

## PARTE 4 Regulación Celular

### 16 Señalización Celular

Todas las células reciben y responden a señales de su entorno. Incluso las bacterias más simples sienten y nadan hacia altas concentraciones de nutrientes, como glucosa o aminoácidos. Muchas bacterias y eucariotas unicelulares también responden a moléculas de señalización secretadas por otras células, lo que permite la comunicación célula-célula. El apareamiento entre células de levadura, por ejemplo, es señalado por péptidos que son secretados por una célula y se unen a receptores en la superficie de otra. En organismos multicelulares, sin embargo, la comunicación célula-célula alcanza su mayor nivel de sofisticación. Mientras que las células de procariotas y eucariotas unicelulares son en gran medida autónomas, el comportamiento de cada célula individual en plantas y animales multicelulares debe ser cuidadosamente regulado para satisfacer las necesidades del organismo en su conjunto. Esto se logra mediante una variedad de moléculas de señalización que son secretadas o expresadas en la superficie de una célula y se unen a receptores expresados por otras células, integrando y coordinando así las funciones de las muchas células individuales que componen organismos tan complejos como los seres humanos.

La unión de la mayoría de las moléculas de señalización a sus receptores inicia una serie de reacciones intracelulares que regulan prácticamente todos los aspectos del comportamiento celular, incluyendo metabolismo, movimiento, proliferación, supervivencia y diferenciación. Comprender los componentes moleculares de estas vías de señalización intracelular y cómo se regulan se ha convertido en un área importante de investigación en la biología celular contemporánea. El interés en esta área se ve aún más incrementado por el hecho de que muchos cánceres surgen como resultado de una falla en las vías de señalización que controlan la proliferación y supervivencia celular. De hecho, muchos de nuestros conocimientos actuales sobre los mecanismos de señalización celular provienen del estudio de células cancerosas, un ejemplo sorprendente de la fructífera interacción entre la medicina y la investigación básica en biología celular y molecular.

Las células utilizan una amplia y compleja variedad de diferentes vías de señalización. En este capítulo se discuten algunas de estas vías, con el objetivo de introducir los principios de la señalización celular.

#### 16.1 Moléculas de Señalización y Sus Receptores

**OBJETIVOS DE APRENDIZAJE** 16.1.1 Describir los modos principales de señalización celular.

16.1.2 Explicar cómo las hormonas esteroides regulan la expresión génica.

16.1.3 Comparar las acciones de diferentes tipos de pequeñas moléculas de señalización.

16.1.4 Dar ejemplos de factores de crecimiento polipeptídicos.

Muchas clases diferentes de moléculas transmiten información entre las células de organismos multicelulares. Todas estas moléculas actúan como ligandos que se unen a receptores expresados por sus células objetivo; sin embargo, existe una considerable variación en la composición y estructura de las moléculas de señalización, sus efectos en las células objetivo y los mecanismos a través de los cuales inducen esos efectos. En términos de

#### Contenido del Capítulo

- 16.1 Moléculas de Señalización y Sus Receptores
- 16.2 Proteínas G y AMP cíclico
- 16.3 Tirosina Quinasas y Señalización por las Vías MAP Quinasa y PI 3-Quinasa
- 16.4 Receptores Acoplados a Factores de Transcripción
- 16.5 Dinámicas y Redes de Señalización

**EXPERIMENTO CLAVE** - Receptores Acoplados a Proteínas G y Detección de Olores

Figura 16.1

Figure 1: Figura 16.1

## **MEDICINA MOLECULAR - Cáncer: Transducción de Señales y los Oncogenes ras# Capítulo 16 Señalización Celular**

composición y estructura, las moléculas de señalización utilizadas por plantas y animales varían desde gases simples hasta lípidos y proteínas. Algunas de estas moléculas llevan señales a largas distancias, mientras que otras actúan localmente para transmitir información entre células vecinas. Los efectos de las moléculas de señalización varían desde inducir la proliferación celular hasta proteger contra la muerte celular (es decir, promoviendo la supervivencia celular) o impulsando la diferenciación en tipos celulares particulares. En términos de mecanismos, algunas moléculas de señalización son capaces de cruzar la membrana plasmática y unirse a receptores intracelulares en el citoplasma o el núcleo, mientras que la mayoría se une a receptores expresados en la superficie celular objetivo. Esta sección discute los principales tipos de moléculas de señalización y algunos de los receptores intracelulares con los que interactúan. La discusión subsiguiente en este capítulo se centra en los receptores de superficie celular y las vías de señalización descendentes que regulan el comportamiento celular.

### **Modos de señalización célula-célula**

La señalización célula-célula puede resultar ya sea de la interacción directa de una célula con su vecina o de la acción de moléculas de señalización secretadas (Figura 16.1). La señalización por contacto directo célula-célula (o célula-matriz) juega un papel crítico en la regulación del comportamiento de las células en los tejidos animales. Por ejemplo, las integrinas y cadherinas (discutidas en el capítulo anterior) funcionan no solo como moléculas de adhesión celular, sino también como moléculas de señalización que regulan la proliferación y supervivencia en respuesta a interacciones célula-célula y célula-matriz. Además, las células expresan una variedad de proteínas que funcionan como receptores de superficie celular que interactúan con moléculas de señalización en la superficie de las células vecinas. La señalización a través de tales interacciones célula-célula juega un papel crítico en la regulación de las numerosas interacciones entre diferentes tipos de células que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de los tejidos adultos.

Las múltiples variedades de señalización por moléculas secretadas se dividen en tres categorías generales basadas en la distancia sobre la cual se transmiten las señales. En la señalización endocrina, las moléculas de señalización (hormonas) son secretadas por células endocrinas especializadas y transportadas a través de la circulación para actuar sobre células objetivo en sitios distantes. Un caso clásico es proporcionado por la hormona esteroide estrógeno, que es producida por los ovarios y estimula el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductivo femenino y las características sexuales secundarias. En los mamíferos, más de 50 hormonas diferentes son producidas por glándulas endocrinas, incluyendo la hipófisis, la tiroides, las paratiroides, el páncreas, las glándulas suprarrenales y las gónadas.

En contraste con las hormonas, algunas moléculas de señalización actúan localmente para afectar el comportamiento de células vecinas, referidas como señalización paracrina. En este modo, una molécula liberada por una célula actúa sobre células vecinas objetivo. Un ejemplo es proporcionado por la acción de neurotransmisores en la transmisión de señales entre células nerviosas en una sinapsis, como se discute en el Capítulo 14 (ver Figura 14.18). Finalmente, algunas células responden a moléculas de señalización que ellas mismas producen. Un ejemplo importante de tal señalización autocrina es la respuesta de las células T del sistema inmunitario vertebrado a antígenos extraños. Ciertos tipos de linfocitos T responden a la estimulación antigénica sintetizando un factor de crecimiento que impulsa su propia proliferación, aumentando así el número de linfocitos T de respuesta y amplificando la respuesta inmunitaria. También es notable que la señalización autocrina anormal frecuentemente contribuye al crecimiento descontrolado de células cancerosas.

**FIGURA 16.1 Modos de señalización célula-célula** La señalización celular puede tener lugar a través

FIGURE 16.2

Figure 2: FIGURE 16.2

de (A) contactos directos célula-célula o (B) la acción de moléculas de señalización secretadas. En la señalización endocrina, las hormonas son transportadas a través del sistema circulatorio para actuar sobre células objetivo distantes. En la señalización paracrina, una molécula liberada de una célula actúa localmente sobre células objetivo vecinas. En la señalización autocrina, una célula produce una molécula de señalización a la cual también responde. # 16.1 Signaling Molecules and Their Receptors

El crecimiento de las células cancerosas (ver Capítulo 19). En esta situación, una célula cancerosa produce un factor de crecimiento que promueve la división celular a la que también responde, produciendo continuamente su propia división no regulada.

## Hormonas esteroides y la superfamilia de receptores nucleares

Como ya se mencionó, todas las moléculas de señalización actúan al unirse a receptores de proteínas expresados por sus células objetivo. En muchos casos, estos receptores se expresan en la superficie de la célula objetivo, pero algunos receptores son proteínas intracelulares ubicadas en el citosol o en el núcleo. Estos receptores intracelulares responden a pequeñas moléculas de señalización hidrofóbicas que son capaces de difundirse a través de la membrana plasmática. Las hormonas esteroides son los ejemplos clásicos de este grupo de moléculas de señalización, que también incluye la hormona tiroidea, la vitamina D<sub>3</sub> y el ácido retinoico (FIGURA 16.2).

Las hormonas esteroides (incluyendo testosterona, estrógeno, progesterona y los corticosteroides) son todas sintetizadas a partir del colesterol. La testosterona, el estrógeno y la progesterona son las hormonas sexuales, que son producidas por las gónadas. Los corticosteroides, incluyendo los glucocorticoides, son producidos por la glándula suprarrenal. Actúan en una variedad de células para estimular la producción de glucosa.

Aunque la hormona tiroidea, la vitamina D<sub>3</sub> y el ácido retinoico son estructural y funcionalmente distintos de los esteroides, comparten un mecanismo común de acción en sus células objetivo. La hormona tiroidea se sintetiza a partir de la tirosina en la glándula tiroidea; juega papeles importantes en el desarrollo y la regulación del metabolismo. La vitamina D<sub>3</sub> regula el metabolismo del Ca<sup>2+</sup> y el crecimiento óseo. El ácido retinoico y los compuestos relacionados (retinoides) sintetizados a partir de la vitamina A juegan papeles importantes en el desarrollo de los vertebrados.

Debido a su carácter hidrofóbico, las hormonas esteroides son capaces de entrar en las células difundiendo a través de la membrana plasmática. El paso de las hormonas tiroideas a través de la membrana plasmática es facilitado por proteínas transportadoras. Una vez dentro de la célula, los esteroides, la hormona tiroidea, la vitamina D<sub>3</sub> y el ácido retinoico se unen a receptores intracelulares que son expresados por las células objetivo hormonalmente sensibles. Estos receptores, que son miembros de una familia de proteínas conocida como la superfamilia de receptores nucleares, son factores de transcripción que

**FIGURA 16.2** Estructura de las hormonas esteroides, la hormona tiroidea, la vitamina D<sub>3</sub> y el ácido retinoico. Los esteroides incluyen las seis hormonas sexuales (testosterona, estrógeno y progesterona) y los glucocorticoides.

Testosterona	Estradiol (un estrógeno)	Progesterona	Cortisol (un glucocorticoide)
Testosterona	Estradiol	Progesterona	Cortisol
Hormona tiroidea	Vitamina D <sub>3</sub>	Ácido retinoico	
Hormona tiroidea	Vitamina D <sub>3</sub>	Ácido retinoico	

## Glucocorticoid action

Figure 3: Glucocorticoid action

### Acción de los glucocorticoides

Figure 4: Acción de los glucocorticoides

Las moléculas de señalización secretadas pueden viajar largas distancias, actuar en células adyacentes o actuar en la célula que las produce.

Las hormonas esteroides se difunden a través de la membrana plasmática y se unen a factores de transcripción dentro de sus células objetivo. contain related domains for ligand binding, DNA binding, and transcriptional activation. Ligand binding regulates their function as activators or repressors of their target genes, so the steroid hormones and related molecules directly regulate gene expression.

Ligand binding has distinct effects on different receptors. Some members of the nuclear receptor superfamily are inactive in the absence of hormone. Glucocorticoid receptor, for example, is sequestered in the cytosol in complex with Hsp90 chaperones in the absence of hormone (FIGURE 16.3). Glucocorticoid binding induces conformational changes that displace Hsp90 and expose two nuclear localization signals (see Figures 10.9 and 10.10), in turn causing nuclear import of the receptor as dimers, where they bind regulatory DNA sequences and activate transcription of target genes. Other nuclear receptors bind DNA in either the presence or absence of hormone, but hormone binding alters their activity as transcriptional regulatory molecules. For example, in the absence of hormone, thyroid hormone receptor is associated with a corepressor complex and represses transcription of its target genes (FIGURE 16.4). Hormone binding induces a conformational change that disrupts receptor interactions with the corepressors while promoting its interactions with coactivators, leading to transcriptional activation of thyroid hormone-inducible genes.

**FIGURE 16.3 Glucocorticoid action.** Glucocorticoids diffuse across the plasma membrane and bind to the glucocorticoid receptor. In the absence of ligand, the receptor is bound to Hsp90 in the cytoplasm. Glucocorticoid binding causes conformational changes that displace the receptor from Hsp90 and expose nuclear localization signals, allowing nuclear import as receptor dimers. The activated receptors then bind recognition sites in DNA and associate with coactivators with histone acetyltransferase (HAT) activity to stimulate transcription of their target genes.

## Capítulo 16 Señalización Celular

contienen dominios relacionados para la unión de ligandos, la unión al ADN y la activación transcripcional. La unión de ligandos regula su función como activadores o represores de sus genes diana, por lo que las hormonas esteroides y las moléculas relacionadas regulan directamente la expresión génica.

La unión de ligandos tiene efectos distintos en diferentes receptores. Algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares están inactivos en ausencia de hormona. El receptor de glucocorticoides, por ejemplo, está secuestrado en el citosol en complejo con chaperonas Hsp90 en ausencia de hormona (FIGURA 16.3). La unión de glucocorticoides induce cambios conformacionales que desplazan a Hsp90 y exponen dos señales de localización nuclear (ver Figuras 10.9 y 10.10), provocando a su vez la importación nuclear del receptor como dímeros, donde se unen a secuencias reguladoras de ADN y activan la transcripción de genes diana. Otros receptores nucleares se unen al ADN en presencia o ausencia de hormona, pero la unión de la hormona altera su actividad como moléculas reguladoras de la transcripción. Por ejemplo, en ausencia de hormona, el receptor de hormona tiroidea está asociado con un complejo correpressor y reprime la transcripción de sus genes diana (FIGURA 16.4). La unión de la hormona induce un cambio conformacional que interrumpe las interacciones del receptor con los correpresores mientras promueve sus interacciones con coactivadores, lo que lleva a la activación transcripcional de genes inducibles por la hormona tiroidea.

**FIGURA 16.3 Acción de los glucocorticoides.** Los glucocorticoides difunden a través de la membrana

## Gene regulation by the thyroid hormone receptor

Figure 5: Gene regulation by the thyroid hormone receptor

plasmática y se unen al receptor de glucocorticoides. En ausencia de ligando, el receptor está unido a Hsp90 en el citoplasma. La unión de glucocorticoides provoca cambios conformacionales que desplazan al receptor de Hsp90 y exponen señales de localización nuclear, permitiendo la importación nuclear como dímeros de receptores. Los receptores activados luego se unen a sitios de reconocimiento en el ADN y se asocian con coactivadores con actividad de histona acetiltransferasa (HAT) para estimular la transcripción de sus genes diana. # 16.1 Signaling Molecules and Their Receptors

**FIGURE 16.4** Gene regulation by the thyroid hormone receptor Thyroid hormone receptor binds its recognition sites in DNA in the presence or absence of hormone. In the absence of hormone, the receptor associates with corepressors with histone deacetylase (HDAC) activity, resulting in repression of target gene expression. When thyroid hormone is present, it binds the receptor, inducing conformational changes that displace the corepressors and cause association with coactivators with histone acetyltransferase (HAT) activity, resulting in target gene expression.

## Signaling by other small molecules

Several other small molecules, in addition to the steroid hormones, also serve to transmit signals between cells (FIGURE 16.5). The simple gas nitric oxide (NO) is a major paracrine signaling molecule in the nervous, immune, and circulatory systems. Like the steroid hormones, NO is able to diffuse directly across the plasma membrane of its target cells. The molecular basis of NO action, however, is distinct from that of the steroids; rather than binding to a receptor that regulates transcription, NO alters the activity of the intracellular target enzyme guanylyl cyclase, stimulating synthesis of cyclic GMP inside the cell. A well-characterized example of NO action is signaling the dilation of blood vessels. The first step in this process is the release of neurotransmitters, such as acetylcholine, from the termini of nerve cells in the

**Nitric oxide is a paracrine signaling molecule in the nervous system.**

Molecule	Structure
<b>Nitric oxide</b>	NO
<b>Glutamate</b>	Glutamate structure
<b>Acetylcholine</b>	Acetylcholine structure
<b><math>\gamma</math>-Aminobutyric acid (GABA)</b>	GABA structure
<b>Indole-3-acetic acid (an auxin)</b>	Indole-3-acetic acid structure

**FIGURE 16.5** Small signaling molecules Small molecules involved in cell signaling include the gas nitric oxide, glutamate, neurotransmitters such as acetylcholine, and  $\gamma$ -aminobutyric acid, as well as plant hormones such as auxins. # Capítulo 16 Señalización Celular

Los neurotransmisores actúan sobre las células endoteliales para estimular la síntesis de NO. Luego, el NO difunde a las células musculares lisas vecinas donde activa la guanilil ciclase, lo que resulta en la síntesis de cGMP, que induce la relajación del músculo liso y la dilatación de los vasos sanguíneos. El NO, por ejemplo, es responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos que conduce a la erección del pene. También es interesante notar que el valor médico de la nitroglicerina en el tratamiento de enfermedades cardíacas se basa en su conversión a NO, que dilata los vasos sanguíneos y aumenta el flujo sanguíneo al corazón.

Como se discutió en el Capítulo 14, los neurotransmisores llevan señales entre neuronas o desde neuronas a otros tipos de células objetivo (como las células musculares). Son un grupo diverso de pequeñas moléculas hidrofílicas que incluyen glutamato, acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico (GABA) (ver Figura 16.5). La liberación de neurotransmisores es señalada por la llegada de un potencial de acción al término de una

neurona (ver Figura 14.16). Los neurotransmisores luego difunden a través de la hendidura sináptica para actuar sobre una célula objetivo. Debido a que los neurotransmisores son hidrofílicos, no pueden cruzar la membrana plasmática de la célula objetivo. Por lo tanto, a diferencia de las hormonas esteroides y el NO, los neurotransmisores actúan uniéndose a receptores en la superficie celular. Muchos receptores de neurotransmisores son canales iónicos ligados a ligandos, como los receptores de glutamato y acetilcolina discutidos en el Capítulo 14 (ver Figuras 14.18 y 14.19). La unión de neurotransmisores a estos receptores induce un cambio conformacional que abre los canales iónicos, lo que resulta directamente en cambios en el flujo de iones en la célula objetivo. Otros receptores de neurotransmisores están acoplados a proteínas G, un grupo importante de moléculas de señalización (discutidas más adelante en la Sección 16.2) que enlazan receptores de superficie a una variedad de respuestas intracelulares. En el caso de los receptores de neurotransmisores, las proteínas G asociadas con frecuencia regulan la apertura de los canales iónicos.

Las hormonas vegetales (ver Figura 16.5) son otro grupo de pequeñas moléculas que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los niveles de estas moléculas en la planta son típicamente modificados por factores ambientales, como la luz o la infección, de modo que coordinan las respuestas de los tejidos en diferentes partes de la planta a las señales ambientales. La primera hormona vegetal que se identificó fue la auxina, con los primeros experimentos que llevaron a su descubrimiento realizados por Charles Darwin en la década de 1880. Uno de los efectos de las auxinas es inducir la elongación de las células vegetales al debilitar la pared celular (ver Figura 15.5). Además, las auxinas regulan muchos otros aspectos del desarrollo de las plantas, incluyendo la división y diferenciación celular. Otras hormonas vegetales también tienen múltiples efectos en sus tejidos objetivo, incluyendo la estimulación de la división celular (citoquininas), la maduración de la fruta (etileno) y el inicio de la latencia (ácido abscísico).

## Hormonas peptídicas y factores de crecimiento

El grupo más amplio de moléculas de señalización en animales son los péptidos, que varían en tamaño desde solo unos pocos hasta más de 100 aminoácidos. Este grupo de moléculas de señalización incluye hormonas peptídicas, neuropéptidos y una diversa gama de factores de crecimiento polipeptídicos. Ejemplos bien conocidos de hormonas peptídicas incluyen la insulina y las hormonas producidas por la glándula pituitaria (hormona del crecimiento, hormona foliculoestimulante, prolactina y otras). Los neuropéptidos incluyen las encefalinas y endorfinas, que han sido ampliamente estudiadas debido a su actividad como analgésicos naturales que disminuyen el dolor en el sistema nervioso central. Descubiertas durante estudios de drogadicción, son naturalmente compuestos que se unen a los mismos receptores en la superficie de las células cerebrales que la morfina.

Los factores de crecimiento polipeptídicos incluyen una variedad de moléculas de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación celular animal. El primero de estos factores, el factor de crecimiento nervioso (NGF), fue descubierto por Rita Levi-Montalcini en la década de 1950. El NGF es miembro de una familia de polipéptidos que regulan el desarrollo y la supervivencia de las neuronas. Durante el curso de experimentos sobre el NGF, Stanley Cohen descubrió serendipitosamente un factor no relacionado, llamado factor de crecimiento epidérmico (EGF), que estimula la proliferación celular. El EGF, un polipéptido de 53 aminoácidos (Figura 16.6), ha servido como

**FIGURE 16.6 Structure of epidermal growth factor (EGF)** EGF is a single polypeptide chain of 53 amino acids. Disulfide bonds between cysteine residues are indicated. (After C. R. Savage Jr., et al. 1973. *J Biol Chem* 248: 7669–7772.)

El prototipo de una gran variedad de factores de crecimiento que juegan roles críticos en el control de la proliferación celular animal, tanto durante el desarrollo embrionario como en organismos adultos.

Un buen ejemplo de la acción de los factores de crecimiento es proporcionado por la actividad del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la cicatrización de heridas. El PDGF se almacena en las plaquetas sanguíneas y se libera durante la coagulación sanguínea en el sitio de una herida. Luego, estimula la proliferación y el movimiento de fibroblastos en la vecindad del coágulo, contribuyendo así a la regeneración del tejido dañado. Además, el PDGF juega un papel crítico en el desarrollo de una variedad de tejidos embrionarios. Miembros de otro gran grupo de factores de crecimiento polipeptídicos

(llamados citoquinas, como la eritropoyetina y la interleucina-2) regulan el desarrollo y la diferenciación de células sanguíneas y controlan las actividades de los linfocitos durante la respuesta inmune. Otros factores de crecimiento polipeptídicos (factores de crecimiento anclados a la membrana) permanecen asociados con la membrana plasmática en lugar de ser secretados en fluidos extracelulares, funcionando así como moléculas de señalización durante las interacciones célula-célula directas.

Las hormonas peptídicas, neuropéptidos y factores de crecimiento no pueden cruzar la membrana plasmática de sus células diana, por lo que actúan uniéndose a receptores de superficie celular, como se discute a lo largo del resto de este capítulo. Como era de esperar, dado el papel crítico de los factores de crecimiento polipeptídicos en el control de la proliferación celular, las anomalías en la señalización de los factores de crecimiento son la base de una variedad de enfermedades, incluidas muchas formas de cáncer. Por ejemplo, la expresión anormal del receptor de EGF es un factor importante en el desarrollo de muchos cánceres humanos, y los inhibidores del receptor de EGF parecen ser agentes prometedores para el tratamiento del cáncer (ver Capítulo 19).

## 16.1 REVISIÓN

- La mayoría de las moléculas de señalización son secretadas por una célula y se unen a receptores expresados por una célula diana.
- La señalización célula-célula puede ocurrir por contacto directo de célula a célula o por endocrina, paracrina y autocrina.
- Las hormonas esteroides, la hormona tiroidea, la vitamina D<sub>3</sub> y el ácido retinoico son pequeñas moléculas hidrofóbicas que cruzan la membrana plasmática de sus células diana y se unen a factores de transcripción intracelulares.
- Otras pequeñas moléculas de señalización incluyen óxido nítrico, neurotransmisores y hormonas vegetales.
- La diversidad de tipos de moléculas de señalización en animales son péptidos, que van desde solo unos pocos a más de 100 aminoácidos. Este grupo de moléculas incluye los factores de crecimiento que regulan el desarrollo y crecimiento celular animal.

## LEARNING OBJECTIVES

**16.2.1** Diagram the structure of a G protein-coupled receptor.

**16.2.2** Explain how G proteins carry signals to their target enzymes.

**16.2.3** Summarize the role of cAMP.

**16.2.4** Describe gene regulation by cAMP-dependent protein kinase.

## Questions

1. ¿Cuál es la diferencia entre la señalización paracrina y endocrina?
2. Los pacientes con la enfermedad de resistencia familiar a glucocorticoides (FGR) son insensibles a los glucocorticoides debido a mutaciones en el receptor de glucocorticoides, incluidas mutaciones en el dominio de unión al ligando y el dominio de unión al ADN del receptor. Formule hipótesis sobre cómo estas mutaciones podrían causar insensibilidad a los glucocorticoides.
3. ¿Cómo se vería afectada la expresión de un gen dirigido por el receptor de hormona tiroidea por la eliminación del receptor de hormona tiroidea en ausencia de hormona? ¿Y en células tratadas con hormona tiroidea?
4. ¿Cómo difiere la señalización por neurotransmisores de la señalización por hormonas esteroides?
5. ¿Por qué los receptores de factores polipeptídicos siempre se expresan en la superficie de la célula objetivo?

Figura 16.7

Figure 6: Figura 16.7

### **G Proteínas y AMP cíclico**

La mayoría de los ligandos responsables de la señalización célula-célula (incluidos neurotransmisores, hormonas peptídicas y factores de crecimiento) se unen a receptores en la superficie de sus células objetivo. En consecuencia, un desafío importante en la comprensión de la señalización célula-célula es desentrañar los mecanismos por los cuales los receptores de superficie celular transmiten las señales iniciadas por la unión de ligandos. Como se discutió en el Capítulo 14, algunos receptores de neurotransmisores son canales activados por ligandos que dirigen directamente el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Otros receptores de superficie celular, incluidos los receptores de hormonas peptídicas y factores de crecimiento, actúan regulando la actividad de las enzimas intracelulares objetivo. Estas enzimas luego transmiten señales desde el receptor a una serie de objetivos intracelulares adicionales, un proceso llamado transducción de señales celulares. Los objetivos de tales vías de señalización con frecuencia incluyen factores de transcripción que se activan para regular la expresión génica. La unión de ligandos a un receptor en la superficie de la célula así inicia una cadena de reacciones intracelulares, alcanzando finalmente el núcleo y alterando los programas de expresión génica. Las funciones de algunos de los principales tipos de receptores de superficie celular y sus vías de señalización asociadas se discuten en esta y las siguientes secciones de este capítulo.

**G Proteínas y Receptores Acoplados a Proteínas G** La familia más grande de receptores de superficie celular transmite señales a objetivos intracelulares a través de la acción intermediaria de proteínas de unión a guanina llamadas proteínas G, que se introdujeron en el Capítulo 8 (ver Figura 8.29). Se han identificado más de 1000 genes de receptores acoplados a proteínas G, incluidos los receptores de muchas hormonas y neurotransmisores. Además, la familia de receptores acoplados a proteínas G incluye un gran número de receptores que son responsables del olfato, el gusto y la vista.

Los receptores acoplados a proteínas G son proteínas estructural y funcionalmente relacionadas caracterizadas por siete hélices transmembrana, un dominio de unión a ligandos extracelular y un dominio intracelular con actividad de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Figura 16.7). La unión de ligandos al dominio extracelular induce un cambio conformacional que permite que el dominio citosólico active una proteína G asociada con la cara interna de la membrana plasmática.

**Figura 16.7** Estructura de un receptor acoplado a proteínas G. El receptor acoplado a proteínas G se caracteriza por siete hélices transmembrana, un dominio de unión a ligandos extracelular y un dominio intracelular con actividad de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF).

Una gran familia de receptores señalizan a través de proteínas G. # 16.2 G Proteins and Cyclic AMP

activated G protein then dissociates from the receptor and carries the signal to an intracellular target, which may be either an enzyme or an ion channel.

The discovery of G proteins came from studies of hormones (such as epinephrine) that regulate the synthesis of cyclic AMP (cAMP) in their target cells. As discussed below, cAMP is an important second messenger that mediates cellular responses to a variety of hormones. In the 1970s, Martin Rodbell and his colleagues made the key observation that GTP is required for hormonal stimulation of adenylyl cyclase (the enzyme responsible for cAMP formation). This finding led to the discovery that a guanine nucleotide-binding protein (the aforementioned G protein) is an intermediary in adenylyl cyclase activation (FIGURE 16.8). Since then, an array of G proteins have been found to act as physiological switches that regulate the activities of a variety of intracellular targets in response to extracellular signals.



## FIGURE 16.8 Hormonal activation of adenylyl cyclase

Binding of hormone promotes the interaction of the receptor with a heterotrimeric G protein composed of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits and with GDP bound to its  $\alpha$  subunit. The receptor catalyzes exchange of GDP for GTP, whereupon the activated G protein  $\alpha$  subunit dissociates from the receptor and stimulates adenylyl cyclase, which catalyzes the conversion of ATP to cAMP.

## FYI

Dogs have approximately three times more genes encoding functional odorant receptors than humans.

## KEY EXPERIMENT

### G Protein-Coupled Receptors and Odor Detection

#### A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition

Linda Buck and Richard Axel

Columbia University, New York

Cell, 1991, Volume 65, pages 175–187

#### Decoding the Sense of Smell

The sense of smell is one of the key systems through which animals perceive their environment. Peripheral neurons in the nose can recognize thousands of different odor molecules and then transmit signals to the brain, where this information is processed. In order to understand the sense of smell at the molecular level, it was essential to identify the receptors on olfactory neurons that were responsible for detection of odorant molecules. In 1991, Linda Buck and Richard Axel identified a large family of G protein-coupled receptors that were responsible for odor detection and recognition.

Previous studies had established that odor molecules were recognized by receptors on the cilia of olfactory neurons. Importantly, it had also been shown that exposure of isolated cilia from olfactory neurons to many different odorants led to the stimulation of adenylyl cyclase and elevation of cyclic AMP (cAMP). In addition, it was found that these odorant-stimulated increases in cAMP were dependent on the presence of GTP, suggesting that odorant molecules activated G protein-coupled receptors that stimulated adenylyl cyclase. The increased cAMP then opened  $\text{Na}^+$  channels in the plasma membrane of the olfactory neurons, initiating a nerve impulse.

Buck and Axel sought to isolate molecular clones of the genes encoding odorant receptors, based on the hypothesis that these receptors were

Linda Buck

Richard Axel# Capítulo 16 Señalización Celular

## EXPERIMENTO CLAVE (continuación)

Los miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Su éxito en este experimento no solo validó esta hipótesis, sino que también proporcionó la base para la comprensión del fundamento molecular de la discriminación de olores.

### Clonación de Receptores de Olores

El enfoque que Buck y Axel tomaron para clonar los genes de los receptores de olores se basó en tres suposiciones: (1) los receptores de olores eran miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y compartían secuencias con otros miembros de esta familia; (2) los receptores de olores en sí mismos eran una gran familia, requerida para detectar una gran cantidad de olores; y (3) los receptores estaban expresados solo en neuronas olfativas.

## The odorant receptor protein family

Figure 7: The odorant receptor protein family

Figure 16.9 Regulation of G proteins

Figure 8: Figure 16.9 Regulation of G proteins

Los oligonucleótidos imprimados correspondientes a secuencias conservadas de genes de receptores acoplados a proteínas G se utilizaron para amplificar ARNm de neuronas olfativas mediante transcripción inversa, seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver Figura 3.21). Se obtuvieron un gran número de fragmentos de PCR en estos experimentos, consistentes con la expresión de una gran familia de genes de receptores acoplados a proteínas G en neuronas olfativas. Los fragmentos de PCR amplificados se clonaron en vectores plasmídicos, y se aislaron 18 clones de cDNA distintos para su posterior caracterización. El uso de estos clones como sondas en Northern blots demostró que los ARNm homólogos se expresaban en neuronas olfativas, pero no en varios otros tipos de células, incluyendo cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, ovario, retina y bazo. Es importante destacar que la secuenciación de nucleótidos de diez clones completos mostró que codificaban una familia distinta de proteínas con las siete hélices transmembrana características de los receptores acoplados a proteínas G (ver figura).

Finalmente, la hibridación de los clones de cDNA con ADN genómico indicó que los receptores de olores estaban codificados por una gran familia multigénica que consistía en cientos de genes.

### La Familia Más Grande de Receptores Acoplados a Proteínas G

Los receptores de olores identificados por Buck y Axel son la familia más grande de receptores acoplados a proteínas G. La secuenciación del genoma ha mostrado ahora que los ratones y los perros tienen más de 1000 genes de receptores de olores. Curiosamente, la familia de genes de receptores de olores es más pequeña en humanos, consistiendo en menos de 400 genes funcionales, consistente con el sentido reducido del olfato en humanos comparado con perros y roedores.

La identificación de los receptores de olores ha servido como un primer paso crítico para entender cómo funciona el sentido del olfato. Es importante destacar que las neuronas olfativas individuales expresan solo un receptor de olores. Cada receptor se une a diferentes moléculas de odorantes, por lo que cada odorante es detectado por una combinación específica de receptores en un conjunto distinto de neuronas olfativas, que luego transmiten la información al cerebro. Sin embargo, aún no entendemos la red de conexiones nerviosas a través de las cuales la información de las neuronas olfativas se lleva al cerebro, permitiendo que el cerebro integre estos nuevos impulsos e interprete olores específicos. Desentrañar tales redes de conexiones neuronales sigue siendo un área fundamental de investigación para entender el procesamiento de la información en el sistema nervioso.

**Pregunta: Buck y Axel usaron imprimaciones correspondientes a secuencias conservadas de receptores acoplados a proteínas G para amplificar ARNm de neuronas olfativas. ¿Cómo esperarías que el número de fragmentos de PCR obtenidos se comparara con los obtenidos en un experimento similar usando ARNm de fibroblastos de piel?**

**La familia de proteínas de receptores de olores** La proteína codificada por uno de los clones de cDNA de receptores de olores se muestra atravesando la membrana plasmática con siete hélices transmembrana. Los aminoácidos que se conservan en otros receptores de olores se muestran en blanco y los aminoácidos más variables en negro. (De L. Buck y R. Axel 1991. Cell 65: 175–187.)

Las proteínas G consisten en tres subunidades designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (FIGURA 16.9). Frecuentemente se les llama proteínas G heterotriméricas para distinguirlas de otras proteínas que se unen a nucleótidos de guanina, como Ras (ver Figura 8.30) y las proteínas de unión a GTP relacionadas con Ras que están involucradas en la importación nuclear (Ran, ver...# 16.2 G Proteins and Cyclic AMP

En el estado inactivo, la subunidad  $\alpha$  está unida a GDP en un complejo con  $\beta$  y  $\gamma$ .

Fuera de la célula

Receptor acoplado a proteína G

Hormona

La unión de la hormona estimula la liberación de GDP y su intercambio por GTP.

Proteína G (estado inactivo)

Citosol

La actividad de la subunidad  $\alpha$  se termina por la hidrólisis del GTP unido, lo cual es estimulado por las proteínas RGS. La subunidad  $\alpha$  inactiva unida a GDP luego se reasocia con el complejo  $\beta\gamma$ .

Hidrólisis de GTP

RGS

Proteína G (estado activo)

La subunidad  $\alpha$  unida a GTP activada y el complejo  $\beta\gamma$  luego se disocian del receptor e interactúan con sus objetivos.

Enzimas objetivo y canales iónicos

Figura 16.9 Regulación de las proteínas G

Los receptores activan las proteínas G estimulando el intercambio de GDP por GTP. Las proteínas G activadas luego interactúan con enzimas objetivo, como la adenilil ciclase.

El genoma humano codifica 21 subunidades  $\alpha$  diferentes, 6 subunidades  $\beta$  y 12 subunidades  $\gamma$ . Diferentes proteínas G se asocian con diferentes receptores, por lo que esta variedad de proteínas G acopla receptores a distintos objetivos intracelulares. Por ejemplo, la proteína G asociada con el receptor de epinefrina se llama Gs porque su subunidad  $\alpha$  estimula la adenilil ciclase (ver Figura 16.8). Otras proteínas G actúan en subunidades  $\beta\gamma$  en lugar de inhibir la adenilil ciclase ( $G_i$ ) o regular las actividades de otras enzimas objetivo. Además, tanto las subunidades  $\alpha$  como las  $\beta\gamma$  de algunas proteínas G regulan directamente los canales iónicos.

En el estado de reposo,  $\alpha$  está unida a GDP en un complejo con  $\beta$  y  $\gamma$ . La unión de la hormona induce un cambio conformacional en el receptor, de modo que el dominio citosólico del receptor interactúa con la proteína G. El receptor activado luego actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina para estimular la liberación de GDP unido y su intercambio por GTP. La subunidad  $\alpha$  unida a GTP activada luego se disocia de  $\beta$  y  $\gamma$ , que permanecen juntas y funcionan como un complejo  $\beta\gamma$ . Tanto la subunidad  $\alpha$  unida a GTP como el complejo  $\beta\gamma$  luego interactúan con sus objetivos para provocar una respuesta intracelular. La actividad de la subunidad  $\alpha$  se termina por la hidrólisis del GTP unido, lo cual es estimulado por las proteínas RGS (proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G), que actúan como proteínas activadoras de GTPasa (GAP) para las proteínas G heterotriméricas. La subunidad  $\alpha$  inactiva (ahora unida a GDP) luego se reasocia con el complejo  $\beta\gamma$ , lista para que el ciclo comience de nuevo. # Capítulo 16: Señalización Celular

FIGURA 16.10 **FIGURA 16.10** Síntesis y degradación de cAMP. El cAMP (AMP cíclico) se sintetiza a partir de ATP por la adenilil ciclase y se degrada a AMP por la fosfodiesterasa de cAMP.

## La vía del cAMP: segundos mensajeros y fosforilación de proteínas

El papel del cAMP, un objetivo principal de la señalización de proteínas G en células de mamíferos, fue descubierto en 1958 por Earl Sutherland Jr. durante estudios de la hormona epinefrina, que estimula la descomposición del glucógeno en glucosa en células musculares. Sutherland encontró que la acción de la epinefrina estaba mediada por un aumento en la concentración intracelular de cAMP, lo que llevó al

## Regulation of glycogen metabolism by epinephrine

Figure 9: Regulation of glycogen metabolism by epinephrine

concepto de que el cAMP es un segundo mensajero en la señalización hormonal (el primer mensajero es la propia hormona). El cAMP se forma a partir de ATP por la acción de la adenilil ciclasa (que es estimulada por G<sub>s</sub>) y se degrada a AMP por la fosfodiesterasa de cAMP (FIGURA 16.10).

La mayoría de los efectos del cAMP en células animales son mediados por la acción de la proteína quinasa dependiente de cAMP, o proteína quinasa A (FIGURA 16.11). La proteína quinasa A es un tetrámero que consiste en dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. El cAMP se une a las subunidades regulatorias, llevando a su disociación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas libres son entonces enzimáticamente activas y capaces de fosforilar residuos de serina en sus proteínas objetivo.

En la regulación de la descomposición del glucógeno por la epinefrina, el objetivo clave de la proteína quinasa A es otra proteína quinasa, la quinasa de fosforilasa, que es fosforilada y activada por la proteína quinasa A (ver Figura 16.11). La quinasa de fosforilasa a su vez fosforila y activa la fosforilasa de glucógeno, que cataliza la descomposición del glucógeno en glucosa-1-fosfato.

La cadena de reacciones que lleva desde el receptor de epinefrina hasta la fosforilasa de glucógeno proporciona una buena ilustración de la amplificación de señales durante la transducción de señales intracelulares. Cada molécula de epinefrina activa solo un receptor. Sin embargo, cada receptor puede activar hasta 100 moléculas de G<sub>s</sub>. Cada molécula de G<sub>s</sub> entonces estimula la actividad enzimática de la adenilil ciclasa, que puede catalizar la síntesis de muchas moléculas de cAMP. La amplificación de señales continúa ya que cada molécula de proteína quinasa A fosforila muchas moléculas de la quinasa de fosforilasa, que a su vez fosforila muchas moléculas de fosforilasa de glucógeno. La unión de la hormona a un pequeño número de receptores lleva así a la activación de un número mucho mayor de enzimas objetivo intracelulares.

En muchas células animales, el aumento en cAMP activa la transcripción de genes específicos que contienen una secuencia reguladora llamada el elemento de respuesta a cAMP, o CRE. En este caso, la señal es llevada desde el citoplasma hasta el núcleo por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, que es capaz de entrar al núcleo tras su liberación de la subunidad reguladora. Dentro del núcleo, la proteína quinasa A

**cAMP usualmente actúa estimulando la proteína quinasa A, que fosforila y activa objetivos posteriores.**

**La proteína quinasa A activada puede translocarse al núcleo y regular la expresión génica.**  
**# 16.2 G Proteins and Cyclic AMP**

**FIGURE 16.11 Regulation of glycogen metabolism by epinephrine** Receptor stimulation by epinephrine leads to G protein-mediated activation of adenylyl cyclase. cAMP activates protein kinase A, which consists of two regulatory (R) and two catalytic (C) subunits in its inactive form. Binding of cAMP to the regulatory subunits induces a conformational change that causes dissociation of the catalytic subunits, which are then enzymatically active. Protein kinase A activates phosphorylase kinase and phosphorylase kinase activates glycogen phosphorylase, which catalyzes the breakdown of glycogen to glucose-1-phosphate.

La fosforilación de proteínas objetivo es revertida por fosfatasa de proteínas, regulando la respuesta a la estimulación celular.

La fosforilación de un factor de transcripción llamado proteína de unión a CRE (CREB), lleva al reclutamiento de coactivadores y a la transcripción de genes inducibles por cAMP (FIGURA 16.12). Tal regulación de la expresión génica por cAMP juega un papel importante en el control de la proliferación, supervivencia y diferenciación de una amplia variedad de células animales, así como en el aprendizaje y la memoria.

Es importante reconocer que las quinasas de proteínas, como la quinasa A, no funcionan en aislamiento dentro de la célula. Por el contrario, la fosforilación de proteínas es rápidamente revertida por la acción de

## Diagrama de señalización celular

Figure 10: Diagrama de señalización celular

fosfatasa de proteínas, que eliminan grupos fosfato de residuos de tirosina o serina/treonina fosforilados en sus proteínas sustrato. Estas fosfatasas de proteínas sirven para terminar las respuestas iniciadas por la activación del receptor de quinasas de proteínas. Por ejemplo, los residuos de serina de las proteínas que son fosforiladas por la quinasa A de proteínas son# Capítulo 16 Señalización Celular

**FIGURA 16.12 Expresión génica inducible por AMP cíclico** La estimulación del receptor conduce a la activación mediada por proteínas G de la adenilil ciclasa, la síntesis de AMP cíclico y la activación de la proteína quinasa A. La subunidad catalítica libre de la proteína quinasa A se traslada al núcleo y fosforila el factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE), lo que lleva al reclutamiento de coactivadores y la expresión de genes inducibles por AMP cíclico.

El AMP cíclico (cAMP) es un segundo mensajero crucial en la señalización celular. La activación de un receptor acoplado a proteína G por una hormona en la superficie celular desencadena una cascada de eventos que incluyen la activación de la adenilil ciclasa, la producción de cAMP y la activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA fosforila varios sustratos, incluyendo el factor de transcripción CREB, que luego se une a elementos de respuesta a cAMP (CRE) en el ADN para regular la transcripción génica.

El cAMP también puede regular directamente los canales iónicos, independientemente de la fosforilación de proteínas. Por ejemplo, en las neuronas sensoriales del olfato, los receptores acoplados a proteínas G activan la adenilil ciclasa, aumentando los niveles de cAMP intracelular. En este sistema, el cAMP abre directamente los canales de Na<sup>+</sup> en la membrana plasmática, lo que lleva a la despolarización de la membrana y la iniciación de un potencial de acción.

La desfosforilación de los sustratos de la proteína quinasa A es llevada a cabo por la fosfatasa de proteínas 1, manteniendo un equilibrio entre las actividades intracelulares de la proteína quinasa A y las fosfatasas de proteínas.

Aunque la mayoría de los efectos del cAMP son mediados por la proteína quinasa A, el cAMP también puede regular directamente los canales iónicos, independientemente de la fosforilación de proteínas. El cAMP funciona de esta manera como un segundo mensajero involucrado en la detección de olores. Los receptores de odorantes en las neuronas sensoriales de la nariz son receptores acoplados a proteínas G que estimulan la adenilil ciclasa, lo que lleva a un aumento en el cAMP intracelular. En lugar de estimular la proteína quinasa A, el cAMP en este sistema abre directamente los canales de Na<sup>+</sup> en la membrana plasmática, lo que lleva a la despolarización de la membrana y la iniciación de un potencial de acción (ver Figura 14.20).# 16.2 REVIEW

- Los receptores acoplados a proteínas G son la familia más grande de receptores de superficie celular, incluidos los receptores de muchas hormonas y neurotransmisores, que transmiten señales a objetivos intracelulares a través de la acción intermediaria de las proteínas G, que son reguladas por la unión de GTP.
- El AMP cíclico es un segundo mensajero importante en la respuesta de las células animales a una variedad de hormonas y odorantes.
- La mayoría de las acciones del AMP cíclico son mediadas por la proteína quinasa A, que fosforila tanto enzimas metabólicas como el factor de transcripción CREB.

### Preguntas

1. El receptor de epinefrina está acoplado a G<sub>s</sub>, mientras que el receptor de acetilcolina (en las células del músculo cardíaco) está acoplado a G<sub>i</sub>. Suponga que se construye una molécula recombinante que contiene las secuencias extracelulares del receptor de epinefrina unidas a las secuencias citosólicas del receptor de acetilcolina. ¿Qué efecto tendría la epinefrina sobre los niveles de AMP cíclico en las células que expresan dicho receptor recombinante? ¿Cómo afectaría la acetilcolina a estas células?

2. ¿Qué efecto tendrían los siRNA contra las proteínas RGS, que actúan como proteínas activadoras de GTPasa (GAP), sobre la señalización de las proteínas G?
3. Las hormonas que activan un receptor acoplado a Gs estimulan la proliferación de las células tiroideas. ¿Cómo afectarían los inhibidores de la fosfodiesterasa del AMP cíclico a la proliferación de estas células?
4. ¿Cómo podría la unión del AMP cíclico llevar a la translocación nuclear de la proteína quinasa A?
5. ¿Cómo afectaría la sobreexpresión de la fosfatasa de proteínas 1 a la inducción de genes inducibles por el AMP cíclico en respuesta a la estimulación hormonal de las células objetivo? ¿Afectaría la fosfatasa de proteínas 1 la función de los canales de iones regulados por el AMP cíclico?
6. Desea entender cómo se regula la transcripción del gen Fra-1. Examina la secuencia de ADN aguas arriba de su promotor e identifica una secuencia que coincide con la secuencia consenso del elemento de respuesta del AMP cíclico (CRE). Formule una hipótesis sobre cómo se regula la expresión de Fra-1 en las células y proponga un experimento que llevaría a cabo para probarlo.

## 16.3 Tirosina Quinasas y Señalización por las Vías de la MAP Quinasa y PI 3-Quinasa

### OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

#### 16.3.1

Describir la señalización por receptores tirosina quinasas.

#### 16.3.2

Comparar y contrastar las actividades de los receptores y las quinasas no receptoras.

#### 16.3.3

Explicar cómo Ras y Raf son activados aguas abajo de las tirosina quinasas.

#### 16.3.4

Dar un ejemplo de regulación transcripcional por señalización de la MAP quinasa.

#### 16.3.5

Resumir la señalización por PI 3-quinasa y mTOR.

**Figura 16.13** Regulación de la fosforilación de proteínas por la proteína quinasa A y la fosfatasa de proteínas 1. La fosforilación de las proteínas objetivo por la proteína quinasa A es revertida por la acción de la fosfatasa de proteínas 1. # Capítulo 16 Señalización Celular

En contraste con los receptores acoplados a proteínas G, otros receptores de superficie celular están directamente vinculados a enzimas intracelulares. La familia más grande de estos receptores de tipo enzima son las tirosina quinasas, que fosforilan sus sustratos en residuos de tirosina (receptores tirosina quinasas). Muchos otros receptores no son en sí mismos tirosina quinasas, sino que estimulan las tirosina quinasas intracelulares con las que están asociadas no covalentemente (tirosina quinasas no receptoras). Las tirosina quinasas han sido particularmente bien estudiadas como elementos clave de las vías de señalización involucradas en el control del crecimiento y la diferenciación celular. De hecho, la primera tirosina quinasa fue descubierta durante estudios del oncogén del virus del sarcoma de Rous (ver Experimento Clave en el

Figura 16.14

Figure 11: Figura 16.14

Capítulo 8), vinculando directamente la fosforilación de tirosina a la proliferación anormal de células cancerosas. Como se discutirá en el Capítulo 19, muchos de los medicamentos que se están desarrollando como nuevos tratamientos contra el cáncer son inhibidores de las tirosina quinasas o de sus vías de señalización aguas abajo.

**Los receptores tirosina quinasas tienen un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa.**

## Receptores tirosina quinasas

Los receptores tirosina quinasas incluyen los receptores de la mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos, estableciendo claramente la fosforilación de tirosina como un mecanismo clave de señalización en la respuesta de las células a la estimulación del factor de crecimiento. El genoma humano codifica 58 receptores tirosina quinasas, incluyendo los receptores para EGF, NGF, PDGF, insulina, y muchos otros factores de crecimiento. Todos estos receptores comparten una organización estructural común: un dominio de unión al ligando extracelular N-terminal, una hélice transmembrana única, y un dominio C-terminal citosólico con actividad tirosina quinasa (FIGURA 16.14). La unión de ligandos (por ejemplo, factores de crecimiento) a los dominios extracelulares de estos receptores activa sus dominios tirosina quinasa citosólicos, resultando en la fosforilación de los propios receptores y de proteínas intracelulares que propagan la señal iniciada por la unión del factor de crecimiento.

El primer paso en la señalización de la mayoría de los receptores tirosina quinasas es la dimerización inducida por el ligando del receptor (ver Figura 16.14). Algunos factores de crecimiento, como PDGF y NGF, son ellos mismos dímeros consistentes en dos cadenas polipeptídicas idénticas; estos factores de crecimiento inducen directamente la dimerización al unirse simultáneamente a dos moléculas receptoras diferentes. Otros factores de crecimiento (como EGF) son monómeros.

**FIGURA 16.14 Receptores tirosina quinasas** Cada receptor consiste en un dominio de unión al ligando extracelular N-terminal, una hélice transmembrana única, y un dominio C-terminal citosólico con actividad tirosina quinasa. La unión del factor de crecimiento induce la dimerización del receptor, lo que resulta en la autofosforilación del receptor a medida que las dos cadenas polipeptídicas se fosforilan entre sí. # 16.3 Tyrosine Kinases and Signaling by the MAP Kinase and PI 3-Kinase Pathways

FIGURE 16.15 Asociación de moléculas de señalización aguas abajo con quinasas de tirosina receptoras. Las proteínas con dominios SH2 se unen a sitios específicos que contienen fosfotirosina de receptores activados.

Ligand binding induces receptor dimerization and autophosphorylation.

Receptor phosphorylation creates binding sites for downstream signaling molecules.

Nonreceptor tyrosine kinases associate with the cytosolic domains of receptors that lack intrinsic enzymatic activity.

FYI Cytokine receptors are used by human immunodeficiency virus (HIV) as cell surface receptors for infection of immune cells.

pero conducen a la dimerización del receptor como resultado de inducir cambios conformacionales que promueven interacciones proteína-proteína entre diferentes polipéptidos receptores.

La dimerización inducida por ligando luego lleva a la autofosforilación del receptor a medida que las cadenas polipeptídicas dimerizadas se fosforilan entre sí. Tal autofosforilación juega dos roles clave en la señalización desde estos receptores. Primero, la fosforilación de residuos de tirosina dentro del dominio catalítico aumenta la actividad de la proteína quinasa. Segundo, la fosforilación de residuos de tirosina fuera

## Activación de las cinasas de tirosina no receptoras

Figure 12: Activación de las cinasas de tirosina no receptoras

del dominio catalítico crea sitios de unión específicos para proteínas adicionales que transmiten señales intracelulares aguas abajo de los receptores activados.

La asociación de estas moléculas de señalización aguas abajo con quinasas de tirosina receptoras es mediada por dominios de proteínas que se unen a péptidos que contienen fosfotirosina específicos (FIGURA 16.15). El primero de estos dominios en ser caracterizado se llamó dominios SH2 (por Src homology 2) porque fueron inicialmente reconocidos en quinasas de tirosina no receptoras relacionadas con Src, el oncogén de virus de sarcoma de Rous. Los dominios SH2 consisten en aproximadamente 100 aminoácidos y se unen a secuencias cortas de péptidos que contienen residuos de fosfotirosina. El resultado de la asociación de proteínas que contienen SH2 con quinasas de tirosina receptoras activadas puede tener varios efectos: localiza estas proteínas en la membrana plasmática, lleva a su asociación con otras proteínas, promueve su fosforilación y estimula sus actividades enzimáticas. La asociación de estas proteínas con receptores autofosforilados representa así el primer paso en la transmisión intracelular de señales iniciada por la unión de factores de crecimiento a la superficie celular.

### Quinasas de tirosina no receptoras

En lugar de poseer actividad enzimática intrínseca, muchos receptores actúan estimulando quinasas de tirosina intracelulares con las que están no covalentemente asociados. Estas quinasas de tirosina no receptoras incluyen miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas, que abarca los receptores de la mayoría de las citoquinas (por ejemplo, eritropoyetina e interleucina-2) y algunos polipéptidos hormonales (por ejemplo, hormona del crecimiento). Al igual que las quinasas de tirosina receptoras, los receptores de citoquinas contienen dominios de unión a ligandos extracelulares N-terminales, hélices transmembrana de una sola pasada y dominios citosólicos C-terminales. Sin embargo, los dominios citosólicos de los receptores de citoquinas carecen de cualquier actividad catalítica conocida. En cambio, los receptores de citoquinas funcionan en asociación con quinasas de tirosina no receptoras, que se activan como resultado de la unión del ligando. # Capítulo 16 Señalización Celular

**FIGURA 16.16 Activación de las cinasas de tirosina no receptoras** La unión del ligando induce la dimerización del receptor y conduce a la activación de las cinasas de tirosina no receptoras asociadas como resultado de la fosforilación cruzada. Las cinasas activadas luego fosforilan residuos de tirosina del receptor, creando sitios de unión de fosfotirosina para moléculas de señalización aguas abajo.

### Las cinasas JAK activan directamente los factores de transcripción STAT.

El primer paso en la señalización de los receptores de citoquinas es la dimerización inducida por el ligando y la fosforilación cruzada de las cinasas de tirosina no receptoras asociadas (FIGURA 16.16). Estas cinasas activadas luego fosforilan el receptor, proporcionando sitios de unión de fosfotirosina para el reclutamiento de moléculas de señalización aguas abajo que contienen dominios SH2. Las combinaciones de receptores de citoquinas más cinasas de tirosina no receptoras asociadas funcionan de manera análoga a las cinasas de tirosina receptoras discutidas previamente (ver Figura 16.14).

Las cinasas asociadas con los receptores de citoquinas incluyen miembros de la familia de cinasas Janus (o JAK), que consta de cuatro cinasas de tirosina no receptoras relacionadas. Los objetivos clave de las cinasas JAK son las proteínas STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción), que fueron identificadas originalmente como mediadores de la señalización del receptor de citoquinas (FIGURA 16.17). Las proteínas STAT son inactivas en células no estimuladas donde están localizadas en el citoplasma. La estimulación de los receptores de citoquinas conduce al reclutamiento de proteínas STAT, que se unen a las secuencias que contienen fosfotirosina en los dominios citoplasmáticos de los receptores. Tras su asociación con los receptores activados, las proteínas STAT son fosforiladas por las cinasas de la familia JAK. La fosforilación de tirosina causa cambios conformacionales que promueven la dimerización de las



## La vía JAK/STAT

Figure 13: La vía JAK/STAT

proteínas STAT y la exposición de una señal de localización nuclear, lo que resulta en su translocación al núcleo donde estimulan la transcripción de sus genes objetivo. Los factores de transcripción STAT sirven así como enlaces directos entre los receptores de citoquinas en la superficie celular y la regulación de la expresión génica en el núcleo.

Otras cinasas de tirosina no receptoras pertenecen a la familia Src, que consta de Src y proteínas estrechamente relacionadas. Como ya se señaló (ver Capítulo 8 y Experimento Clave), Src fue identificado inicialmente como la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous y fue la primera proteína que se demostró que poseía actividad de cinasa de tirosina, por lo que es una

**FIGURA 16.17 La vía JAK/STAT** Las proteínas STAT son factores de transcripción con dominios SH2 que median su unión a secuencias que contienen fosfotirosina en los receptores de citoquinas activados. En células no estimuladas, las proteínas STAT están inactivas en el citoplasma. La estimulación de los receptores de citoquinas conduce a la unión de las proteínas STAT a los sitios de unión de fosfotirosina en el receptor, donde son fosforiladas por las cinasas de tirosina asociadas al receptor JAK. Las proteínas STAT fosforiladas luego se dimerizan y se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de genes objetivo. # 16.3 Tyrosine Kinases and Signaling by the MAP Kinase and PI 3-Kinase Pathways

Jugaron un papel fundamental en experimentos que llevaron a nuestra comprensión actual de la señalización celular. Los miembros de la familia Src juegan roles clave en la señalización descendente de receptores de citocinas, receptores de tirosina quinasas, receptores de antígenos en linfocitos B y T, y receptores involucrados en interacciones célula-célula y célula-matriz.

Como se discutió en el Capítulo 15, las integrinas son los principales receptores responsables de la unión de las células a la matriz extracelular (ver Figuras 15.15 y 15.16). Además de este papel estructural, las integrinas sirven como receptores que activan vías de señalización intracelular, controlando así el movimiento celular y otros aspectos del comportamiento celular (incluyendo la proliferación y supervivencia) en respuesta a interacciones célula-matriz. Al igual que los receptores de citocinas, las integrinas tienen dos colas citoplasmáticas que carecen de actividad enzimática intrínseca. Sin embargo, la fosforilación de tirosina es una respuesta temprana a la interacción de las integrinas con componentes de la matriz extracelular, lo que sugiere que las integrinas están vinculadas a tirosina quinasas no receptoras. Una de las señales descendentes de las integrinas implica la activación de una tirosina quinasa no receptora llamada FAK (focal adhesion kinase) (FIGURA 16.18). Como su nombre lo indica, FAK se localiza en las adhesiones focales y se fosforila rápidamente en tirosina tras la unión de las integrinas a componentes de la matriz extracelular. Al igual que otras tirosina quinasas, la activación de FAK implica autofosforilación inducida por la agrupación de integrinas unidas a la matriz extracelular. La autofosforilación de FAK crea sitios de acoplamiento para moléculas de señalización que contienen dominios SH2, incluidos miembros de la familia Src, así como otras moléculas de señalización descendente.

Las interacciones entre células, así como entre células y la matriz extracelular, juegan roles críticos en organismos multicelulares. Por ejemplo, tales interacciones controlan la organización de células en tejidos, incluyendo la formación de láminas de células epiteliales. Como se discutió en el Capítulo 15, las interacciones célula-célula son mediadas por cuatro principales familias de moléculas de adhesión celular: integrinas, selectinas, miembros de la superfamilia de Ig y cadherinas (ver Tabla 15.1). Al igual que las integrinas (discutidas anteriormente), los miembros de la superfamilia de Ig y las cadherinas están vinculados a vías de señalización que controlan múltiples aspectos del comportamiento celular, al menos en parte a través de la estimulación de tirosina quinasas no receptoras, incluidos miembros de la familia Src.

**FIGURA 16.18 Señalización de integrinas.** La unión de integrinas a la matriz extracelular lleva a la agrupación de integrinas y la activación de la tirosina quinasa no receptora FAK por autofosforilación. Src luego se une al sitio de autofosforilación de FAK y fosforila FAK en residuos adicionales de tirosina, que sirven como sitios de unión para moléculas de señalización descendente.

## Integrin signaling

Figure 14: Integrin signaling

FIGURA 16.19

Figure 15: FIGURA 16.19

### **Miembros de la familia Src están asociados con receptores de citocinas, receptores de factores de crecimiento e integrinas.** # Vías de las MAP quinasas

La señalización de las MAP quinasas es una de las principales vías de transducción de señales activadas aguas abajo de ambos tipos de receptores, de tirosina quinasa y de receptores no tirosina quinasa. La vía de las MAP quinasas se refiere a una cascada de proteínas quinasas que están altamente conservadas en la evolución y juegan roles centrales en la transducción de señales en todas las células eucariotas, desde levaduras hasta humanos. Los elementos centrales de la vía son una familia de serina/treonina quinasas llamadas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) que se activan en respuesta a una variedad de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. En levaduras, las vías de las MAP quinasas controlan una variedad de respuestas celulares, incluyendo el apareamiento, la forma celular y la esporulación. En eucariotas superiores (incluyendo *C. elegans*, *Drosophila*, ranas y mamíferos), las MAP quinasas son reguladores ubicuos del crecimiento y la diferenciación celular.

### **La vía de las ERK MAP quinasas**

Las MAP quinasas que se han caracterizado inicialmente en células de mamíferos pertenecen a la familia de las ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares). El control central de la señalización de ERK en células de mamíferos surgió de estudios de las proteínas Ras, que fueron identificadas como las proteínas oncogénicas de los virus tumorales que causan sarcomas en ratas (de ahí el nombre Ras, de rat sarcoma virus). El interés en Ras aumentó considerablemente en 1982 cuando las mutaciones en los genes ras se implicaron por primera vez en el desarrollo de cáncer humano (discutido en el Capítulo 19). La importancia de Ras en la señalización intracelular se demostró luego mediante experimentos que mostraron que Ras activo induce directamente la proliferación de células normales de mamíferos. Por el contrario, la interferencia con la función de Ras bloquea la proliferación de células inducida por factores de crecimiento. Así, Ras no solo es capaz de inducir el crecimiento anormal característico de las células cancerosas, sino que también es necesario para la respuesta de las células normales a la estimulación por factores de crecimiento.

Como se introdujo en el Capítulo 8 (ver Figura 8.30), las proteínas Ras son proteínas de unión a nucleótidos de guanina que alternan entre formas inactivas unidas a GDP y formas activas unidas a GTP (FIGURA 16.19), análogas a las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G.

**FIGURA 16.19** Regulación de las proteínas Ras. Las proteínas Ras alternan entre estados inactivos unidos a GDP y estados activos unidos a GTP.

1. Ras se convierte en el estado activo unido a GTP mediante el intercambio de GTP por GDP unido, lo cual es estimulado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs).
2. La actividad de Ras se termina mediante la hidrólisis de GTP, que es estimulada por proteínas activadoras de GTPasa (GAPs).

- **Estado inactivo:** Ras-GDP
- **Estado activo:** Ras-GTP# MOLECULAR MEDICINE

Diagrama de la regulación de las proteínas Ras

Figure 16: Diagrama de la regulación de las proteínas Ras

## **Cancer: Signal Transduction and the ras Oncogenes**

### **The Many Types of Cancer**

Cancer claims the lives of approximately one out of every four Americans, accounting for approximately 600,000 deaths each year in the United States. There are more than 100 different kinds of cancer, but some are more common than others. In this country the most common lethal cancers are those of the lung and colon/rectum, which together account for about 30% of all cancer deaths. Other major contributors to cancer mortality include cancers of the pancreas, breast, and prostate, which are responsible for 7.9%, 7.2%, and 5.6% of US cancer deaths, respectively.

The common feature of all cancers is the unrestrained proliferation of cancer cells, which eventually spread throughout the body, invading normal tissues and organs and leading to death of the patient. Surgery and radiation are effective treatments for localized cancers but are unable to reach cancer cells that have spread to distant body sites. Treatment of these cancers therefore requires the use of chemotherapeutic drugs. Unfortunately, the commonly available chemotherapeutic agents are not specific for cancer cells. Most act by either damaging DNA or interfering with DNA synthesis, so they also kill rapidly dividing normal cells, such as the epithelial cells that line the digestive tract and the blood-forming cells of the bone marrow. The resulting toxicity of these drugs limits their effectiveness, and many cancers are not eliminated by doses of chemotherapy that can be tolerated by the patient. Consequently, although major progress has been made in cancer treatment, nearly half of all patients diagnosed with cancer ultimately die of their disease.

### **ras Oncogenes in Human Cancers**

The identification of viral genes that can convert normal cells to cancer cells, such as the src gene of Rous sarcoma virus, provided the first demonstration that cancers can result from the action of specific genes (oncogenes). The subsequent discovery that viral oncogenes are related to genes of normal cells then engendered the hypothesis that non-virus-induced cancers (including most human cancers) might arise as a result of mutations in normal cell genes, giving rise to oncogenes of cellular rather than viral origin. Such cellular oncogenes were first identified in human cancers in 1981. The following year, human oncogenes of bladder, lung, and colon cancers were found to be related to the ras genes previously identified in rat sarcoma viruses.

Although many different genes are now known to play critical roles in cancer development, mutations of the ras genes remain one of the most common genetic abnormalities in human tumors. Mutated ras oncogenes are found in about 20% of all human cancers, including approximately 40% of lung cancers, 55% of colon cancers, and 90% of pancreatic cancers. Moreover, the action of ras oncogenes has clearly linked the development of human cancer to abnormalities in the signaling pathways that regulate cell proliferation. The mutations that convert normal ras genes to oncogenes substantially decrease GTP hydrolysis by the Ras proteins. Consequently, the mutated oncogenic Ras proteins remain locked in the active GTP-bound form rather than alternating normally between inactive and active states in response to extracellular signals. The oncogenic Ras proteins thus continuously stimulate the ERK signaling pathway and drive cell proliferation, even in the absence of the growth factors that would be required to activate Ras and signal proliferation of normal cells.

### **New Approaches to Treatment**

The discovery of mutated oncogenes in human cancers raised the possibility of developing drugs specifically targeted against the oncogenic proteins. In principle, such drugs might selectively attack cancer cells with less toxicity toward normal cells than that of conventional chemotherapeutic agents. Because ras is frequently mutated in human cancers, the Ras proteins and other elements of Ras signaling pathways have attracted considerable interest as potential drug targets.

As discussed in Chapter 19, effective drugs that selectively target cancer cells have been recently developed against some tyrosine kinase oncogenes that act upstream of Ras. A variety of additional drugs are targeted against protein kinases activated downstream of Ras, such as Raf. And most recently, 40 years

## Activación de Ras, Raf, MEK y ERK aguas abajo de quinasas de tirosina receptoras

Figure 17: Activación de Ras, Raf, MEK y ERK aguas abajo de quinasas de tirosina receptoras

after discovery of the human oncogene, a drug specific for mutationally activated Ras has been developed (see Chapter 19 Data Analysis Problem). The identification of oncogenes in human tumors has thus opened new strategies to rational development of drugs that act effectively and selectively against human cancer cells by targeting the signaling pathways that are responsible for cancer development.

**Question:** Why does treatment with oncogene-targeted drugs not lead to common side effects of chemotherapy, such as hair loss?

A human colon polyp (an early stage of colon cancer) The ras oncogenes contribute to the development of about half of all colon cancers.# Capítulo 16 Señalización Celular

Sin embargo, en contraste con la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, Ras funciona como un monómero en lugar de en asociación con las subunidades  $\beta\gamma$ . La activación de Ras está mediada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que estimulan la liberación de GDP unido y su intercambio por GTP. La actividad del complejo Ras-GTP se termina luego por la hidrólisis de GTP, que es estimulada por la interacción de Ras-GTP con proteínas activadoras de GTPasa (GAPs). Es interesante notar que las mutaciones de los genes ras en cánceres humanos tienen el efecto de inhibir la hidrólisis de GTP por las proteínas Ras. Estas proteínas Ras mutadas permanecen por lo tanto continuamente en la forma activa unida a GTP, impulsando la proliferación no regulada de células cancerosas incluso en ausencia de estimulación por factores de crecimiento.

El modo mejor entendido de activación de Ras es el mediado por quinasas de tirosina receptoras (FIGURA 16.20). La autofosforilación de estos receptores lleva a la unión de GEFs de Ras a través de sus dominios SH2. Esto localiza los GEFs a la membrana plasmática donde pueden interactuar con las proteínas Ras, que están

**FIGURA 16.20** Activación de Ras, Raf, MEK y ERK aguas abajo de quinasas de tirosina receptoras. La unión del factor de crecimiento a un receptor de tirosina quinasa lleva a la autofosforilación y formación de sitios de unión para el dominio SH2 de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Esta interacción recluta el GEF a la membrana plasmática, donde puede estimular el intercambio de GDP/GTP de Ras. El complejo Ras-GTP activado luego activa la proteína quinasa Raf. Raf fosforila y activa MEK, una proteína quinasa de doble especificidad que activa ERK por fosforilación en residuos de treonina y tirosina (Thr-183 y Tyr-185). ERK luego fosforila una variedad de proteínas diana nucleares y citoplasmáticas.

**Ras activa la proteína quinasa Raf, que a su vez activa MEK y ERK.**# 16.3 Tirosina quinasas y señalización por las vías de la MAP quinasa y PI 3-quinasa

### FIGURA 16.21 Inducción de genes de respuesta inmediata por ERK

ERK activada se transloca al núcleo, donde fosforila el factor de transcripción Elk-1. Elk-1 se une al elemento de respuesta sérica (SRE) en un complejo con el factor de respuesta sérica (SRF). La fosforilación estimula la actividad de Elk-1 como activador transcripcional, lo que lleva a la expresión de genes de respuesta inmediata.

Anclado en la capa interna de la membrana plasmática por lípidos adheridos al extremo C de Ras (ver Figura 14.8). Las GEFs luego estimulan el intercambio de GDP por GTP, lo que resulta en la formación del complejo activo Ras-GTP.

En su forma activa unida a GTP, Ras interactúa con una serie de proteínas efectoras, incluida la quinasa de serina/treonina Raf. En su estado inactivo, Raf es una proteína monomérica en el citosol. Al unirse a Ras-GTP induce cambios alostéricos que convierten a Raf en un estado catalíticamente activo en la membrana plasmática. Raf luego fosforila MEK y activa una segunda quinasa de proteínas, llamada MEK (MAP quinasa/quinasa ERK). MEK es una quinasa de proteínas dual-especificidad que activa miembros de

Figure 18: Pathways of MAP kinase activation in mammalian cells

la familia ERK por fosforilación de ambos residuos de treonina y tirosina separados por un solo aminoácido (por ejemplo, treonina-183 y tirosina-185 de ERK2). Una vez activada, ERK fosforila una variedad de proteínas diana, incluidas otras quinasas de proteínas y factores de transcripción.

Una fracción de ERK activada se transloca al núcleo donde regula factores de transcripción por fosforilación (FIGURA 16.21). En este sentido, es notable que una respuesta primaria a la estimulación del factor de crecimiento es la inducción rápida transcripcional de una familia de aproximadamente 100 genes llamados genes de respuesta inmediata. La inducción de muchos genes de respuesta inmediata es mediada por una secuencia reguladora llamada elemento de respuesta sérica (SRE), que es reconocida por un complejo de factores de transcripción que incluye el factor de respuesta sérica (SRF) y Elk-1. ERK fosforila y activa Elk-1, proporcionando un vínculo directo entre la familia de quinasas ERK y la inducción de genes de respuesta inmediata. Muchos genes de respuesta inmediata codifican factores de transcripción, por lo que su inducción en respuesta a factores de crecimiento lleva a la expresión alterada de una batería de otros genes aguas abajo llamados genes de respuesta secundaria. Como se discutió en el Capítulo 17, estos cambios en la expresión génica vinculan directamente la señalización de ERK a la estimulación de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento.

## VÍAS DE MAP QUINASA ADICIONALES

Tanto las células de levadura como las células de mamíferos tienen múltiples vías de MAP quinasa que controlan respuestas celulares distintas. Cada cascada consiste en tres quinasas de proteínas: una MAP quinasa terminal y dos quinasas upstream (análogas a Raf y MEK) que regulan su actividad. En la levadura *S. cerevisiae*, se han identificado cinco cascadas de MAP quinasa que regulan el apareamiento, la esporulación, la filamentación, la remodelación de la pared celular y la respuesta a la alta osmolaridad. En células de mamíferos, se han identificado múltiples grupos de quinasas MAP. Además de los miembros de la familia ERK, incluyen las quinasas JNK y p38 MAP, que son preferentemente activadas en respuesta a citocinas inflamatorias y estrés celular (por ejemplo, irradiación ultravioleta) (FIGURA 16.22). Las cascadas de JNK y p38 MAP quinasa son activadas por miembros de la subfamilia Rho de pequeñas proteínas de unión a GTP (incluyendo Rac, Rho y Cdc42) en lugar de por Ras. Mientras que la señalización ERK principalmente lleva a la proliferación celular, diferenciación y supervivencia, las vías de JNK y p38 MAP quinasa a menudo llevan a la inflamación y la muerte celular. Al igual que ERK, las quinasas JNK y p38 MAP pueden translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión génica. Múltiples vías de MAP quinasa funcionan en todos los tipos de células eucariotas para controlar la respuesta celular a diversos estímulos ambientales.

La especificidad de la señalización de MAP quinasa se mantiene en parte por la organización de los componentes de cada cascada de MAP quinasa como complejos que están asociados con proteínas andamiaje, que organizan complejos de señalización.

## FIGURA

- ERK activada puede translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción, alterando la expresión génica.
  - Las células tienen múltiples vías de MAP quinasa que responden a diferentes estímulos.
  - Las proteínas andamiaje mantienen la especificidad de la señalización de MAP quinasa.
- # Capítulo 16 Señalización Celular

**FIGURA 16.22 Vías de activación de la quinasa MAP en células de mamíferos** Además de ERK, las células de mamíferos contienen JNK y p38 MAP quinasas. La activación de JNK y p38 es mediada por miembros de la subfamilia Rho de pequeñas proteínas de unión a GTP (Rac, Rho y Cdc42), que estimulan cascadas de proteínas quinasas paralelas a las responsables de la activación de ERK. Las cascadas de

### A scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade

Figure 19: A scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade

Figure 16.24

Figure 20: Figure 16.24

proteínas quinasas que conducen a la activación de JNK y p38 parecen ser preferentemente activadas por citoquinas inflamatorias o estrés celular y generalmente conducen a la inflamación y muerte celular.

Estímulo	Factores de crecimiento	Citoquinas inflamatorias Estrés celular
Proteínas de unión a GTP	Ras	Rac, Rho, Cdc42
Quinasas aguas arriba	Raf MEK	ASK1, MEKK1, MLK, TAK1 MKK4, MKK7 MKK3, MKK6
Quinasa MAP	ERK	JNK p38
Respuesta	Proliferación Diferenciación Supervivencia celular	Inflamación Muerte celular

Las moléculas de andamiaje específicas para otras vías de señalización de la quinasa MAP no solo organizan la activación de otras moléculas de señalización aguas abajo, sino también la asociación física de componentes de señalización con sus receptores y objetivos. La asociación física con proteínas de andamiaje juega un papel importante en la determinación de la especificidad de las vías de señalización dentro de la célula.

### La vía PI 3-quinasa/Akt y las vías mTOR

Una segunda vía importante de señalización intracelular aguas abajo de las tirosina quinasas (y también estimulada por proteínas G) se basa en el uso de un segundo mensajero derivado del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). PIP<sub>2</sub> es un componente de la membrana plasmática, localizado en la hoja interna de la bicapa de fosfolípidos. Puede ser fosforilado en la posición 3 del inositol por la enzima fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa.

#### LA VÍA PI 3-QUINASA/Akt

La forma de PI 3-quinasa activada por tirosina quinasas tiene dominios SH2 y es reclutada y activada por la asociación con receptores tirosina quinasas (FIGURA 16.26). Una isoforma alternativa de PI 3-quinasa es activada por proteínas G. La fosforilación de PIP<sub>2</sub> produce el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>), que es crítico para la señalización de proliferación y supervivencia celular. Un objetivo clave de PIP<sub>3</sub> es una serina/treonina quinasa.

**FIGURA 16.23 Una proteína de andamiaje para la cascada de la quinasa MAP ERK** La proteína de andamiaje KSR se une a Raf, MEK y ERK, organizando estos componentes de la vía de la quinasa MAP ERK en un complejo de señalización. # 16.3 Tyrosine Kinases and Signaling by the MAP Kinase and PI 3-Kinase Pathways

**FIGURE 16.24 The PI 3-kinase/Akt pathway** PI 3-kinase is recruited to activated receptor tyrosine kinases via its SH2 domain. PI 3-kinase phosphorylates the 3 position of inositol, converting PIP<sub>2</sub> to PIP<sub>3</sub>. Akt is recruited to the plasma membrane by binding to PIP<sub>3</sub> via its pleckstrin homology (PH) domain. It is then activated as a result of phosphorylation by two other protein kinases (PDK1 and mTORC2) that also bind

## Regulación de FOXO

Figure 21: Regulación de FOXO

### mTOR Pathway Diagram

Figure 22: mTOR Pathway Diagram

PIP<sub>2</sub>. Akt then phosphorylates a number of target proteins, including direct regulators of cell survival (such as Bad, see Chapter 18), several transcription factors (some activated by phosphorylation, others inhibited), and other protein kinases, including GSK-3 (which is inhibited by Akt phosphorylation). If not inhibited by Akt, GSK-3 phosphorylates metabolic enzymes, the translation initiation factor eIF2B, and transcription factors.

PI 3-kinase phosphorylates PIP<sub>2</sub> to yield the second messenger PIP<sub>3</sub>, which leads to activation of Akt.

Akt phosphorylates a number of proteins that regulate cell proliferation and survival.

Una vez activado, Akt fosforila una serie de proteínas diana, incluidas proteínas que son reguladores directos de la supervivencia celular (como Bad, discutido en el Capítulo 18), factores de transcripción y otras proteínas quinasas. Los factores de transcripción mejor caracterizados son los factores FOXO, que son miembros de la familia FOX (FIGURA 16.25). La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para chaperonas citosólicas (14-3-3) que luego secuestran FOXO en una forma inactiva en el citoplasma. En ausencia de la señalización del factor de crecimiento y la actividad de Akt, FOXO es liberado de 14-3-3 y se transloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes que inhiben la proliferación celular o inducen la muerte celular. Otro objetivo de Akt es la proteína quinasa GSK-3, que regula el metabolismo así como la proliferación y supervivencia celular. Al igual que FOXO, GSK-3 es inhibida por la fosforilación de Akt. Los objetivos de GSK-3 incluyen varios factores de transcripción y el factor de iniciación de la traducción eIF2B. La fosforilación de# Capítulo 16 Señalización Celular

**FIGURA 16.25 Regulación de FOXO** En ausencia de estimulación por factores de crecimiento, el factor de transcripción FOXO se transloca al núcleo e induce la expresión de genes diana. La estimulación por factores de crecimiento conduce a la activación de Akt, que fosforila FOXO. Esto crea sitios de unión para la proteína citosólica 14-3-3, que secuestra a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma.

eIF2B conduce a una disminución global de la iniciación de la traducción (ver Figura 8.16), por lo que GSK-3 proporciona un vínculo entre la señalización de factores de crecimiento y el control de la síntesis de proteínas celulares.

**mTOR regula la síntesis de proteínas y la autofagia en respuesta a la señalización de Akt y la disponibilidad de energía y aminoácidos.**

## La Vía mTOR

La vía mTOR es un regulador central del crecimiento celular que acopla el control de la síntesis de proteínas a la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía (FIGURA 16.26). Esto se logra mediante la regulación de mTOR por múltiples señales, incluyendo la vía PI 3-kinasa/Akt. La proteína mTOR existe en dos complejos distintos en las células. Como se discutió anteriormente, el complejo mTORC2 es una de las quinasas de proteínas que fosforilan y activan Akt (ver Figura 16.24). En contraste, el complejo mTORC1 es un objetivo aguas abajo de Akt y funciona para regular la síntesis de proteínas. mTORC1 es regulado por la proteína Rheb relacionada con Ras, que a su vez es regulada por la proteína TSC activada por GTP. Akt fosforila e inhibe TSC, lo que lleva a la activación de mTORC1 en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Además, TSC es regulado por otra quinasa llamada AMPK activada por AMP. AMPK detecta# 16.3 Tyrosine Kinases and Signaling by the MAP Kinase and PI 3-Kinase Pathways

**FIGURE 16.26 The mTOR pathway** Akt inhibits TSC, leading to activation of the GTP-binding protein Rheb and mTORC1 in response to growth factor stimulation. In contrast, AMPK activates TSC, leading to inhibition of Rheb and mTORC1 if cellular energy stores are depleted. mTORC1 is also inhibited by amino acid

## Diagrama de la vía mTOR

Figure 23: Diagrama de la vía mTOR

starvation. When active, mTORC1 stimulates translation by phosphorylating S6 kinase (which phosphorylates ribosomal protein S6) and by phosphorylating eIF4E binding protein-1 (4E-BP1), relieving inhibition of translation initiation factor eIF4E. In addition, mTORC1 inhibits autophagy by phosphorylating two of the Atg proteins required for autophagosome formation.

the energy state of the cell and is activated by a high ratio of AMP to ATP. Under these conditions, AMPK phosphorylates and activates TSC, leading to inhibition of mTORC1 when cellular energy stores are depleted. mTORC1 is also regulated by the availability of amino acids, which are required for mTORC1 activity.

mTORC1 phosphorylates at least two well-characterized targets that function to regulate protein synthesis: S6 kinase and eIF4E binding protein-1 (4E-BP1). S6 kinase controls translation by phosphorylating the ribosomal protein S6 as well as other proteins involved in translational regulation. The eIF4E binding protein controls translation by interacting with initiation factor eIF4E, which

**FYI** Rapamycin, an antibiotic produced by a bacterium, is a specific inhibitor of the mTORC1 complex and is used as an immunosuppressive drug in organ transplants.

## Traducción al español

### 16.3 Tirosina quinasas y señalización por las vías de la MAP quinasa y PI 3-quinasa

**FIGURA 16.26 La vía mTOR** Akt inhibe TSC, lo que lleva a la activación de la proteína de unión a GTP Rheb y mTORC1 en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento. En contraste, AMPK activa TSC, lo que lleva a la inhibición de Rheb y mTORC1 si las reservas de energía celular están agotadas. mTORC1 también es inhibido por la falta de aminoácidos. Cuando está activo, mTORC1 estimula la traducción fosforilando la quinasa S6 (que fosforila la proteína ribosomal S6) y fosforilando la proteína de unión eIF4E-1 (4E-BP1), aliviando la inhibición del factor de iniciación de la traducción eIF4E. Además, mTORC1 inhibe la autofagia fosforilando dos de las proteínas Atg necesarias para la formación del autofagosoma.

el estado energético de la célula y se activa por una alta proporción de AMP a ATP. Bajo estas condiciones, AMPK fosforila y activa TSC, lo que lleva a la inhibición de mTORC1 cuando las reservas de energía celular están agotadas. mTORC1 también está regulado por la disponibilidad de aminoácidos, que son necesarios para la actividad de mTORC1.

mTORC1 fosforila al menos dos objetivos bien caracterizados que funcionan para regular la síntesis de proteínas: la quinasa S6 y la proteína de unión eIF4E-1 (4E-BP1). La quinasa S6 controla la traducción fosforilando la proteína ribosomal S6, así como otras proteínas involucradas en la regulación translacional. La proteína de unión eIF4E controla la traducción interactuando con el factor de iniciación eIF4E, que

**FYI** La rapamicina, un antibiótico producido por una bacteria, es un inhibidor específico del complejo mTORC1 y se usa como un medicamento inmunosupresor en trasplantes de órganos. # Capítulo 16: Señalización Celular

se une a la caperuza 5' de los ARNm (ver Figura 8.17). En ausencia de la señalización mTORC1, 4E-BP1 no fosforilado se une a eIF4E e inhibe la traducción interfiriendo con la interacción de eIF4E con eIF4G. La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 previene su interacción con eIF4E, lo que lleva a tasas incrementadas de iniciación de la traducción.

Además de estimular la síntesis de proteínas, mTORC1 inhibe la degradación de proteínas celulares por autofagia. Como se discutió en el Capítulo 11, la autofagia es llevada a cabo por proteínas Atg e implica



la encapsulación de sustancias citoplasmáticas dentro de autofagosomas que posteriormente se fusionan con lisosomas (ver Figura 11.37). mTORC1 bloquea la autofagia mediante la fosforilación inhibitoria de dos subunidades del complejo de andamiaje Atg requerido para iniciar la formación de autofagosomas. Sin embargo, cuando las células están privadas de nutrientes (por ejemplo, fuentes de energía o aminoácidos), la actividad de mTORC1 disminuye, estimulando así la autofagia y permitiendo que las células degraden proteínas no esenciales para que sus aminoácidos puedan ser reutilizados.

## 16.3 REVISIÓN

- Los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento son tirosina quinasas.
- Otros receptores actúan en asociación con tirosina quinasas no receptoras, incluyendo miembros de la familia JAK, que fosforilan y activan factores de transcripción STAT, y miembros de la familia Src, que funcionan aguas abajo de una variedad de receptores de factores de crecimiento, así como integrinas y otras moléculas de adhesión celular.
- La vía de la MAP quinasa está acoplada a los receptores de tirosina quinasa por la pequeña proteína de unión a GTP Ras, que inicia una cascada de señalización de proteínas que lleva a la activación de la MAP quinasa (ERK). ERK luego fosforila una variedad de proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo factores de transcripción que median la inducción de genes de respuesta temprana.
- Otras vías de la MAP quinasa median respuestas de células de mamíferos a la inflamación y el estrés.
- Otra vía importante aguas abajo de los receptores de tirosina quinasa es iniciada por la fosforilación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa). Esto lleva a la activación de la serina/treonina quinasa Akt, que juega un papel clave en la proliferación y supervivencia celular.
- Uno de los objetivos de Akt es la proteína quinasa mTOR, que es un regulador central del crecimiento celular y acopla la síntesis de proteínas y la autofagia a la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía celular.

## Preguntas

1. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un dímero de dos cadenas polipeptídicas. ¿Cómo modularían los monómeros de PDGF la señalización por el receptor de PDGF?
2. Has generado una versión truncada del receptor de EGF que carece del dominio de tirosina quinasa. La expresión de este receptor truncado inhibe la respuesta de las células al EGF. ¿Por qué?
3. Quieres entender la función y regulación de la proteína SYK en células. Al examinar su secuencia de 635 aminoácidos, identificas dos tramos que coinciden con los dominios SH2. Basado en esta información, ¿qué puedes predecir sobre la función y/o regulación de SYK? ¿Puedes diseñar un experimento para probar tu predicción?
4. Un miembro específico de la familia STAT induce genes de respuesta temprana en respuesta a la estimulación por una citoquina. ¿Cómo se vería afectada la inducción de estos genes si sobreexpresas un mutante dominante negativo de JAK?
5. Estás estudiando un gen de respuesta temprana inmediata que es inducido a través de la vía Ras/Raf/MEK/ERK en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. ¿Cómo afectaría la expresión de un siRNA contra el intercambiador de nucleótidos de guanina Ras la inducción de este gen?
6. ¿Cómo regula la vía PI 3-quinasa/Akt la síntesis de proteínas celulares en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento?

## LEARNING OBJECTIVES

**16.4.1** Compare and contrast TGF- $\beta$ /Smad and JAK/STAT signaling.

**16.4.2** Describe the NF- $\kappa$ B pathway.

### 16.4.3 Explain the roles of proteolysis in the Wnt and Notch pathways.

The cAMP, MAP kinase, and PI 3-kinase pathways are examples of indirect connections between the cell surface and the nucleus in which a cascade of second messengers and protein kinases ultimately leads to transcription factor phosphorylation. Several other types of growth factor receptors (examples of which are discussed in this section) are more directly coupled to transcription factors that play key roles in cell proliferation, differentiation, and survival.

#### The TGF- $\beta$ /Smad pathway

The TGF- $\beta$ /Smad pathway is similar to JAK/STAT signaling (see Figure 16.17) in that a protein kinase associated with a receptor directly phosphorylates and activates a transcription factor. However, the receptors for transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and related polypeptides are protein kinases that phosphorylate serine or threonine, rather than tyrosine, residues on their substrate proteins. TGF- $\beta$  is the prototype of a family of polypeptide growth factors that control proliferation and differentiation of a variety of cell types. The cloning of the first receptor for a member of the TGF- $\beta$  family in 1991 revealed that it is the prototype of a unique receptor family with a cytosolic serine/threonine kinase domain. Since then, receptors for additional TGF- $\beta$  family members have similarly been found to be serine/threonine kinases.

The TGF- $\beta$  receptors are composed of two distinct polypeptides (designated type I and type II) that become associated following ligand binding (FIGURE 16.27). The type II receptor then phosphorylates the type I receptor, which in turn phosphorylates transcription factors of the Smad family. In the absence of TGF- $\beta$ , most Smads undergo continuous nucleocytoplasmic shuttling, whereas phosphorylated Smads form complexes that accumulate in the nucleus and stimulate expression of target genes. The mechanism(s) responsible for nuclear accumulation of Smads is a topic of ongoing research, and distinct mechanisms may exist for different family members. It appears that some Smads, once phosphorylated, are recognized and retained in the nucleus by nuclear factors.

It should be noted that there are at least 30 different members of the TGF- $\beta$  family in humans, which elicit different responses in their target cells. This is accomplished by combinatorial interactions of seven different type I receptors and five type II receptors, which lead to activation of different members of the Smad family (a total of eight family members).

#### NF- $\kappa$ B signaling

NF- $\kappa$ B signaling is another example of a signaling pathway that targets a specific family of transcription factors, in this case by stimulating ubiquitination and degradation of an inhibitory subunit. The NF- $\kappa$ B family consists of five transcription factors that play key roles in the immune system and in inflammation as well as in regulation of proliferation and survival of many types of animal cells. Members of this transcription factor family are activated in response to a variety of stimuli, including cytokines, growth factors, bacterial and viral infections, and DNA damage.

Figure 16.27 **FIGURE 16.27** Signaling from TGF- $\beta$  receptors TGF- $\beta$  receptors are dimers of type I and type II polypeptides. The type II receptor phosphorylates and activates type I, which then phosphorylates a Smad protein. Phosphorylated Smads form complexes and translocate to the nucleus to activate transcription of target genes.

**TGF- $\beta$  receptors are serine/threonine kinases that phosphorylate Smad transcription factors.**

**A variety of stimuli, including cytokines and growth factors, regulate gene expression through activation of NF- $\kappa$ B transcription factors.**

Signaling Pathway # Capítulo 16: Señalización Celular

Figura 16.28 **Figura 16.28** Señalización de NF- $\kappa$ B desde el receptor TNF. En el estado inactivo, los homó- o heterodímeros de NF- $\kappa$ B están unidos a I $\kappa$ B en el citoplasma. La activación del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (que consiste en cadenas polipeptídicas) conduce al reclutamiento de proteínas

adaptadoras que activan la I $\kappa$ B quinasa. La fosforilación de I $\kappa$ B por la I $\kappa$ B quinasa conduce a su ubiquitinación y su degradación por el proteasoma, permitiendo que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

Los caminos de señalización que llevan a la activación de NF- $\kappa$ B han sido particularmente bien estudiados aguas abajo del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF), una citoquina que induce inflamación y muerte celular, y de los receptores tipo Toll, que reconocen una variedad de moléculas asociadas con bacterias patógenas y virus. Como se introdujo en el Capítulo 10 (ver Figura 10.14), en células no estimuladas, las proteínas NF- $\kappa$ B están unidas a proteínas inhibidoras I $\kappa$ B que enmascaran sus señales de localización nuclear, secuestrando así a NF- $\kappa$ B en un estado inactivo en el citosol (Figura 16.28). La activación de los receptores TNF y Toll-like resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la I $\kappa$ B quinasa, que fosforila I $\kappa$ B. Esta fosforilación causa cambios conformacionales que permiten a una ligasa de ubiquitina ( $\beta$ -TrCP) reconocer y ubiquitinar I $\kappa$ B para su degradación por el proteasoma, liberando NF- $\kappa$ B para translocarse al núcleo e inducir la expresión de sus genes diana.

## Las vías Wnt y Notch

La vía Wnt es un ejemplo de una vía de señalización que activa factores de transcripción al inhibir su ubiquitinación y degradación. Descrita por primera vez en *Drosophila*, se ha encontrado que los miembros de la familia Wnt controlan una amplia gama de eventos durante el desarrollo de vertebrados e invertebrados, así como desempeñan un papel clave en la regulación de la proliferación de células madre en tejidos adultos (ver Capítulo 18).

Las proteínas Wnt son una familia de proteínas secretadas que se unen a un complejo de receptores de las familias Frizzled y LRP (Figura 16.29). La señalización de Frizzled y LRP conduce a la estabilización de  $\beta$ -catenina, que se discutió en el Capítulo 15 como una proteína que une cadherinas a la actina en las uniones adherentes (ver Figura 15.18). Importante, la unión de cadherinas a la actina es solo una de las funciones de  $\beta$ -catenina. En la señalización Wnt,  $\beta$ -catenina actúa como un activador directo de la expresión génica al funcionar como un activador transcripcional. En ausencia de señalización Wnt,  $\beta$ -catenina es fosforilada por GSK-3 en un complejo con axina y APC (llamado el complejo de destrucción). Análogo a I $\kappa$ B (ver Figura 16.28), la  $\beta$ -catenina fosforilada es reconocida por una ligasa de ubiquitina, que resulta en su ubiquitinación y degradación. La unión de Wnt conduce a la asociación de Dishevelled (una proteína citoplasmática) con Frizzled, lo que interrumpe el complejo de destrucción e inhibe GSK-3, previniendo así la degradación de  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina entonces se transloca al núcleo y forma un complejo con miembros de la familia de factores de transcripción Tcf. En ausencia de  $\beta$ -catenina, los factores Tcf actúan como represores. La asociación de  $\beta$ -catenina convierte a los miembros de la familia Tcf en activadores, llevando a la expresión de genes que codifican otras moléculas de señalización celular y una variedad de factores de transcripción que controlan el destino de las células.

La vía Notch es otra vía de señalización altamente conservada que controla el destino celular durante el desarrollo animal. La señalización Notch es un ejemplo de interacción célula-célula directa durante el desarrollo. Notch es una proteína grande con un dominio transmembrana único que sirve como receptor para proteínas de señalización de membrana (por ejemplo, Delta) en la superficie de células adyacentes (Figura 16.30). La estimulación de Notch inicia una nueva y directa vía de activación de transcripción. En particular, la unión del ligando conduce a la proteólisis de Notch dentro de su dominio transmembrana por una proteasa embebida en la membrana llamada presenilina, que funciona en un complejo con otras tres proteínas (nicastrina, Aph-1 y Pen-2) llamada  $\gamma$ -secretasa. Esta escisión de Notch libera su dominio intracelular, el cual

transloca al núcleo donde interactúa con un factor de transcripción (llamado CSL en mamíferos), convirtiéndolo de un represor a un activador de sus genes diana. Al igual que en la vía de señalización de Wnt, los genes diana de Notch incluyen genes que codifican otras proteínas reguladoras de la transcripción, que actúan para determinar el destino celular.

## 16.4 REVISIÓN

- Los miembros de la familia del receptor TGF- $\beta$  son quinasas de serina/treonina que fosforilan y activan factores de transcripción Smad.
- Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B se activan en respuesta a citocinas, factores de crecimiento y una variedad de otros estímulos. Su activación se media por fosforilación y degradación de subunidades inhibitoras I $\kappa$ B.
- Las vías de Wnt y Notch juegan roles clave en la determinación del destino celular durante el desarrollo animal.

### FIGURA 16.29 La vía de Wnt

- (A) En ausencia de Wnt,  $\beta$ -catenina es fosforilada por GSK-3 en un complejo con caseína quinasa I, axina y APC (el complejo de destrucción), lo que lleva a la ubiquitinación y degradación de  $\beta$ -catenina. (B) Los polipéptidos Wnt se unen a los receptores Frizzled y LRP, lo que lleva al reclutamiento de Dishevelled, la inactivación del complejo de destrucción y la estabilización de  $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina luego se transloca al núcleo y forma un complejo con los factores de transcripción Tcf, convirtiéndolos de represores a activadores de sus genes diana.

### FIGURA 16.30 Señalización de Notch

Notch sirve como un receptor para la señalización directa de célula a célula por proteínas transmembrana (por ejemplo, Delta) en células vecinas. La unión de Delta lleva a la escisión proteolítica de Notch por presenilina como parte del complejo  $\gamma$ -secretasa que también incluye nicastrina, Aph-1 y Pen-2. Esto libera el dominio intracelular de Notch, que se transloca al núcleo e interactúa con el factor de transcripción CSL para inducir la expresión génica.

#### (A) Ausencia de Wnt

Componente	Localización
Membrana plasmática	Frizzled
Citoplasma	LRP
Citoplasma	Dishevelled
Citoplasma	Complejo de destrucción (Axina, APC, GSK-3, CK1)
Citoplasma	$\beta$ -catenina
Núcleo	Tcf

#### (B) Presencia de Wnt

Componente	Localización
Membrana plasmática	Frizzled
Membrana plasmática	LRP
Citoplasma	Wnt
Citoplasma	Dishevelled
Citoplasma	Axina
Citoplasma	APC
Citoplasma	GSK-3
Citoplasma	CK1
Citoplasma	$\beta$ -catenina
Núcleo	$\beta$ -catenina

Componente	Localización
Núcleo	Tcf

### Señalización de Notch

Componente	Localización
Exterior de la célula	Delta
Membrana plasmática	Notch
Citoplasma	Complejo $\gamma$ -secretasa (nicastrina, Aph-1, Pen-2)
Núcleo	CSL

## 16.5 Signaling Dynamics and Networks

**LEARNING OBJECTIVES 16.5.1** Diagram a feedback loop.

**16.5.2** Explain how the dynamics of signaling can alter a biological response.

**16.5.3** Summarize the role of crosstalk in integrating cellular response to extracellular stimuli.

Hemos discutido la señalización en términos de vías lineales que transmiten información desde el entorno a los objetivos intracelulares. Sin embargo, la señalización dentro de la célula es más complicada. Primero, las actividades de muchas vías de señalización están reguladas por bucles de retroalimentación que controlan la extensión y duración de la actividad de señalización. Además, las vías de señalización no operan en aislamiento; hay un frecuente cruce entre diferentes vías, por lo que la señalización intracelular que finalmente se produce necesita ser entendida como una red integrada de vías conectadas. Como se discutió en el Capítulo 9, el modelado computacional de la dinámica de tales redes de señalización (ver Figura 9.21) es un área de interés actual en la biología de sistemas.

### Bucles de retroalimentación y dinámica de señalización

La actividad de las vías de señalización está controlada por bucles de retroalimentación, que son similares en principio a la regulación de retroalimentación de las vías metabólicas (ver Figura 2.37). Un buen ejemplo de un bucle de retroalimentación negativo es proporcionado por la vía NF- $\kappa$ B (FIGURA 16.31). NF- $\kappa$ B es activado por señales que inducen la fosforilación y degradación del inhibidor I $\kappa$ B, permitiendo que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo e induzca la expresión de sus genes objetivo (ver Figura 16.28). Uno de los genes objetivo inducidos por NF- $\kappa$ B codifica I $\kappa$ B, por lo que la señalización de NF- $\kappa$ B lleva a la síntesis de nuevo I $\kappa$ B, que inhibe la actividad continua de NF- $\kappa$ B. Esta regulación es crítica porque la extensión y duración de la actividad de NF- $\kappa$ B puede determinar la respuesta transcripcional de la célula. Por ejemplo, algunos genes objetivo son inducidos por la actividad transitoria de NF- $\kappa$ B, persistiendo por

FIGURE 16.31 **FIGURA 16.31** Inhibición de retroalimentación de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B es activado como resultado de la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B (ver Figura 16.28), permitiendo que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo e induzca la transcripción activa de genes objetivo. Uno de los genes activados por NF- $\kappa$ B codifica I $\kappa$ B, generando un bucle de retroalimentación que inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B. # 16.5 Signaling Dynamics and Networks

FIGURE 16.32 Crosstalk between the ERK and PI 3-kinase signaling pathways. The Ras/Raf/MEK/ERK and PI 3-kinase/Akt/mTORC1 pathways are connected by both positive and negative crosstalk, including activation of PI 3-kinase by Ras, inhibition of Raf by Akt, inhibition of TSC by ERK, and activation of mTORC1 by ERK.

only 30–60 minutes, whereas the induction of other genes requires several hours of sustained NF- $\kappa$ B signaling.

Signaling by the ERK MAP kinase provides another example of the importance of signaling duration. In a well-studied model of cell differentiation in response to nerve growth factor (NGF), ERK signaling can lead either to cell proliferation or to neuronal differentiation depending on the duration of ERK activity. In particular, transient activation of ERK (for 30–60 minutes) stimulates cell proliferation, but sustained activation of ERK for 2–3 hours induces differentiation of the NGF-treated cells into neurons. Although the mechanism by which these differences in the duration of ERK activity lead to such distinct biological outcomes remains to be understood, it is clear that quantitative considerations of signaling activity are critical to cell response.

## Networks and crosstalk

Crosstalk refers to the interaction of one signaling pathway with another, which integrates the activities of different pathways within the cell. For example, there is extensive crosstalk between the PI 3-kinase/Akt/mTORC1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways (FIGURE 16.32). These two signaling pathways are activated downstream of tyrosine kinase receptors and play critical roles in the control of cell proliferation and survival. The crosstalk between them includes both positive and negative points of regulation, which serve to coordinate their activities within the cell.

The extensive crosstalk between individual signaling pathways means that multiple pathways interact with one another to form signaling networks within the cell. A full understanding of cell signaling will therefore need to go beyond the analysis of individual pathways to the development of network models that predict the dynamic behavior of the interconnected signaling pathways that ultimately result in a biological response.

## 16.5 REVIEW

- The activity of signaling pathways within the cell is regulated by feedback loops that control the extent and duration of signaling.
- Quantitative differences in activity can be critical to the biological outcome of signaling pathways.
- Different signaling pathways interact by crosstalk to regulate each other's activity.
- The extensive crosstalk between individual pathways leads to the formation of complex signaling networks. A full understanding of signaling within the cell will require the development of quantitative network models.

## Questions

1. What type of gene might be induced by ERK signaling to generate a negative feedback loop?
2. Suggest a model to explain why some genes are rapidly induced in response to NF- $\kappa$ B signaling whereas others require a longer period of signaling.
3. How would inhibition of PI 3-kinase affect ERK activity in a growth factor-stimulated cell?

Actividades de vías de señalización individuales coordinadas por crosstalk.# 16.1 Investigating Roles for Ras/Raf/MEK/ERK and PI 3-Kinase Signaling in the Regulation of Cell Survival and Apoptosis by Growth Factors

**Source:** Yao, R., and G. M. Cooper. 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003–2006.

## Background

Como se discutió en este capítulo, los factores de crecimiento peptídicos regulan una variedad de comportamientos celulares de mamíferos al unirse a receptores de tirosina quinasa en la membrana plasmática (ver Figuras 16.14 y 16.15) y, a su vez, activando vías de señalización intracelular. En 1995, Yao y Cooper publicaron un estudio en el que investigaron las vías de señalización a través de las cuales los factores de crecimiento inhiben la apoptosis, centrándose en Ras/Raf/MEK/ERK (ver Figura 16.20) y PI 3-kinasa señalización (ver Figura 16.24).

La línea celular de ratón PC-12 fue utilizada, lo que proporcionó dos ventajas importantes. Primero, las células PC-12 responden de manera robusta a los factores de crecimiento. Por ejemplo, el tratamiento con cualquier nuevo factor de crecimiento (NGF) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) activa las vías de Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-kinasa e inhibe la apoptosis. En segundo lugar, las células PC-12 expresan receptores para ambos factores de crecimiento (por ejemplo, el receptor NGF y el receptor PDGF), pero no expresan el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Esto permitió a Yao y Cooper diseccionar los efectos de la señalización de Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-kinasa al introducir un receptor mutante de PDGF que activa Ras/Raf/MEK/ERK, pero no PI 3-kinasa, en respuesta a PDGF. Por el contrario, el receptor de tipo salvaje activa ambas vías.

El receptor mutante de PDGF tiene una sustitución de tirosina-740 con fenilalanina (Y740F). La activación de PI 3-kinasa por el receptor de tipo salvaje requiere la unión de PI 3-kinasa a fosfotirosina-740, por lo que el mutante Y740F no puede estimular la señalización de PI 3-kinasa. La activación de Ras/Raf/MEK/ERK por el receptor de PDGF no depende de la fosfotirosina-740, por lo que la activación de esta vía no se ve afectada por la mutación Y740F.

Usando estas herramientas, Yao y Cooper realizaron los siguientes experimentos para abordar la pregunta: ¿Qué vía de señalización—Ras/Raf/MEK/ERK o PI 3-kinasa/Akt—media la inhibición de la apoptosis en respuesta a factores de crecimiento?

## Experimentos

Primero, las células PC-12 que expresan el tipo salvaje (WT) o el mutante (Y740F) del receptor de PDGF fueron generadas por infección con partículas retrovirales empaquetadas con ADNc (ver Figura 3.31) que codifican el receptor correspondiente. Los lisados de estas células fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a una membrana (ver Figura 3.26) y se analizaron las células infectadas de PC-12 (PC-12) usando un anticuerpo para detectar el receptor de PDGF (Panel A).

Luego, la señalización de Ras/Raf/MEK/ERK en respuesta a PDGF fue evaluada usando un ensayo de gel *in vitro*. Las células fueron incubadas sin (-) o con (+) PDGF durante 7 minutos y luego los lisados fueron recolectados y sometidos a SDS-PAGE a través de un gel en el que una diana de fosforilación de ERK (mielina básica proteína) fue embebida e inmovilizada. Después de la electroforesis, el SDS fue removido del gel para renaturar las proteínas y el gel fue incubado en una solución que contiene [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Después de la incubación, el exceso de ATP fue removido lavando el gel en un tampón no radioactivo. El gel fue secado y sometido a autoradiografía (Panel B).

La señalización de PI 3-kinasa también fue evaluada después de 7 minutos con o sin tratamiento con PDGF. Después de cosechar los lisados, la PI 3-kinasa fue inmunoprecipitada (ver Figura 3.28) y sometida a un ensayo *in vitro* que contiene fosfatidilinositol sintético (PI) + [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP durante 30 minutos. La reacción fue luego sometida a cromatografía de capa delgada (TLC) para detectar fosfatidilinositol (PI) (PIP) como producto de la actividad de PI 3-kinasa. Para TLC, una gota de cada reacción fue colocada en la parte inferior de una placa de capa delgada recubierta con una capa delgada de gel de sílice (Panel C). La parte inferior de la placa fue sumergida en un solvente orgánico, que fue arrastrado a través de la parte superior de la placa por acción capilar, llevando el PIP con él. La placa fue luego sometida a autoradiografía (Panel C).

Por último, la capacidad del tratamiento con PDGF para inhibir la apoptosis en células PC-12 normales que expresan el receptor WT o Y740F de PDGF fue examinada mediante un ensayo de fragmentación de ADN. Durante la apoptosis, los núcleos liberan ADN internucleosomal y los fragmentos resultantes de ADN son expulsados al citoplasma. Así, la presencia de fragmentos de ADN citosólico proporciona un marcador para la apoptosis. Yao y Cooper aislaron ADN citosólico de células incubadas durante 16 horas con PDGF o NGF con o sin factores de crecimiento. Las fracciones fueron luego sometidas a electroforesis a través de un gel de agarosa, en el cual el ADN fue transferido a una membrana, que luego fue incubada con <sup>32</sup>P-marcado, ADNc digerido con EcoRI que actúa como una sonda. La membrana fue luego sometida a autoradiografía (Panel D).

## Preguntas

1. ¿Cómo se esperaba que la expresión del receptor de PDGF difiriera entre las tres líneas celulares—PC-12, WT y Y740F? ¿La expresión fue como se esperaba? Explica por qué sí o por qué no.
2. ¿Cómo afectó el tratamiento con PDGF la señalización de Ras/Raf/MEK/ERK en las tres líneas celulares?
3. ¿Cómo afectó el tratamiento con PDGF la señalización de PI 3-kinasa en las tres líneas celulares?
4. ¿Fueron los efectos del tratamiento con PDGF en Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-kinasa señalización consistentes con lo que se esperaba? Explica por qué sí o por qué no.
5. ¿Alguna de las tres líneas celulares sufrió apoptosis en ausencia de factores de crecimiento? Si es así, ¿cuáles?
6. ¿Qué efecto tuvo el tratamiento con NGF en la apoptosis en las tres líneas celulares? ¿Fueron los efectos como se esperaba? Explica.
7. ¿Qué efecto tuvo el tratamiento con PDGF en la apoptosis en las tres líneas celulares?
8. ¿Qué indican los datos sobre la pregunta fundamental de Yao y Cooper: ¿Qué vía de señalización—Ras/Raf/MEK/ERK o PI 3-kinasa/Akt—media la inhibición de la apoptosis en respuesta a factores de crecimiento?# Problema de Análisis de Datos (continuación)
9. En otro experimento (no mostrado aquí), Yao y Cooper demostraron que los factores de crecimiento inhibieron la apoptosis en células PC-12 que expresan un Ras dominante-negativo mutante. ¿Qué indica este hallazgo sobre el papel de la señalización Ras/Raf/MEK/ERK en la inhibición de la apoptosis?
10. Con la pregunta fundamental de Yao y Cooper en mente, observe que tres de los cuatro paneles (A, B y C) no examinaron la apoptosis en absoluto. Sin embargo, los datos en esos tres paneles fueron muy relevantes para su pregunta experimental. ¿Por qué es este el caso?

(A)	(B)	(C)	(D)
PC-12	WT	Y740F	PC-12
-	+	-	+
Panel A	Panel B	Panel C	Panel D

## Lecturas Sugeridas

### 16.1 Moléculas de Señalización y sus Receptores

- Cohen, S. 2008. Orígenes de los factores de crecimiento: NGF y EGF. *J. Biol. Chem* 283: 33793–33797.
- Cunningham, T. J., y G. Duester. 2015. Mecanismos de señalización del ácido retinoico y sus roles en el desarrollo de órganos y miembros. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 110–123.

### 16.2 Proteínas G y AMP Cíclico

- Mayr, B., y M. Montminy. 2001. Regulación transcripcional por el factor dependiente de fosforilación CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599–609.
- Wootten, D., A. Christopoulos, M. Marti-Solano, M. M. Babu, y P. M. Sexton. 2018. Mecanismos de señalización y agonismo basado en sesgo en receptores acoplados a proteínas G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 638–653.



### **16.3 Tirosina Quinasas y Señalización por las Vías de la Quinasa MAP y PI3-Kinasa**

- Fruman, D. A., H. Chiu, B. D. Hopkins, S. Bagrodia, L. C. Cantley, y R. T. Abraham. 2017. La vía PI3K en la enfermedad humana. *Cell* 170: 605–635.
- Lavoie, H., J. Gagnon, y M. Therrien. 2020. Señalización ERK: Un regulador maestro del comportamiento celular, la vida y el destino. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 607–632.

### **16.4 Receptores Acoplados a Factores de Transcripción**

- Nusse, R., y H. Clevers. 2016. Señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, enfermedad y modalidades terapéuticas emergentes. *Cell* 169: 985–999.
- Zhang, Q., A. M. Lenardo, y D. Baltimore. 2016. 30 años de NF- $\kappa$ B: Un florecimiento de relevancia para la patobiología humana. *Cell* 168: 37–57.

### **16.5 Dinámicas y Redes de Señalización**

- Mendoza, M. C., E. E. Er, y J. Blenis. 2011. Las vías Ras-ERK y PI3K-mTOR: Interacciones cruzadas y compensación. *Trends Biochem. Sci.* 36: 320–328.
- Purvis, J. E., y G. Lahav. 2013. Codificación y decodificación de información a través de dinámicas de señalización. *Cell* 152: 945–956.