vesículas y la liberación del neurotransmisor, esta señalización se basa en la transducción de la señal eléctrica a una señal química, la elevación de los niveles de calcio.

En general, la unión del neurotransmisor puede producirse en la membrana de la célula postsináptica con dos tipos de receptores:

- Receptores **excitadores**, que son canales para iones Na^+ , o Na^+ y K^+ que generan un potencial de acción en la membrana de la célula receptora, y
- Receptores **inhibidores**: que son canales para iones Cl^- o K^+ y generan una hiperpolarización en la célula postsináptica, que no permite la generación de nuevos potenciales de acción

Además de a este tipo de receptores, los neurotransmisores pueden unirse a GPRCs que estudiaremos en la próxima sección, en un tipo de sinapsis que podríamos definir como lenta, ya que la que se realiza con los receptores ligados a canales iónicos es de respuesta rápida.

Para conocer el funcionamiento de este tipo de receptor haremos una breve introducción a los receptores nicotínicos para el neurotransmisor acetilcolina (AcCo). El receptor nicotínico (Rn) es un canal iónico selectivo para los iones Na^+ y K^+ .

2.1 Receptor Nicotínico de Acetilcolina en la placa motora

Empezaremos pues suponiendo que nos encontramos en la conexión neuromuscular del músculo esquelético, también llamada placa motora (Figura 1).

Como hemos mencionado, el Ca^{+2} ayuda a la exocitosis de la vesícula de secreción que contiene la acetilcolina (AcCo). La exocitosis es el proceso mediante el cual una vesícula celular se traslada hacia la membrana y mediante la fusión con ella, libera su contenido. Cuando el impulso nervioso llega al terminal axónico, se sucederán una serie de eventos que darán como resultado la transmisión de "una orden". Antes de ver el fenómeno molecular que a nosotros nos interesa, recordaremos que este impulso llega al terminal axónico de la neurona en forma de onda o señal despolarizadora (en forma de potencial de acción).

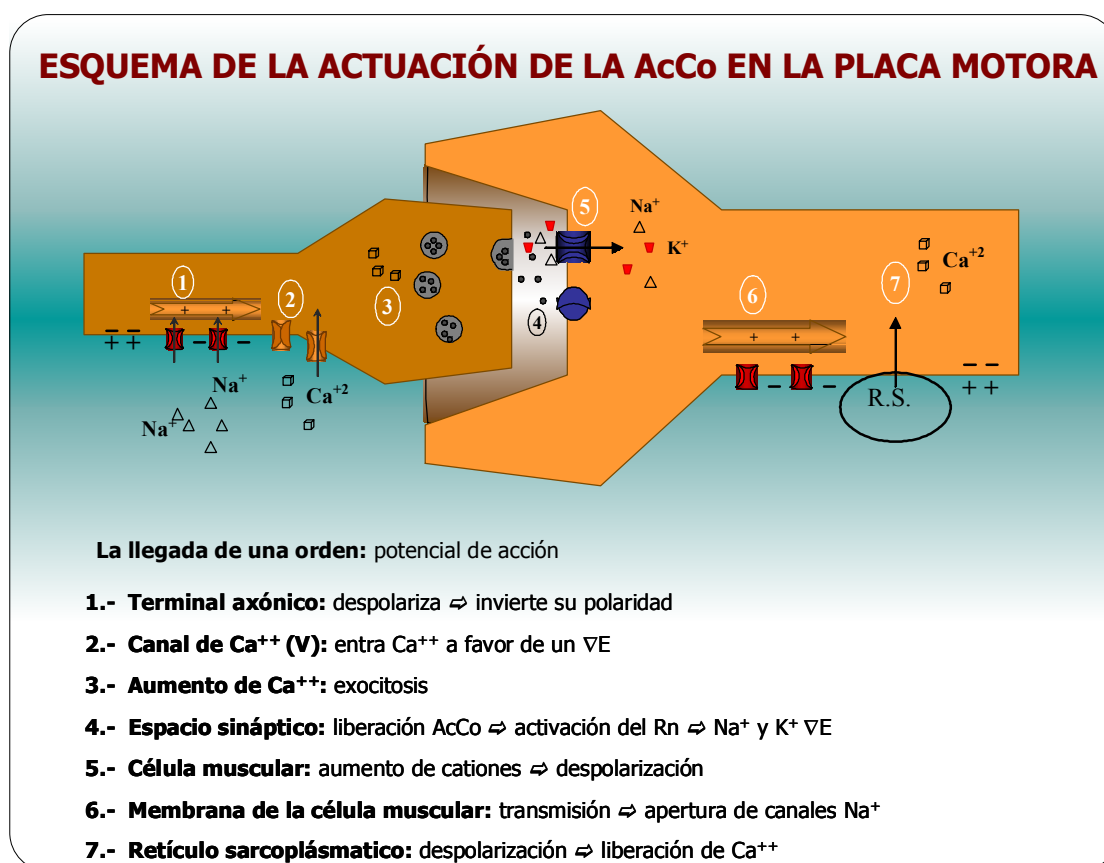


Figura 1.: ESQUEMA DE LA ACTUACIÓN DE LA AcCo EN LA PLACA MOTORA.

El neurotransmisor AcCo nos sirve para ejemplarizar la regulación por ligando de los "receptores ligados a canales iónicos". En la presente figura se observa lo que acontece tras la llegada de un potencial de acción al terminal axónico de la neurona enervadora del músculo.

Tenemos a continuación esta serie de sucesos; la membrana del terminal axónico se despolariza y, eventualmente invierte su polaridad, lo que provoca la apertura de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, y por tanto la entrada de este ión a la célula a favor de un gradiente electroquímico. La subida en los niveles de Ca^{+2} facilita la liberación de la AcCo al espacio sináptico y la unión al receptor nicotínico de la célula muscular. El receptor se abre (recordemos que nos referimos a canales iónicos regulados por ligando) permitiendo el paso de iones Na^+ y K^+ hacia el interior celular a favor de un gradiente electroquímico.

El aumento en la concentraciones de estos cationes genera un potencial de acción que se transmite a lo largo de la membrana de la célula postsináptica por la apertura de canales Na^+ dependientes de voltaje, hasta alcanzar el retículo sarcoplásmico, dónde se abren los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje y el ión sale del orgánulo hacia el citosol de la célula a favor de un gradiente electroquímico. El retículo sarcoplásmico es un órgano secuestrador de Ca^{+2} y existe una conexión física entre su membrana y la de la célula muscular, de esta manera pueden transmitirse potenciales.

Al final, la respuesta celular será dependiente del aumento de Ca^{+2} en el citosol, en este caso la contracción muscular.

2.2 Mecanismo de acción de algunas neurotoxinas

Estos procesos celulares que vamos conociendo son la base de los mecanismos de acción de algunas toxinas. La saxitoxina por ejemplo es producida por dinoflagelados marinos responsables de las "mareas rojas". Estas sustancias bloquean canales de Na^{+} voltaje dependientes, y en consecuencia impiden la propagación del impulso nervioso, por tanto las células musculares quedan paralizadas a nivel de los canales de sodio voltaje-dependientes (Punto 1 de la Figura 1).

El neurotransmisor AcCo, a diferencia de otros, es eliminado de la hendidura sináptica por acción del enzima acetilcolinesterasa. Sobre este hecho se basa la acción de otras toxinas producidas por las cianobacterias, la anatoxina-a y anatoxina-a(s) (Figura 2).

Estas neurotoxinas ejercen su acción alterando el mecanismo de comunicación de la acetilcolina-receptor nicotínico. La anatoxina a compite con la AcCo por el receptor nicotínico, se une a él y lo activa, es decir lo abre. A diferencia de la AcCo la anatoxina-a no es degradada por la acetilcolinesterasa, por lo cual esta permanece activa y el receptor se encuentra estimulado o activado

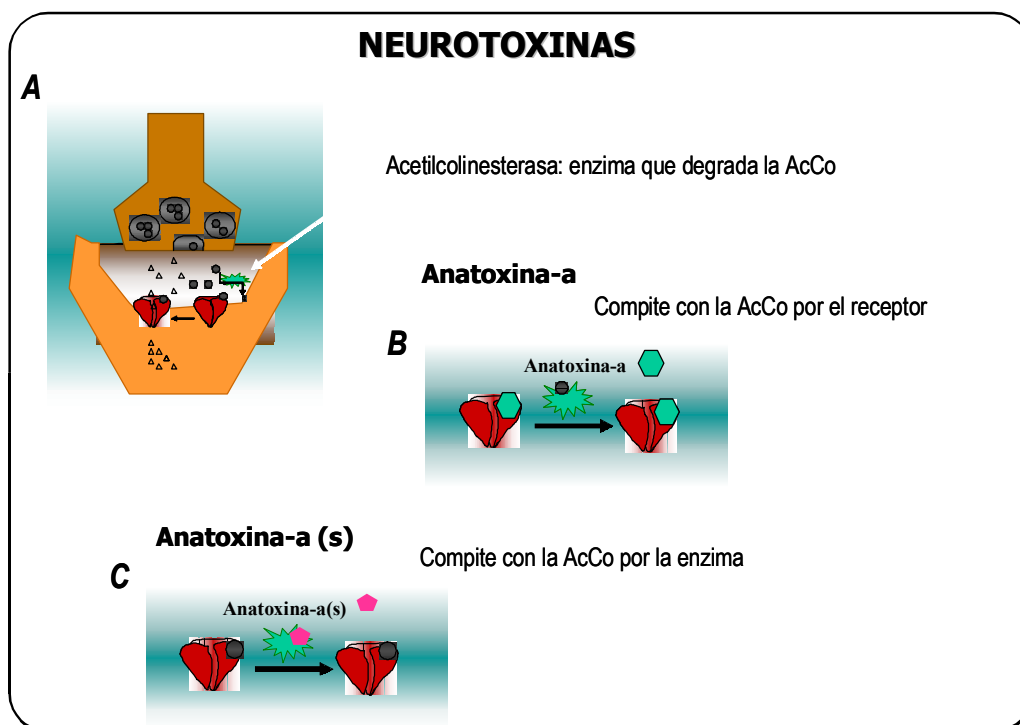


FIGURA 2: NEUROTOXINAS

(A) La persistencia de la señal por parte del neurotransmisor en la hendidura sináptica, puede acarrear graves consecuencias en la salud. Este es el efecto que producen algunas neurotoxinas, así la Anatoxina-a (B) sustituye a la AcCo en su unión al receptor nicotínico y además no puede ser degradada por la acetilcolinesterasa. (C) La Anatoxina-a (s) sin embargo, bloquea la actividad catalítica del enzima y ésta no puede cumplir su función en la eliminación del neurotransmisor de la hendidura.

de forma permanente, los canales Na^+ dependientes de AcCo permanecen abiertos durante largos periodos de tiempo y por tanto existe una contracción permanente del músculo (recordar que el músculo no trabaja si no hay una alternancia contracción-relajación). La anatoxina-a(s) no se une al receptor, se une al centro activo de la acetilcolinesterasa, compitiendo con la AcCo . Esta unión bloquea al enzima e impide que la AcCo sea degradada. El resultado que se produce es semejante al anterior, la AcCo estimulará de forma permanente al receptor nicotínico.

2.3 Conexiones activadoras e inhibitoras

Como ya hemos mencionado, los neurotransmisores químicos pueden ser excitadores e inhibidores. Algunos excitadores son compuestos tales como la acetilcolina (que hemos estudiado) y las catecolaminas, otros, sin embargo, son neurotransmisores inhibidores como el GABA (ácido γ -aminobutírico), y la glicina. Algunos venenos como la estricnina (en el caso de la glicina) y fármacos como las benzodiazepinas y barbituratos (caso de GABA) pueden unirse a los receptores de estos neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central.

3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Las proteínas G son sumamente importantes en las rutas de señalización celular. Actúan como transductores de receptores en la membrana celular y reciben este nombre debido a que son proteínas fijadoras de moléculas de guanina. En el caso de las proteínas G triméricas están constituidas por tres subunidades (α , β , y γ). Se encuentran ancladas en el lado citosólico (interno) de la membrana plasmática y pueden presentar dos estados: el activo y el inactivo. En el estado inactivo las tres subunidades están en contacto físico mediante uniones débiles (Figura 3). La subunidad α tiene un sitio de unión al GDP ocupado por una molécula de este nucleótido. En el estado activo la subunidad α está separada físicamente de las otras dos y tiene un sitio de unión a nucleótidos de guanina ocupado por una molécula de GTP a la vez que presenta una conformación distinta que en el estado inactivo.

Para estudiar el mecanismo de esta importante grupo de receptores hemos elegido la unión de la epinefrina a los receptores adrenérgicos y la ruta de activación de su enzima efectora, adenilato ciclasa (AC). La epinefrina puede unirse a receptores adrenérgicos del tipo α y β , causando efectos tisulares específicos, además estos receptores se encuentran acoplados a distintas proteínas G, así los receptores α -adrenérgicos se acoplan a proteínas G que activan la adenilato ciclasa (G_s), mientras los receptores β se acoplan a dos tipos de proteínas G, unas que inhiben la adenilato ciclasa (G_i) y otras que estimulan a la fosfolipasa C (PLC) (G_o), con la aparición de IP_3 y DAG como segundos mensajeros.

3.1 Activación de la Adenilato Ciclasa: AMPc

Cuando la hormona se une al receptor, se produce un cambio conformacional en el lado citosólico del receptor y en consecuencia se activa. El receptor activo contacta con la proteína G inactiva.

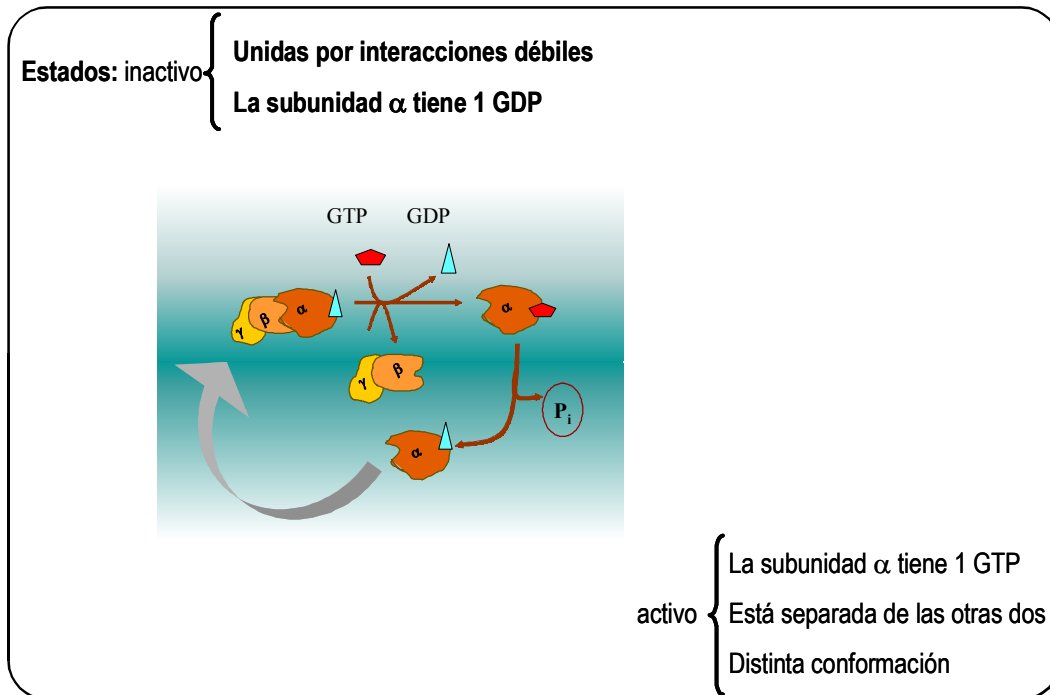


FIGURA 3: ESTADOS DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS G TRIMÉRICAS.

Las proteínas G triméricas ciclan entre su estado inactivo unidas a GDP y con sus tres subunidades físicamente en contacto y un estado activo, en el cual la subunidad α se encuentra separada de las otras dos y unida a una molécula de GTP.

La afinidad de la subunidad α por el GDP disminuye y lo libera, al mismo tiempo que la afinidad por el GTP aumenta y lo capta. Con el GTP la subunidad α experimenta un cambio conformacional, se separa de las otras dos y pasa a su estado activo (G_s -GTP), de forma que contacta con la adenilato ciclasa activándola. La adenilato ciclasa es una enzima transmembranal que presenta su centro activo en el interior de la célula (citoplasmático). Cataliza la reacción de ATP (adenosin trifosfato) a AMPc (adenosin monofosfato cíclico) y pirofosfato (PP_i), con lo que se produce un aumento en la concentración intracelular de AMPc (Fig. 4).

Para que se produzca una respuesta celular, se requieren de cientos de miles a millones de moléculas de AMPc por célula, por ello, la señal producida por la hormona en unos cientos de receptores β -adrenérgicos presentes en la membrana celular ha de ser amplificada. Esta "amplificación" es posible gracias a la rápida difusión que tienen en la membrana tanto el receptor como la proteína G, lo que les permite interactuar y de esta manera activar a la AC durante el tiempo que dura el complejo G_s -GTP.

De la misma manera en que la célula necesita la amplificación de la señal, requiere que ésta cese a medida que la hormona circulante desaparece. En este sentido, tras la activación de la proteína G la afinidad del receptor por la hormona disminuye (la K_d se incrementa), y una vez que el GTP es hidrolizado, la actividad de la proteína G y en consecuencia la de la AC, revierten a su estado inicial, quedando la célula en disposición de recibir nuevas señales. El AMPc es degradado por el enzima

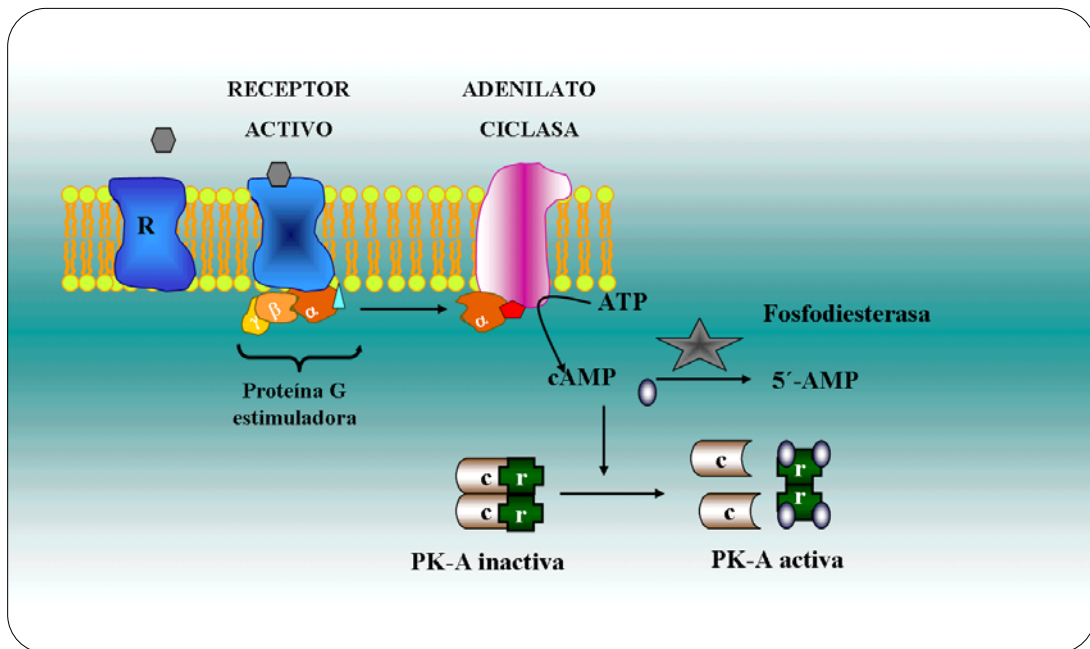


Figura 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA EPINEFRINA EN LOS RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS

La unión de la epinefrina al receptor produce en éste un cambio conformacional. De esta manera el receptor puede contactar con la proteína G activándola. La proteína G en su estado activo, si es una proteína G estimuladora (G_s) contacta y activa a la Adenilato Ciclasa (AC) en la producción de AMPc a partir de ATP

fosfodiesterasa de AMPc, que en numerosas ocasiones es regulada por el Ca⁺². Por tanto, la concentración celular de AMPc es en todo momento el resultado de las actividades relativas de las reacciones de formación y degradación (el balance entre ambas reacciones).

3.2 Kinasas dependientes de AMPc

El AMPc actúa uniéndose y regulando la actividad de proteínas kinasas dependiente de AMPc que reciben el nombre de PKAs o cAPKs. La PKA es un enzima tetramérica formada por dos subunidades catalíticas iguales que llamaremos (C) y dos subunidades reguladoras iguales que llamaremos (R). En su estado inactivo se halla en forma de tetrámero, sin embargo, la unión de 2 moléculas de AMPc, a cada una de las subunidades reguladoras, provoca un cambio conformacional en el enzima, del que resulta la separación de las 4 subunidades y la activación de las subunidades catalíticas (Fig. 5). La PK-A fosforila sustratos proteicos específicos en residuos de serina y treonina, se trata pues de una serina/treonina proteína quinasa. La fosforilación del sustrato hace que este cambie de estado, es decir de activo a inactivo o viceversa.

La respuesta celular dependerá de los sustratos proteicos que son reconocidos por la PKA y que se expresarán en las correspondientes células dianas. El primer evento celular descrito dependiente de

PKAs fue la liberación de glucosa desde glucógeno en células de hígado y musculares estimuladas por epinefrina o agonistas de los receptores β -adrenérgicos. La epinefrina promueve la liberación de glucosa mediante inhibición de la síntesis del glucógeno y estimulación de su degradación. Ambas vías están moduladas por la actividad de la PKA, que activa o inhibe a las enzimas implicadas en estas rutas metabólicas.

Para finalizar, debemos remarcar el hecho de que el AMPc media la respuesta inducida por numerosas hormonas que se unen a los GPCRs. La variabilidad de estas respuestas dependen en gran medida del tipo celular, por las proteínas dependientes de AMPc (una o varias PKAs) que se activan y por los sustratos que intervienen. Para ilustrar esta idea diremos que en adipositos la elevación de AMPc estimula la producción de ácidos grasos, en ovario promueve la síntesis de estradiol y progesterona y en el desarrollo el papel de las PKAs es fundamental para la comunicación entre células en la formación de tejidos específicos.

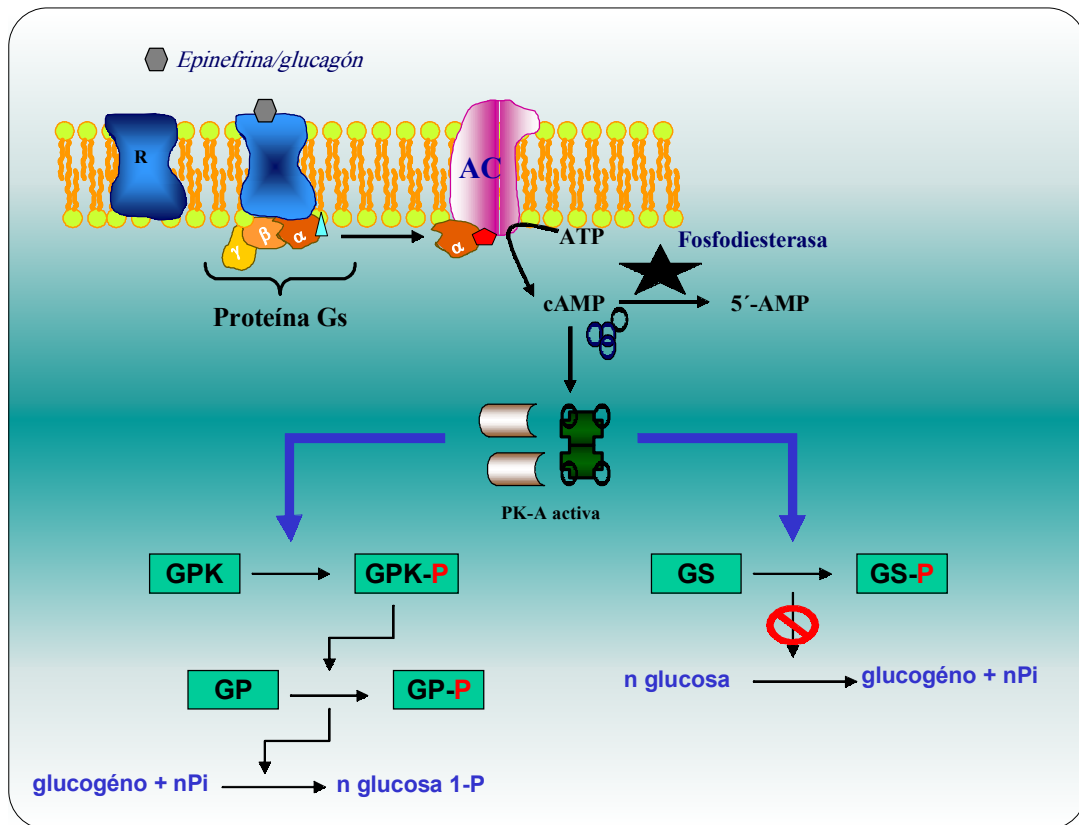


Figura 5: PROTEÍNAS KINASAS DEPENDIENTES DE AMPc

En células de músculo e hígado las proteínas kinasas dependientes de AMPc (PKAs) juegan un papel relevante en la liberación de glucosa a partir de glucógeno. Cuando la epinefrina contacta con los receptores β -adrenérgicos se produce un aumento de AMPc que activa la PKA. Este enzima regula la cascada de fosforilaciones de ciertas enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno. La activación de la glucógeno fosforilasa (GP-P) estimula la degradación del glucógeno, mientras la fosforilación de la glucógeno sintasa (GS-P) la inactiva y de esta manera impide la síntesis de glucógeno.

3.3 Los fosfolípidos de Inositol y sus segundos mensajeros: IP3 y DAG

Los fosfolípidos de inositol (PI) son compuestos minoritarios de las membranas biológicas. Estas moléculas pueden ser fosforiladas bajo estímulo por kinasas específicas hasta fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) (Fig. 6). La activación de estas kinasas puede ser mediada tanto por GPCRs como por RTK, sin embargo nosotros nos centraremos en la mediada por los primeros.

Cuando la hormona entra en contacto con el receptor (p.ej. receptores α -adrenérgicos), éste puede contactar con la proteína G inactiva y activarla. La G_{α_0} activa tiene capacidad para contactar y activar una proteína anclada a la cara interna de la membrana plasmática; la fosfolipasa C (PLC). Existen varias isoformas de PLC: la PLC- β , la PLC- γ y la PLC- δ . La PLC- β es la que se activa en este caso que nos ocupa.

El sustrato de la PLC- β es el PIP2. El enzima hidroliza este fosfolípido justo en el enlace éster que conecta el fosfato con el glicerol, de esta acción resultan dos productos; el Diacilglicerol (DAG) y el Inositol 1,4,5 Trifosfato (IP3). El DAG permanece en la capa interna de la membrana, mientras el IP3 que es una molécula hidrófila difunde al citosol celular, donde va a actuar como ligando regulador de un canal de calcio (Ca^{+2}), se une a este canal abriéndolo y el Ca^{+2} sale del retículo endoplasmático u otras vesículas intracelulares que almacenen este ión, hacia el citosol. La subida momentánea del Ca^{+2} citosólico va a promover la incrustación de un enzima, la PKC (Proteína Kinasa dependiente de Calcio), a la cara citosólica de la membrana plasmática (Figura 7). En esta situación, la PKC puede ser activada por el DAG y de esta manera fosforilar a sustratos proteicos específicos en residuos de serina o treonina.

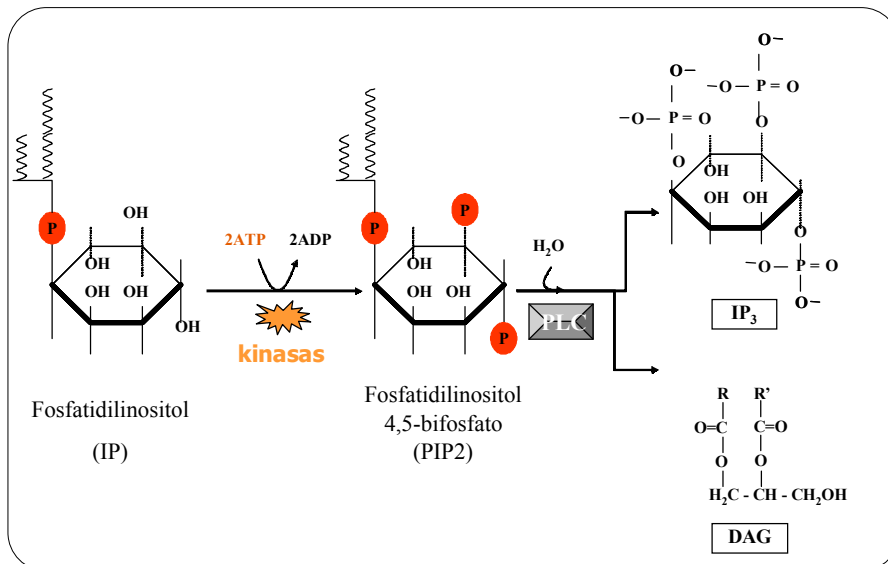


Figura 6. FOSFOLÍPIDOS DE INOSITOL MODIFICADOS POR KINASAS

Algunos fosfolípidos de inositol situados adyacentes a la membrana plasmática, pueden ser modificados por acción conjunta de kinasas y fosfatasas incrementando la concentración en la membrana de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Esta molécula es el sustrato principal de La PLC- β .

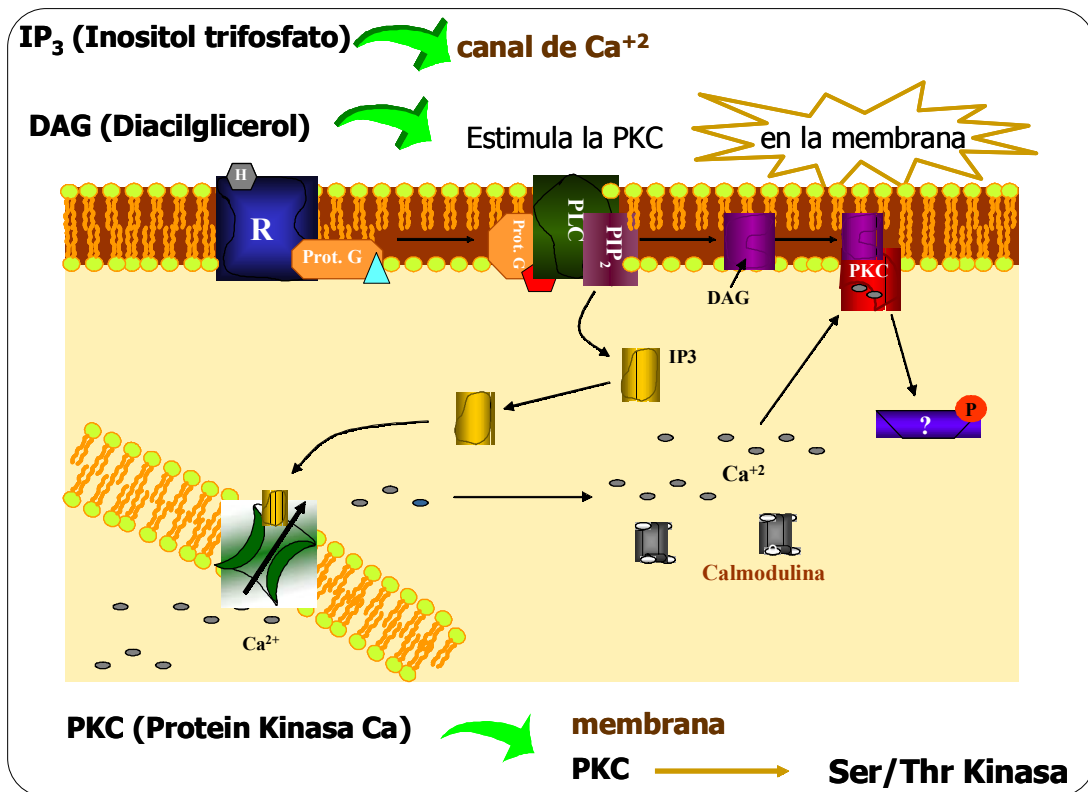


Figura 7. ACTUACIÓN DEL DAG E IP₃ COMO SEGUNDOS MENSAJEROS.

El Diacilglicerol (DAG) y el Inositol 1,4,5 Trifosfato (IP₃) constituyen junto con el AMPc y el Ca²⁺ las moléculas más utilizadas como segundos mensajeros en las rutas de transducción de señales. El IP₃ actúa regulando un canal de Ca²⁺ de forma que favorece el aumento de la concentración de este catión en el citosol celular. El calcio, entre otras cosas facilita la incrustación de la PKC en la membrana plasmática, donde puede ser activada por el DAG.

3.4 Calmodulina. Importancia de la concentración citosólica de Ca²⁺

El calcio no sólo actúa sobre la PKC, también ejerce sus propias acciones sobre las células dianas, y esto lo hace principalmente a través de la unión y regulación de la calmodulina (CaM). La calmodulina es una pequeña proteína citosólica, ubicua y que muestra una actividad, como su propio nombre indica, regulada por calcio. Se encuentra constituida por una sola cadena polipeptídica y fija Ca²⁺ con una alta afinidad (4 iones de calcio por molécula). La calmodulina une calcio de forma cooperativa, lo que significa que pequeñas variaciones en la concentración del ión se traducen en una gran actividad de la proteína.

El complejo Ca²⁺-calmodulina, al igual que ocurre en otras rutas, activa una serie de kinasas que en última instancia fosforilan factores de transcripción, que regulan la expresión génica. La enzima fosfodiesterasa de AMPc anteriormente descrita, se haya bajo regulación por parte de este complejo, lo que vendría a significar un nexo de unión entre la actuación de dos segundos mensajeros, el calcio y el AMPc.

Otro aspecto interesante de el complejo Ca^{+2} -calmodulina es su participación en la producción de GMPc, otro segundo mensajero que durante años ha sido relegado por el AMPc. Hacia finales de los 80, el óxido nítrico (NO) fue descrito como una molécula de señalización. Esta vía discurre a través de una guanilato ciclasa citosólica que podemos encontrar, por ejemplo, en las células del músculo liso. El aumento de calcio que se produce por acción de la AcCo en tejidos adyacentes, lleva a la activación de la calmodulina, que a su vez estimula la actividad de la NO sintasa produciéndose NO. El NO difunde hasta las células del músculo uniéndose y activando a la guanilato ciclasa. Como consecuencia, se incrementan los niveles de GMPc en la célula, produciéndose relajación y vasodilatación. El GMPc actúa sobre proteínas kinasas específicas de GMPc (PKGs).

4. RECEPTORES DE MEMBRANA LIGADOS A ENZIMAS

Los receptores de membrana ligados a enzimas tienen la particularidad de tener actividad de receptor en el dominio extracelular de su molécula, y actividad enzimática en el dominio intracelular o citosólico. Generalmente, están constituidos por una sola cadena peptídica y presentan dos estados conformacionales; en ausencia de molécula de señalización, el enzima está inactivo, en el otro estado, la unión al mediador produce un cambio conformacional en el receptor que activa a la enzima.

Hay cuatro tipos de receptores, receptores con actividad tirosina-kinasa, receptores con actividad tirosina-fosfatasa, receptores con actividad serina/treonina-kinasa y receptores con actividad guanato-ciclasa, siendo los más importante, con diferencia, el grupo de receptores tirosina-kinasa.

4.1 Receptores con actividad tirosina kinasa. Autofosforilación

Los receptores tirosina-kinasa tienen una gran importancia fisiológica mediando funciones vitales para la célula como la regulación de la proliferación y diferenciación, supervivencia y modulación del metabolismo celular. Decenas de moléculas de señalización funcionan con este tipo de receptores, entre ellas abundan factores de crecimiento y citoquinas (Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)) así como también utilizan estos receptores algunas hormonas importantes (p.ej. eritropoietina, insulina, hormona de crecimiento, prolactina...etc.) .

Los receptores tirosina-kinasa, como hemos señalado anteriormente, están constituidos por una sola cadena polipeptídica que presenta un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio intracelular con actividad catalítica tirosina-kinasa, unidos mediante un dominio transmembranal.

En ausencia del ligando, el receptor se halla (generalmente) en estado de monómero y sin actividad enzimática. La llegada del estímulo, promueve la dimerización del receptor, lo que provoca un cambio conformacional que activa al dominio catalítico. El primer sustrato de la enzima son ciertos residuos tirosina (Tyr) del dominio citosólico de su compañero en el dímero, a los que fosforila. Este proceso se conoce como autofosforilación. En este estado, el receptor es capaz de fosforilar en Tyr a

otros sustratos específicos. Los RTK pueden encontrarse en estado basal formando dímeros o tetrámeros, pero requieren la presencia de ligando para llevar a cabo su autofosforilación, pues es éste el que provoca el cambio conformacional en el receptor, necesario para iniciar la actividad enzimática.

4.2 Proteínas adaptadoras

Una característica común de los RTK es que necesitan la colaboración de ciertas moléculas adaptadoras, que hagan posible su conexión con las proteínas G que utiliza en su ruta de señalización. Estas proteínas adaptadoras tienen la particularidad de poseer dominios que sirven para el reconocimiento o acoplamiento de una o varias proteínas. En el caso que nos ocupa, el RTK fosforilado puede reconocer proteínas con dominio SH2 (*src homology 2 domain*), entre estos sustratos se encuentran la PLC- γ (isoforma de la PLC- β mencionada en la ruta de los fosfatilinosoles), la PI3-Kinasa (que fosforila inosoles de membrana), GAP (proteínas que intervienen en la regulación de Ras y que estudiaremos a continuación) y GRB2.

Mención especial merece GRB2, que es la adaptadora por excelencia utilizada por este tipo de receptores. GRB2 además de los dominios SH2 mediante los cuales es reconocida por el RTK activado, posee dos dominios SH3 de reconocimiento a la proteína Sos (Sos es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), otra proteína reguladora de Ras). La activación del receptor hace posible la relocalización de Sos desde el citosol a la proximidad de la membrana con la formación del complejo RTK-GRB2-Sos, haciendo posible su interacción con su sustrato, en este caso la proteína G monomérica Ras.

4.3 Ras

Hemos elegido esta proteína por ser la más comúnmente utilizada en la señalización por RTK. La proteína Ras, al igual que ocurre con las otras proteínas G, cicla entre un estado inactivo unida a GDP y un estado activo unida a GTP, pero además posee cierta capacidad de intercambiar GDP por GTP, y capacidad intrínseca GTPasa, es decir, capacidad de hidrolizar GTP hasta GDP. En este ciclo juegan un papel fundamental tres grupos de proteínas. La unión al GTP es promovida por las GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina). En menor medida se ha visto también que la activación se produce como consecuencia de la fosforilación por ciertas serina/treonina kinasas. Si bien las proteínas Ras poseen capacidad de hidrolizar el GTP a GDP, esta actividad enzimática es baja. La actividad GTPasa se estimula por acción de las proteínas GAP (proteínas activadores de la actividad GTPasa) (Fig. 8). Por último, las proteínas GDIs, o proteínas inhibidoras de la disociación de los nucleótidos de guanina, aunque se unen tanto a la forma activa como a la inactiva, tienen mayor afinidad por la unida a GDP estabilizando a la proteína en su forma inactiva

Cuando el complejo GRB2-Sos contacta con Ras, provoca un cambio conformacional en la proteína que facilita la difusión de GDP y entrada en su lugar de GTP, de manera que Ras GTP puede

activar a sus sustratos. Entre estos hemos elegido para su estudio la ruta de la MAP kinasas.

4.4 MAP Kinasas como efectoras de Ras

Ras en su estado activo contacta con el extremo N-terminal de una serina/treonina kinasa denominada Raf. Raf activa y fosforila a MEK, una tirosina/serina-kinasa que a su vez fosforila a MAP kinasa. MAPK en su estado activo trasloca al núcleo, donde modula la transcripción de uno o varios genes específicos mediante fosforilación de residuos serina/treonina de factores de factores de transcripción (Fig. 9).

Existen en las células otras proteínas funcionalmente equivalentes a éstas, entre las que se incluye *Jun N-terminal kinasa* (JNK) y la p38 kinasa. En conjunto la familia de MAP kinasas son serina/treonina kinasas que se activan en el citosol celular en respuesta a un estímulo interno y que se

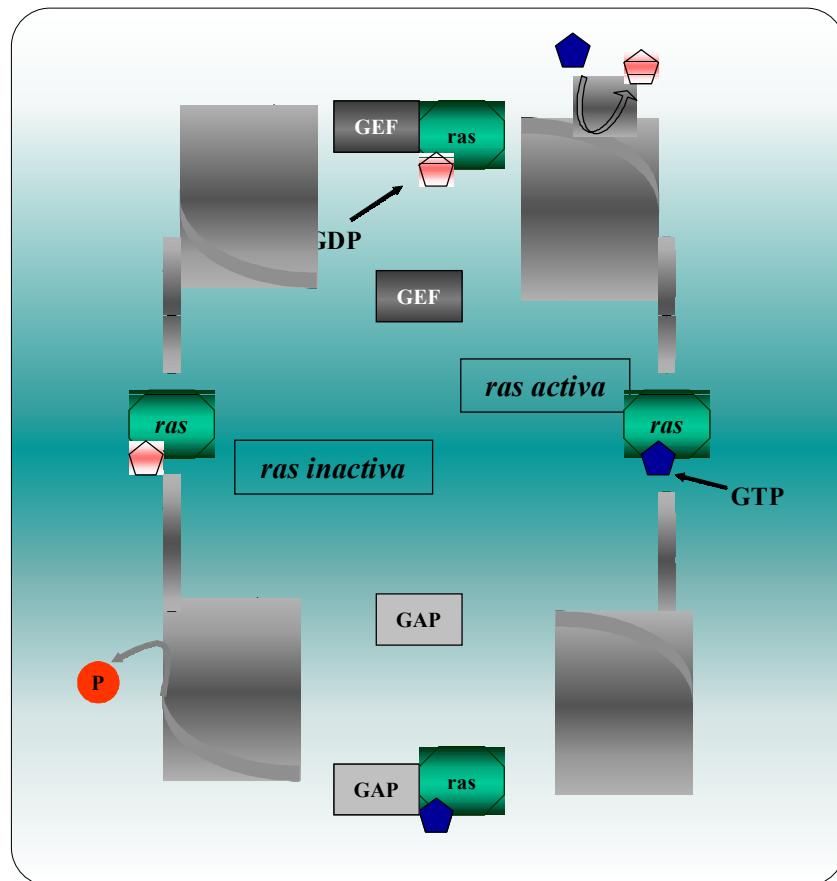


Figura 8. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GTPasa RAS

En la regulación de la actividad de Ras, tres familias de proteínas juegan un importante papel en el mantenimiento del equilibrio actividad/inactividad. Las familia de Ras-GEFs favorece la unión a GTP, mientras las Ras-GAP son proteínas activadores de la actividad GTPasa. El tercer grupo implicado en esta regulación son las GDIs, o proteínas inhibidoras de la disociación de los nucleótidos de guanina, que pueden unirse tanto a la forma activa como a la inactiva, pero muestran una mayor afinidad por la unida a GDP, por tanto, estabilizando a la proteína en su forma inactiva

traslocan al núcleo para mediar la respuesta celular específica. No podemos olvidar otras proteínas que intervienen en esta cascada, como Ksr y 14-3-3, que tienen su protagonismo en la formación de complejos entre Raf y las MAP kinasas, pero cuyo mecanismo de actuación exacto permanece sin elucidar.

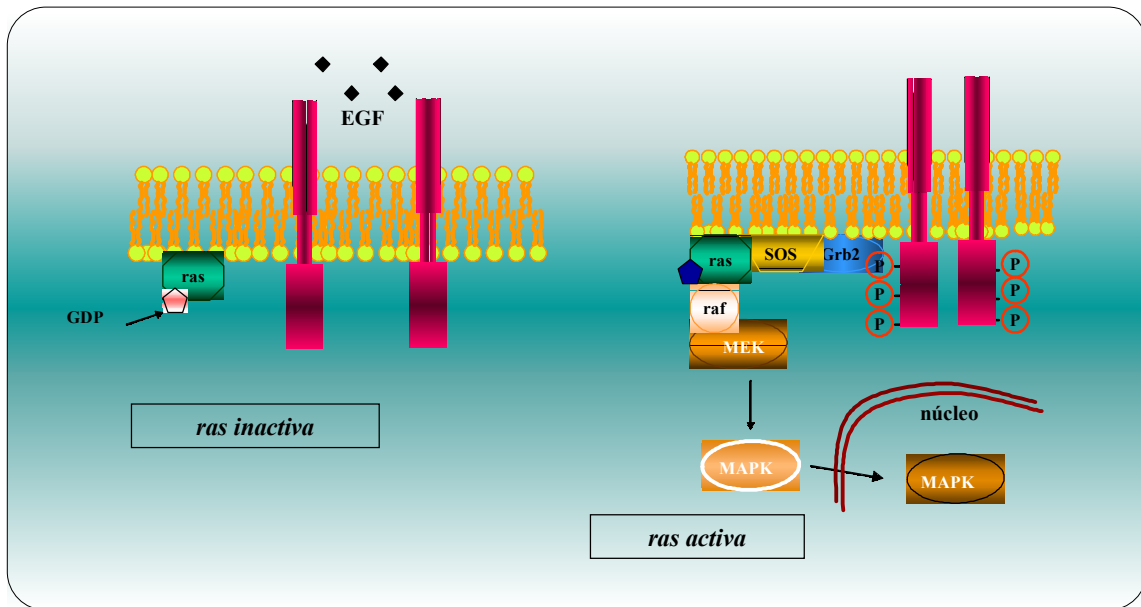


Figura 9. RUTA DE LAS MAPK COMO EFECTORAS DE RAS

Con la unión de ligando a los receptores tirosina kinasa, una serie de eventos llevan a la activación de entre otras la GTPasa Ras. En este esquema podemos se ilustra una de las cascadas más utilizadas por Ras para la transducción de la señal hasta el núcleo celular, la ruta de las MAPK.

4.5 Receptor de Insulina y Receptor de la Hormona de Crecimiento

Del modelo estudiado para el funcionamiento de los RTK podemos encontrar dos variaciones:

- El Receptor de Insulina es un tetrámero formado por dos subunidades α y dos subunidades β . Las α son completamente extracelulares y están unidas a las por puentes disulfuro. Las subunidades β atraviesan la membrana y tienen un dominio intracelular con actividad tirosina-kinasa. Cuando la insulina se une a su receptor le produce un cambio conformacional que activa el dominio citosólico mediante autofosforilación. La mayor diferencia con lo anteriormente descrito, estriba en que este receptor utiliza un sustrato intermedio llamado IRS-1, recientemente descubierto, que no tiene regiones SH2. Este sustrato una vez activado, si es capaz de unirse a otros sustratos típicos de estos receptores, (es decir sustratos que tienen SH2) y de los que dependerá la respuesta celular que se produzca. Entre estos sustratos se encuentra la

Grb2 y PI3K, entre otros.

- El **Receptor de la Hormona de Crecimiento** (GHR) se engloba en un tipo de receptor sin actividad tirosina-kinasa intrínseca. En este caso, la llegada del ligando produce la dimerización y cambio conformacional del receptor. En estas condiciones el receptor contacta con una proteína que tiene actividad tirosina-kinasa, proteína JAK. La formación del complejo receptor-JAK hace que ésta se active y fosforila al receptor en residuos de Tyr. Cuando el receptor se encuentra fosforilado, ya puede ser reconocido por sustratos con regiones SH2 y promover su fosforilación. La proteína que se encarga de fosforilar es siempre la JAK, que además puede tener sus propios sustratos. También se encuentra en este grupo el receptor de prolactina.

5. RECEPTORES INTRACELULARES

Con anterioridad hemos mencionado que las moléculas hidrofóbicas tienen receptores intracelulares localizados en el citosol o en el núcleo. El grupo más importante de estas moléculas son aquellas que tienen estructura esteroidea y que incluyen a las hormonas sexuales masculinas y femeninas, producidas en testículo y ovario respectivamente, testosterona, estradiol y progesterona y las producidas por las glándulas suprarrenales, como el cortisol. También se encuentran en este grupo la vitamina D₃, el ácido retinoico y las hormonas tiroideas (la T₃).

Al repaso en profundidad del mecanismo molecular de este tipo de señalización nos referiremos en otros capítulos y es por ello que en esta sección, sólo introduciremos los principios básicos del mismo.

Debido a su composición, la hormona puede difundir con cierta libertad a través de la membrana plasmática y unirse a su receptor en el interior celular. Como se aprecia en la Figura 10, el ligando puede unirse a su receptor tanto en el citosol como en el núcleo celular, siguiendo esta unión pautas semejante. Si el receptor es citosólico, por ejemplo, el complejo H R difunde al núcleo y ejerce allí su acción. El receptor es un factor de transcripción, que se activa por ligando, por tanto el complejo H R se va a unir al ADN y va a regular la transcripción de ciertas proteínas específicas. Estas proteínas constituyen la respuesta celular.

Todos los receptores de las hormonas esteroideas o similares, tienen un diseño muy parecido y forman una gran familia de receptores. Estos receptores presentan un lugar de unión a la hormona, un lugar de unión al ADN y una región de transactivación que modula la efectividad con que puede unirse al ADN y, por tanto, potenciar la transcripción.

6. CONCLUSIÓN

Para terminar debemos señalar que en el transcurso de este capítulo, hemos intentado simplificar al máximo los aspectos más relevantes de la señalización. Para ello hemos agrupado los receptores de

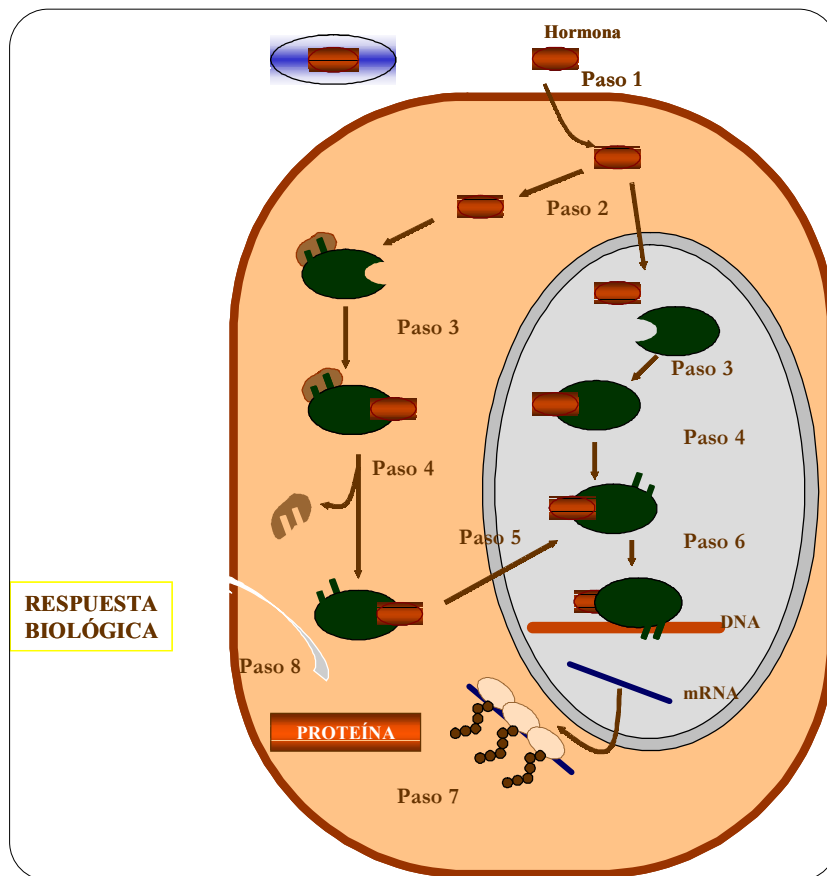


Figura 10. ESQUEMA DE SEÑALIZACIÓN MEDIANTE RECEPTORES INTRACELULARES

Se muestra un breve esquema de la unión de hormonas a receptores intracelulares. En este concepto se profundizará en otros capítulos.

estos "transmisores" de información (hormonas, citoquinas, neurotransmisores...etc) en grupos que nos permitieran ejemplificar su modelos de actuación con un caso concreto. A estos ejemplos particulares elegidos, le hemos asignado un tipo de proteína transductora, una serie de segundos mensajeros producidos en estas rutas y si acaso también hemos pasado muy superficialmente por el papel de otras moléculas que funcionan como adaptadores y reguladores de estas cascadas.

Teniendo esto en mente, y con la síntesis que aquí se intenta ofrecer, podemos hacer frente a la cruda realidad, y la realidad es otra, la célula no es simplista y nos ofrece una maquinaria de señalización estrictamente afinada, en la que un transmisor puede unirse a varios tipos de receptores, o el mismo receptor en un contexto tisular dado puede desencadenar una respuesta distinta, con rutas que divergen o se cruzan en la producción de segundos mensajeros, que a su vez pueden modular la producción de otras moléculas...etc. A esto podemos sumarle evidencias en las que no hemos recalado, como el hecho de que todos estas rutas dependen de la biología del estímulo (síntesis y vida media de

la hormona) y del número y funcionalidad de los receptores para estas moléculas.

En fin, solamente hemos pretendido que todo un mundo apasionante para el estudio de la vida celular, quede abierto a partir de aquí para la curiosidad del lector.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 *Lodish H.; Berk A.; Zipursky L.S.; Matsudaira P.; Baltimore D. y Darnell J.(2000) Molecular Cell Biology, 4ª ed. W.H. Freeman & Co. (link PubMed)*
- 2 *Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). Biología molecular de la célula, 3ª ed. Omega. .*
- 3 *Devlin, T.M. (1999) Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas, 3ª ed. Reverté. Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. (2002). Bioquímica, 3ª ed. Pearson Educación (2ª ed., 1998, McGraw-Hill Interamericana)*
- 4 *Lehninger A.L.; Nelson D.L.; Cox M.M.(1993) Principios de Bioquímica. 2ª ed. Omega.*



ICIC



www.biocancer.com

BIOLOGÍA Y CLÍNICA DEL CÁNCER
Revista Virtual de Formación en Oncología
Nº 2 – Año 2004