

XVII Ciclo de Conferencias Juan March sobre Biología

«Señalización por fosforilación de tirosinas»

Ponencias de cuatro científicos, entre ellos el Nobel de Medicina Edmond H. Fischer

Signalling Through Tyrosine Phosphorylation («Señalización por fosforilación de tirosinas») fue el tema elegido para el XVII Ciclo de Conferencias Juan March sobre Biología, que convoca anualmente el Centro de Reuniones Internacionales sobre Biología, del Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, y que se desarrolló, en sesiones públicas, entre el lunes 2 y el lunes 23 del mes de marzo. Cuatro científicos extranjeros mostraron sus últimos trabajos en torno al tema general objeto del ciclo. El lunes 2 de marzo, el Nobel de Medicina Edmond H. Fischer habló de *Cell Regulation by Protein Phosphorylation* y fue presentado por Carmelo Bernabéu, del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid. El lunes 9 de marzo, Tony Hunter habló de *Structure and Function of Tyrosine Kinases and Phosphatases* y fue presentado por César de Haro, del Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», Universidad Autónoma, Madrid. El lunes 16 de marzo, Joseph Schlessinger habló de *Mechanism of Action of Growth Factor Receptors* y fue presentado por Flora de Pablo, del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid. El lunes 23 de marzo, James E. Darnell habló de *Signalling Genes from the Cell Surface* y fue presentado por Rafael Fernández Muñoz, del Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Los ponentes

Edmond H. Fischer (Shangai, China, 1920) estudió en la Universidad de Ginebra. A mediados de los años cincuenta se trasladó al Instituto Tecnológico de California y posteriormente se integró en la Universidad de Washington, en Seattle, de la que es profesor emérito. En Seattle inició con Edwin Krebs los estudios sobre la glucógeno fosforilasa. En 1992, ambos obtuvieron el Premio Nobel de Medicina.

Tony Hunter (Kent, Inglaterra, 1943) se doctoró en la Universidad de Cambridge, en 1969. Tras

una etapa postdoctoral en los Institutos Salk de La Jolla, en 1975 se instaló allí definitivamente como investigador independiente. Toda su carrera científica se ha desarrollado en este prestigioso centro de investigación, donde es profesor desde 1982.

Joseph Schlessinger (1945) comenzó sus estudios universitarios de Física y Química en The Hebrew University, de Jerusalén. Ha impartido la docencia en Israel y en EE. UU. Es profesor y jefe del Departamento de Farmacología del New York University Medical

Center, y desde 1998 director del Skirball Institute for Biomolecular Medicine del citado centro universitario.

James E. Darnell (Columbus, Mississippi, 1930) trabaja en el Laboratory of Molecular Cell Biology, de la Universidad Rockefeller, de Nueva York, de la que es profesor desde 1974; anteriormente estuvo en el Massachusetts Institute of Technology y en la Universidad de Columbia. Es autor, con otros investigadores, de los libros *General Virology* y *Molecular Cell Biology*.

Edmond H. Fischer

Regulación celular por fosforilación de proteínas

Para explicar la regulación de la señalización celular podemos hacer una analogía con un aparato de televisión; éste contiene receptores que permiten captar la señal externa, la cual va a ser transducida para dar una respuesta en el fototubo, en forma de imágenes y sonido. La diferencia estriba en que las células son mucho más complejas que un aparato de T.V. De hecho, en las células hay receptores para un número muy alto de moléculas y estímulos, tales como factores de crecimiento, hormonas, fármacos, sustancias olorosas, luz, etc. Podemos considerar el paso de organismos unicelulares a pluricelulares como uno de los grandes hitos en la historia de la Evolución. La diferencia radica en que las células individuales compiten, mientras que las células de un organismo cooperan. Para ello tienen que producirse interacciones celulares, que transcurren a través de la matriz extra-celular. El tráfico constante de mensajes químicos entre células resulta indispensable para que las células individuales posean información sobre el ambiente que las rodea, y esto es un requisito para que pueda haber coordinación celular. En su forma más compleja, este tipo de interacción entre células neuronales da lugar a la memoria, el pensamiento y la consciencia. Una de las señales más frecuentemente empleadas para mantener todas las reacciones celulares bajo control es la fosforilación reversible. Comencé a estudiar este fenómeno hace más de 40 años, mientras investigaba la degradación del glucógeno. Uno de los primeros pasos enzimáti-



cos consiste en la fosforilación de glucosa a glucosa 1-fosfato. La fosforilasa correspondiente está regulada por AMP, siendo activa la forma enzimática ligada a dicha molécula. Nuestro objetivo era descubrir el papel del AMP en este proceso: nunca lo logramos (el fenómeno de regulación alostérica fue descubierto diez años más tarde).

Lo que sí descubrimos, en parte por casualidad, fue el fenómeno de regulación enzimática por fosforilación reversible. En estos casos, la actividad de una enzima es regulada por una pareja de enzimas adicionales: una quinasa, que añade un grupo fosfato a la proteína volviéndola activa, y una fosfatasa que cataliza la reacción contraria revirtiendo el proceso. Este tipo de regulación está implicado en prácticamente todos los aspectos del metabolismo. En la mayoría de los casos, los aminoácidos fosforilados son serina o treonina, pero Tony Hunter y sus colaboradores descubrieron hace veinte años que la fosforilación de tirosinas tiene gran importancia en procesos de diferenciación y transformación. Un ejemplo de regulación mediante fosforilación reversible nos lo dan los receptores de factores de crecimiento. Estas proteínas contienen un dominio catalítico intra-celular, que está muy conservado en todos los casos, y diversos dominios extracelulares. El fenómeno de transducción conlleva la autofosforilación del propio receptor, la cual se produce en uno de los segmentos más conservados, denominados SH2 y SH3 (dominios homólogos a Src). Por ejemplo, la activación del

proto-oncogén *Ras* por factores de crecimiento conlleva la dimerización del receptor, auto-fosforilación, reclutamiento de las proteínas *sos-Ras*, hidrólisis de GTP e inicio de la cascada de quinasas. Un esquema similar es aplicable a muchos otros casos, como el de los receptores de insulina. El proceso de fosforilación reversible requiere siempre el concurso de una fosfatasa que revierta la reacción. Esta familia de proteínas ha recibido mucha atención últimamente. Es importante señalar que su papel no es únicamente el de deshacer el trabajo de la quinasa, sino que puede actuar como

modulador positivo o negativo de una respuesta dada. Nosotros hemos identificado recientemente una fosfatasa específica de placenta humana, denominada PTP1b. Esta proteína presenta homología en su dominio interno con una proteína de presentación de antígeno de los leucocitos CD45, la cual es requerida para la fosforilación de tirosina previa a la activación de células T. Este resultado abre la puerta a una interesante hipótesis, según la cual los receptores correspondientes a PTP participarían en interacciones célula-célula, tal vez mediando la inhibición de los contactos.

Carmelo Bernabéu

Fosforilación reversible de proteínas

En Seattle, a los pocos meses de llegar, Fischer inició una estrecha colaboración con Edwin G. Krebs sobre la regulación de la fosforilasa del glucógeno. Estos trabajos establecieron por primera vez la regulación hormonal del metabolismo del glucógeno por un mecanismo de fosforilación y defosforilación de las enzimas implicadas en el proceso. Desde entonces, Fischer ha estado interesado en la regulación de los procesos celulares mediante la fosforilación reversible de proteínas. Recientemente, ha centrado sus esfuerzos en la identificación, caracterización y regulación de proteínas tirosina fosfatasa, analizando sus implicaciones en las rutas de señalización tanto de células normales como tumorales. La activación celular producida por la interacción de un ligando con su receptor de membrana conlleva frecuentemente la



estimulación de tirosina-quinasa, bien porque el receptor mismo lo sea, como en el caso de los receptores de insulina, EGF y PDGF, o bien porque el receptor active otras tirosina-quinasa, como en el caso de los receptores de citoquinas que activan las familias de tirosina-quinasa Jak y Src.

En todos estos casos, la fosforilación en tirosina del receptor y de otras moléculas señalizadoras es esencial para la transmisión de la estimulación inicial, que tendrá como resultado final, dependiendo del tipo de señal y de la célula diana, la proliferación, la diferenciación o la transformación celular. Es evidente que en la regulación de estos procesos están implicadas las proteínas tirosina-fosfatasa, que constituyen una creciente familia de enzimas intracelulares y transmembranales que catalizan la reacción contraria.

Tony Hunter

Estructura y función de tirosina-quinasa y fosfatasa

Las tirosina-quinasa juegan un papel importante en muchos aspectos de la Biología Celular, entre los que cabe destacar: el crecimiento y morfología celular, diferenciación, ciclo celular, apoptosis, transcripción génica, transporte de glucosa, activación de plaquetas y coagulación sanguínea, angiogénesis y regulación de canales iónicos en la transmisión neuronal.



Podemos dividir los receptores de tirosina-quinasa (TKR) en dos grupos: los binarios y los intrínsecos; en el primer grupo el dominio extracelular se encuentra asociado de manera no covalente con una proteína intracelular que tiene actividad tirosina-quinasa, mientras que en el segundo grupo ambas funciones coexisten en la misma proteína.

Dentro de los receptores intrínsecos, se distinguen las siguientes regiones: 1) un dominio extracelular, que es el que se une al ligando y en el que se da una gran variabilidad de estructuras; 2) un dominio transmembranal; 3) una región intracelular con actividad catalítica tirosina-quinasa; y 4) una región intracelular no catalítica donde tiene lugar la autofosforilación.

El mecanismo de activación de estos receptores incluye las siguientes etapas: 1) unión al ligando; 2) dimerización del receptor; 3) fosforilación recíproca de las subunidades del dímero, lo que lleva a su activación; y 4) fosforilación de otros sustratos, lo que inicia una cascada de fosforilaciones que en último término dan lugar a una respuesta celular.

Estos procesos son muy complejos

y muchas de sus etapas están aún por dilucidar; no obstante, la investigación se ha centrado en algunos aspectos determinantes, tales como el «reclutamiento» por parte del receptor de otras proteínas implicadas en el proceso; la identificación de dominios modulares de reconocimiento en las proteínas de señalización, tales como SH2 y SH3; y la identificación de moléculas diana que se encuentren aguas abajo de la fosforilación.

Un ejemplo bien conocido de activación mediante tirosina-quinasa es el del factor de las células madre en eucariotas, necesario para la proliferación de este tipo de células. La quinasa PI3 es una de las vías más importantes para la activación de este receptor. Dicha enzima activada genera 3' fosfo inosítidos, los que a su vez activan las serina-quinasa Pdk1 y Akt.

Posteriormente se produce la fosforilación por Akt del residuo de serina 136 de la proteína Bad, perteneciente a la familia de proteínas proapoptóticas Bcl-2. La inactivación de Bad es necesaria para la supervivencia celular inducida por el factor de las células madre.

Otro caso interesante es la activación mediada por adhesión de células a la matriz extracelular. En este proceso están implicados receptores de integrina, y es necesario para la supervivencia, proliferación y migración de ciertos tipos celulares. Este proceso tiene lugar mediante la activación de las tirosina-quinasa de adhesión focal de las familias FAK y Src.

Esto a su vez lleva a la activación de la MAP quinasa ERK, y las quinasas PI3 y Akt. Se sabe que pueden activarse varias vías en paralelo, cada una de las cuales es suficiente para activar ERK. La otra cara de la moneda viene dada por los receptores con actividad tirosina-fosforilasa (PTP).

En este caso la regulación tiene lugar también por dimerización del receptor, pero al contrario que en el caso anterior, la dimerización provoca una inactivación del mismo. En el caso del receptor aPTP de los linfocitos CD45, se ha comprobado la existencia de un dominio en el monómero

que actúa a modo de cuña, insertándose en el sitio activo del otro monómero e inactivándolo. Este receptor es indispensable para la activación de linfocitos.

En general, puede afirmarse que fosforilaciones anómalas de tirosinas son un rasgo común a muchas enfermedades, tales como el síndrome de Crouzon, el síndrome de Pfeiffer, la displasia tanotrófica, así como diversos tipos de cáncer.

Los progresos en la investigación en este campo permiten albergar esperanzas de que en un futuro se disponga de fármacos dirigidos a combatir estas enfermedades.

César de Haro

Sistemas que estimulan e inhiben el crecimiento celular

Tony Hunter ha publicado más de 350 trabajos científicos originales y de revisión, en las revistas de más impacto, realizando importantes contribuciones al conocimiento de la fosforilación de proteínas, el control del crecimiento celular, la regulación del ciclo celular y la oncogénesis.

De entre sus trabajos en los que ha sido pionero, destaca su descubrimiento en 1980 de que el producto del gen transformante *src* del virus del sarcoma de Rous, el primer oncogén descrito, es una proteína tirosina-quinasa.

Por vez primera, se describía la existencia de residuos de fosfotirosina en proteínas y se demostraba que esa nueva actividad enzimática era la responsable de la transformación de la célula infectada. Este descubrimiento ha contribuido decisivamente



al desarrollo del conocimiento posterior en procesos tan importantes como son el crecimiento y diferenciación celular, la regulación de la transcripción de genes eucarióticos, la transmisión sináptica o la acción de la insulina, entre otros.

Durante la década de los 90, Tony Hunter se ha interesado también por los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular y su implicación directa en los procesos de transformación maligna.

Sus aportaciones originales en este campo están ayudando a entender la compleja interconexión entre los sistemas que estimulan e inhiben el crecimiento celular. La perturbación de alguno de los circuitos que componen esta intrincada red será, quizás, una de las causas fundamentales del cáncer.

Joseph Schlessinger

Mecanismo de acción de los receptores de factores de crecimiento

Se conoce desde hace tiempo que los receptores con actividad tirosina-quinasa (TKR) juegan un papel crucial en el control del crecimiento, diferenciación y metabolismo celulares. El mecanismo de activación comienza por la dimerización de los receptores inducida por la unión con el ligando; esta dimerización es responsable de la activación de tirosina-quinasa mediante autofosforilación, lo que desencadena una compleja cadena de fosforilaciones. Sin embargo, quedan aún numerosas preguntas sin contestar; por ejemplo, cómo median los TKR las respuestas celulares, cómo se produce la activación, de qué forma se controla la especificidad y cómo se produce la inhibición.

Se han identificado numerosos receptores celulares con actividad tirosina-quinasa; el esquema general es que en la zona extracelular existen dominios muy diversos, que permiten la unión a distintos ligandos; en cambio, la parte citoplásmica de todas estas moléculas es mucho más homogénea y en ella se encuentra el dominio con actividad catalítica tirosina-quinasa. Se sabe que la alteración en estos mecanismos produce desajustes fisiológicos importantes. Un exceso de señal puede provocar cáncer, mientras que una falta de señal puede provocar, por ejemplo, enfermedades en las que se dan malformaciones del esqueleto, tales como los síndromes de Pfeiffer, Crouzon y Jackan Werg, así como la acondroplasia (una de las enfermedades hereditarias más comunes).

Una cuestión sumamente impor-



tante es conocer cuáles son los factores que determinan la selectividad del proceso. Podemos pensar que ésta se produzca a dos niveles: en el proceso de unión del receptor al ligando y consecuente fosforilación, y mediante proteínas modulares, tales como

SH2, SH3, PH y PHB. Se conoce la estructura tridimensional de dichas proteínas y se ha visto que tienen plegamientos similares. Un ejemplo interesante es el del receptor de EGF (Factor de Crecimiento de las Células Epidérmicas). Se sabe que EGF provoca la activación de la proteína *Ras*; sin embargo, el factor relacionado FGF también activa *Ras*, pero no se une al receptor, por lo que esta activación tiene que producirse por otra vía. La proteína responsable de este último proceso ha sido aislada y denominada FRS2. También se ha clonado y secuenciado el gen correspondiente.

En resumen, la proteína FRS2 pertenece al grupo de proteínas de «descarga», es necesaria para la mitosis, su sobre-expresión produce activación de quinasa MAP, así como proliferación celular, y es capaz de unirse a la proteína *Shp2*.

Desde un punto de vista estructural, FRS2 posee un sitio de miristilación, que permite su anclaje a la membrana plasmática, tiene un dominio PTB que posibilita su unión al receptor, y posee una zona de «descarga» con varias tirosinas en la región C terminal, la que a su vez es capaz de reconocer otras moléculas.

Uno de los aspectos clave de este proceso es el mecanismo de activa-

ción propiamente dicho por actividad tirosina-quinasa. En el caso del receptor de insulina, se ha estudiado con detalle la estructura tridimensional del dominio catalítico. Dentro de dicho dominio existe un punto de unión a ATP, un bucle catalítico y un bucle activador que tiene un residuo de tirosina en su extremo.

La fosforilación en este residuo activa el receptor, ya que provoca un cambio de conformación que aumenta la accesibilidad del sitio catalítico. En cambio, en el receptor de FGF el proceso de activación/inactivación es distinto. En este caso, el ATP puede entrar incluso si el re-

ceptor está inactivo. En este caso, el bucle de activación tiene una gran movilidad; la dimerización y posterior fosforilación permiten que se produzca y se mantenga el estado activado.

El estudio de la interacción entre los receptores y moléculas inhibidoras es de gran importancia tanto teórica como práctica. Por un lado, nos permite entender cómo funciona este proceso y por otro lado, la posibilidad de controlar la actividad de muchos de estos receptores podría aplicarse al tratamiento de ciertas enfermedades, en las que precisamente se da un exceso de señal.

Flora de Pablo

Estructura de factores y receptores activos

Durante las pasadas dos décadas, Joseph Schlessinger ha contribuido con numerosos trabajos (más de 300 desde 1980) que han sido pioneros para comprender múltiples aspectos de la señalización celular mediada por receptores tirosina-quinasa.



Desde sus seminales trabajos sobre el receptor de «Epidermal Growth Factor» (EGF) y su dimerización tras unión del ligando, primer paso para la activación y autofosforilación en «trans» de las subunidades catalíticas, hasta sus más recientes contribuciones identificando muchas de las interacciones proteína-proteína que forman parte del puzzle de cascadas intracelulares de señalización de los receptores de insulina, PDGF, etc., y ordenándolas jerárquicamente, sus trabajos han contribuido de forma esencial a clarificar los mecanismos mole-

culares de funcionamiento de los receptores tirosina-quinasa.

A pesar de que el énfasis histórico se ha puesto en los receptores quinasa, Schlessinger también fue pionero a principios de los noventa en reconocer tirosina-fosfatasa que eran receptores de membrana y utilizaban la desfosforilación como mecanismo regulador. Recientemente, asimismo, ha llamado la atención sobre las interacciones de estos receptores con componentes de la matriz extracelular y ha cooperado significativamente en resolver la estructura de factores y receptores activos.

Sus aportaciones originales y sus discusiones conceptuales siempre incisivas y clarificadoras están constantemente en el «cutting edge» de la biología celular y molecular de la señalización celular.

James E. Darnell

Señalización de genes desde la superficie celular

Una de las cuestiones básicas de la Genética Molecular es la activación de la transcripción de determinados genes, mediada por polipéptidos. En general, puede que existan dos sistemas principales. El primero tiene lugar mediante factores «constitutivos», como es el caso de los receptores con actividad tirosina-quinasa que activan la proteína *Ras*. Este proceso es sensible a la fosforilación de serinas y se sabe poco sobre los genes diana que resultan activados.

El segundo sistema se produce mediante traslocación al núcleo inducida por ligando; esto ocurre, por ejemplo, en la activación del receptor de TGF β seguida por la traslocación al núcleo de la proteína SMAD. En 1982, el estudio de la estimulación de la transcripción mediada por interferones llevó al descubrimiento de la ruta de transducción JAK-STAT. Cuando una célula entra en contacto con un interferón se produce la activación de la transcripción de una serie específica de genes.

Esta activación se debe a que ciertas proteínas se unen a cortas secuencias de ADN denominadas IRSE (elemento de respuesta estimulado por interferón) y que están situadas en las regiones reguladoras de los genes activados. Las proteínas así purificadas se denominaron STATS (estimuladoras de transcripción y transductoras de señal) y representan una nueva familia de proteínas reguladoras. Se han identificado siete miembros de la familia STAT, conteniendo entre 750 y 850 aminoácidos. Dentro de la cadena polipeptídica se ha iden-



tificado un dominio central capaz de unirse al ADN, dominios SH2 y SH3 que intervienen en las interacciones proteína-proteína, y un dominio C-terminal implicado en la activación transcripcional, y que posee un residuo de tirosina. Las STATs actúan como

homo o heterodímeros y son activadas mediante fosforilación por proteínas con actividad tirosina-quinasa de la familia JAK y Tyk2. A su vez, estas quinasas tienen localización citosólica, pero se encuentran asociadas a los receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de receptores de citoquinas.

En resumen, la secuencia de acontecimientos es la siguiente: tras la unión del receptor con el interferón se produce la dimerización del mismo, seguida de fosforilación por las proteínas JAK; el complejo receptor JAK activa a una proteína STAT, mediante nueva fosforilación, la cual se dimeriza y se trasloca al núcleo donde se une a los elementos IRSE, activando la transcripción de un subconjunto específico de genes. El efecto final es que el interferón hace más lento el crecimiento celular, lo que hace a las células más resistentes a virus, cuya replicación depende de dicho crecimiento.

El uso de ratones transgénicos en los que se ha desactivado un gen (técnica denominada *knock-out*), permite estudiar la función de las proteínas STAT. En general, los efectos de desactivar cada uno de estos genes son bastante específicos, afectando sólo a ciertos tejidos y dejando intactas la mayoría de las funciones del organis-

mo. Por ejemplo, la mutación de STAT1 compromete la respuesta inmediata a virus o bacterias y la mutación de STAT5b altera la respuesta a hormonas en machos. Es interesante conocer las moléculas o los mecanismos capaces de inhibir el proceso de activación mediado por STATs. Hasta la fecha se han identificado tres vías distintas de inhibición. La primera es la denominada SOCS-SS-JABS: se trata de proteínas activadas por las propias STAT y que son capaces de unirse a las quinasas JAK, lo que bloquea una posterior activación de STAT. El segundo tipo de mecanismo de inhibición viene dado por las denominadas PIAS (proteínas inhibidoras de STATs activadas); éstas tienen un efecto directo, al ser capaces de unirse a las STAT e impedir su unión

al ADN. Por último, se ha descrito una tercera vía de inhibición a través de fosfatasa.

El estudio de esta vía de transducción de señal también puede ayudarnos a entender el proceso evolutivo. Si contemplamos las tres ramas principales en que se dividen los seres eucariotas, animales, plantas y hongos, resulta significativo el hecho de que las plantas no posean receptores con actividad tirosina-quinasa; en cambio en una especie de moho (*Dictyostellium*) se ha encontrado una proteína con homología de secuencia a las STAT. Esto permite pensar que tal vez esta familia de proteínas constituye el primer caso en la evolución de moléculas con actividad tirosina-quinasa implicadas en regulación de procesos celulares.

Rafael Fernández Muñoz

Transducción de señales por interferones

James E. Darnell se doctoró en 1955 en la Universidad de Washington en San Luis, de la que hoy es doctor *honoris causa*. Entre 1956 y 1960, trabajó en el Instituto Nacional de la Salud en Maryland, donde realizó estudios sobre la metilación de proteínas y ácidos nucleicos en el virus de la poliomielitis.

A partir de 1961 ingresa en el Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT); allí define e identifica por primera vez el fenómeno de procesamiento de ARN, lo que abre una vía para entender la regulación de la expresión génica.

En 1964 ingresa en la Escuela de Medicina Albert Einstein de Nueva York, donde identifica el denominado



ARN nuclear heterogéneo, precursor del ARN mensajero. Entre 1968 y 1974 trabaja en la Universidad de Columbia (Nueva York), donde es nombrado director del Departamento. Durante esta etapa inicia el estudio del fenómeno de poliadenilación del ARN mensajero.

Tras su paso por estas instituciones, desde 1974 el doctor Darnell ha establecido su laboratorio en la Universidad Rockefeller de Nueva York, abordando, junto a sus colaboradores, numerosos estudios sobre temas relevantes en la Biología Celular, como el estudio de la metilación en 5' del ARN mensajero (*cap*), las secuencias estimuladoras de la transcripción (*enhancers*) y la transducción de señales por interferones. □