

### **3. Mecanismos de señalización celular: implicaciones fisiopatológicas**

FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

El estudio de los sistemas de transducción de señal y de los mecanismos de comunicación intercelular ha experimentado un extraordinario desarrollo en los últimos años. Estos nuevos resultados están conduciendo a la incorporación de nuevos conceptos críticos para poder entender cómo las células reciben y coordinan señales del entorno y de otras células del mismo organismo, controlando así los procesos de proliferación, diferenciación, morfología, migración o muerte celular.

Los sistemas de comunicación y señalización celular son determinantes fundamentales de la coordinación y las funciones de los distintos tipos celulares a través del control de la expresión génica y de la función de las proteínas. Estos sistemas serán los que controlen dónde, cuándo, cuánto y por cuánto tiempo se expresan los RNA. En el caso de las proteínas, los mecanismos de señalización celular controlan, además, los cambios de localización, el tráfico de proteínas dentro de una célula, cómo se degradan, y las interacciones funcionales que establecen. De forma coherente con este decisivo papel en la función de los organismos, se estima que más del 20% de los genes del genoma humano codifican proteínas implicadas en transducción de señales. Por otra parte, la alteración de estos sistemas está en la base de múltiples patologías, como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o neuro-degenerativas. Dada la enorme amplitud de este tema, en este capítulo sólo intentaré resumir las principales estrategias y principios en los que se basan los complejos circuitos de señalización celular, y algunos ejemplos de sus repercusiones fisiopatológicas.

## REDES DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Los sistemas de señalización son extraordinariamente complejos, asemejándose a complicadas redes o circuitos con múltiples elementos de intersección y control.

Las vías de comunicación celular son sistemas en cascada, con una serie de etapas secuenciales, en las que cabe distinguir un proceso de detección de un mensajero por un receptor, seguida de un proceso de transducción o de transformación de esa señal extracelular en una intracelular. La diseminación de esas señales intracelulares (también denominadas segundos mensajeros) y su interacción con proteínas efectoras permite regular los procesos celulares básicos y las funciones fisiológicas integradas (1). Por tanto, estos sistemas son un poderoso instrumento para modular las funciones del organismo.

Es importante recordar que estos sistemas, para ser eficaces, tienen que funcionar de forma transitoria y controlada. Por tanto, además de los procesos de detección, transformación y amplificación de la señal, tienen que existir sistemas de terminación, adaptación e integración que aseguren en todo momento su activación y desactivación controlada, así como su interconexión con el conjunto de señales que en cada momento recibe cada célula. Cuando estos mecanismos de control sufren alguna alteración o funcionan mal, se producen situaciones patológicas (2). Por ello, estos sistemas pueden utilizarse también como diana de fármacos que modifiquen las funciones celulares o su comportamiento erróneo.

Desde el punto de vista estructural, los mensajeros pueden ser pequeñas sustancias químicas (adrenalina, glutamato), péptidos o proteínas muy complejas. Los receptores, que muy frecuentemente son proteínas situadas en la membrana de las células, actúan como detectores y «decodificadores» de la señal que porta el mensajero, transformándola en una señal intracelular o segundo mensajero. Los segundos mensajeros, ya desde dentro de la célula, modifican la actividad, localización o interacciones entre proteínas celulares (controlando así el metabolismo o la función del citoesqueleto, por ejemplo) y también regulan la expresión génica, promoviendo una respuesta celular específica e integrada (1).

A principios de los años 1960 existía todavía un conocimiento muy escaso de las características moleculares de los receptores y de los

mecanismos de transmisión de la señal. En esta década se produjeron dos avances conceptuales críticos: la teoría de la regulación alostérica de las proteínas propuesta por Monod, Changeux y Jacob en 1963, y la teoría del segundo mensajero sugerida por Earl Sutherland en 1962. Sutherland había trabajado con el Nobel Carl Cori, estudiando los mecanismos por los que la adrenalina regula la degradación de glucógeno a glucosa en el hígado, activando una enzima denominada glucógeno fosforilasa. Más adelante descubrió que, para promover este efecto, la adrenalina no entra en la célula, sino que estimula la síntesis en el otro lado de la membrana de otra molécula distinta, el AMP cíclico (formado por la enzima adenilil ciclasa) que actúa como «segundo mensajero», que es la que transmite la señal a las proteínas intracelulares (3).

Como comentó posteriormente Martin Rodbell en su discurso Nobel en 1994 (4), las teorías de Monod y de Sutherland influyeron mucho en las investigaciones posteriores para desentrañar los mecanismos detallados de señalización: «Era extraordinariamente atractiva la noción de que la adenilil ciclasa (la enzima de membrana responsable de la formación de AMPc a partir de ATP) era una enzima alostérica con dos sitios diferentes, uno receptor y otro catalítico... La localización asimétrica en la membrana celular de estos sitios —el sitio alostérico que reconoce a la hormona mirando al exterior de la célula y el sitio catalítico que transforma ATP en AMPc hacia el interior— proveía un marco conceptual para investigar las bases moleculares de la acción hormonal».

## TIPOS DE RECEPTORES

Estas ideas básicas han sido el motor que ha conducido, en los últimos cuarenta años, a la identificación molecular de receptores y de sus mecanismos de acción, a la búsqueda de nuevos segundos mensajeros y a profundizar en las vías por las que éstos pueden alterar las distintas funciones celulares. Así, hoy sabemos que hay receptores-canales, que dejan pasar o no iones (como calcio, sodio o cloruro) a través de la membrana plasmática (a favor de su gradiente electroquímico) dependiendo de la presencia de un mensajero en el exterior de la célula, y que existe otra gran familia de receptores-enzimas, proteínas en las que la presencia de un mensajero específico en el exterior celular modifica la actividad catalítica (tirosina quinasa, tirosina fosfatasa, serina-

treonina quinasa, guanilato ciclasa, etc.) de otra zona de la proteína en la cara citoplasmática o interior de la célula, alterando las funciones de la misma (1, 5).

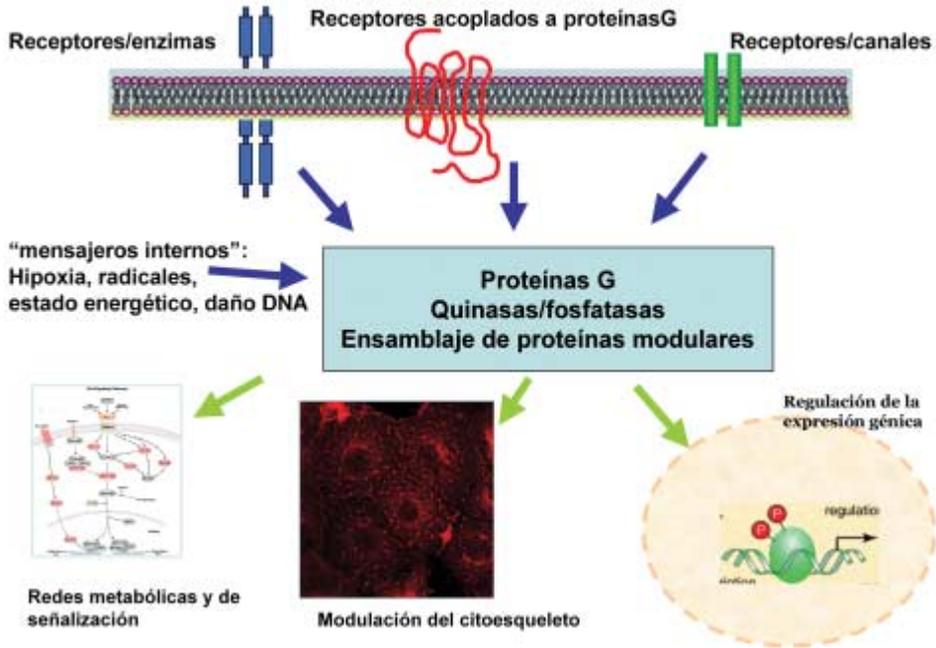


FIGURA 1. Principales estrategias de transmisión de señales a través de la membrana plasmática y de propagación intracelular.

En otros casos, el procedimiento es algo más complejo. A los conceptos de discriminador (receptor) y de amplificador (la actividad que genera el segundo mensajero), se añadía el de transductor. En ese nuevo esquema, el transductor es una entidad molecular independiente que permite acoplar una actividad receptora con otra actividad amplificadora o efectora, que ya no tienen por qué residir o co-existir en la misma proteína. En estos sistemas participan tres proteínas distintas: el receptor, la proteína acopladora o transductora, y la proteína efectora/amplificadora. Martín Rodbell y Alfred Gilman identificaron en la década de los setenta y los ochenta a esas proteínas transductoras, denominadas proteínas G por su capacidad de unir nucleótidos de guanina. Como detallaré más adelante, esas proteínas pueden actuar como interruptores moleculares, activándose transitoriamente, y pueden controlar una gran

cantidad de efectores (adenilil ciclasa, fosfolipasas, canales iónicos), participando en una gran diversidad de procesos fisiológicos (3, 4, 6).

Al tipo de receptores que utilizan esas proteínas G para controlar las funciones celulares se les denomina «receptores acoplados a proteínas G», o GPCR por sus siglas en inglés (G protein-coupled receptors). Como prueba del éxito evolutivo de este mecanismo de señalización celular, los GPCR constituyen, con más de 1.000 genes que codifican receptores de ese tipo en el genoma humano, la superfamilia de receptores de membrana más extensa, más ubicua y más versátil (6, 7).

Es conveniente señalar que estos procesos no agotan los mecanismos de respuesta al entorno que se conocen. Así, existen receptores intracelulares, presentes en el citoplasma o en el núcleo de las células, que responden a mensajeros lipofílicos, como las hormonas esteroideas o las hormonas tiroideas, que sí atraviesan la membrana plasmática. Por otra parte, además de mediante mensajeros extracelulares solubles secretados al medio, las células pueden también recibir señales de la matriz extracelular o, en el caso de las células adyacentes, comunicarse mediante contactos célula-célula, o mediante «gap-junctions», que pueden permitir el intercambio de pequeñas sustancias entre células vecinas y coordinar así su funcionamiento y su respuesta a estímulos. Finalmente, últimamente están también cobrando mucha importancia los «mensajeros desde dentro», las señales que surgen en el interior de las células, en muchos casos como detectores o como consecuencia de situaciones de «peligro». El DNA dañado (8), la hipoxia, (9) los radicales libres de oxígeno (10), el estado energético de la célula (a través de los niveles de AMP) y distintos intermediarios metabólicos (11), se está descubriendo que desencadenan importantes respuestas celulares, interactuando en muchos casos con sistemas de señalización «convencionales» que operan desde el exterior celular. Comprender cómo se integran estos mensajeros provenientes del interior y del exterior es un reto y una complejidad añadida al estudio de los procesos de comunicación celular.

Es también esencial recordar el papel fundamental del sistema nervioso y del sistema endocrino en la coordinación de la respuesta del organismo. En los organismos complejos, es necesario coordinar las respuestas de cada célula para que trabajen en armonía con las células vecinas del mismo órgano o tejido, y éstos entre sí para permitir una respuesta fisiológica apropiada. En esta coordinación desempeñan un

papel fundamental el sistema nervioso y el sistema endocrino, como se detallará en otros capítulos de esta monografía.

## **SISTEMAS DE TRANSMISIÓN DE SEÑALES EN EL INTERIOR DE LA CÉLULA**

Además de los receptores capaces de detectar las señales extracelulares, ¿cuáles son las principales estrategias en las que se basa su propagación en el interior celular? ¿cómo se puede ir transfiriendo esa señal de forma ordenada? En la enorme complejidad y diversidad de estas vías de transducción emergen algunas propiedades o estrategias esenciales (2, 12-16):

- La utilización de las proteínas G monoméricas y heterotriméricas como interruptores moleculares que permiten la activación transitoria de otras proteínas.
- El papel central de los sucesos de fosforilación/desfosforilación en el control de la actividad, localización celular, interacciones y degradación de las proteínas implicadas.
- La existencia de múltiples «módulos» o dominios funcionales (SH<sub>2</sub>, SH<sub>3</sub>, PTB, PDZ, PH, «Pro-boxes», etc.) en proteínas transductoras, lo que permite su ensamblaje y desensamblaje transitorio (controlado por mensajeros extracelulares) en complejos multimoleculares encargados de transmitir la señal, favoreciendo interacciones secuenciales entre proteínas, el reclutamiento y activación de enzimas y/o su proximidad a sustratos específicos.
- La existencia de mecanismos de terminación y adaptación de la señal de tanta complejidad como los propios procesos de activación, así como de fluctuaciones espacio-temporales en la señalización.
- La inclusión de las cascadas «lineales» clásicas de transducción en redes («networks») de señalización complejas, gracias a la presencia de múltiples elementos de intersección y transmodulación.

En efecto, nuestro conocimiento en las vías de señalización celular está desvelando la existencia de múltiples interacciones reguladas a

diversos niveles. Los complejos bucles de retroalimentación positiva y negativa, la existencia de detectores de coincidencia de señal, de mecanismos de amplificación o de vías paralelas o redundantes, son elementos comunes con el diseño de circuitos por los ingenieros. Entender las propiedades, no siempre intuitivas, de estos circuitos de señalización, para poder predecir su comportamiento en diversas circunstancias fisiológicas y patológicas es hoy uno de los grandes retos de este campo.

## PAPEL FUNDAMENTAL DE LAS PROTEÍNAS G COMO INTERRUPTORES MOLECULARES

Como hemos comentado, los sistemas de señalización intracelular utilizan de forma generalizada las denominadas proteínas G (monoméricas o heterotriméricas) como interruptores moleculares que se activan transitoriamente. Estas proteínas pueden encontrarse en dos conformaciones espaciales diferentes: una forma inactiva, cuando unen al nucleótido GDP, y otra forma activada capaz de unirse con otras proteínas celulares denominadas efectoras, cuando une GTP (Figura 2). Pero esta activación es intrínsecamente transitoria, ya que estas proteínas son GTPasas, es decir, destruyen al cabo de un breve tiempo el GTP, transformándolo de nuevo en GDP, y vuelven así a su estado basal (6, 17).

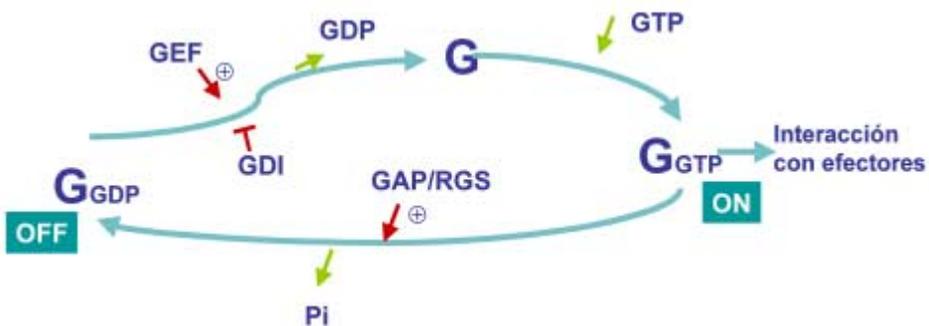


FIGURA 2. Ciclo de las proteínas G monoméricas o heterotriméricas. Estas proteínas se comportan como un interruptor molecular en cascadas de señalización, al oscilar entre dos estados conformacionales, uno inactivo y otro activo. La interacción con estimuladores de la disociación de GDP (GEF, del inglés Guanine nucleotide Exchange Factor), como los GPCR, promueve la entrada de GTP y la transmisión de la señal, necesariamente transitoria al actuar la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G. Este proceso de terminación de señal puede verse reforzado por su asociación a moléculas GAP/RGS. Los GDI (Guanine nucleotide dissociation inhibitors) estabilizan la conformación basal, como el dímero Gbeta-gama en el caso de las proteínas G heterotriméricas.

El encendido (intercambio de GDP por GTP) y el apagado (hidrólisis de GTP) de este interruptor molecular se puede modular por su interacción con otras proteínas. Como se ha mencionado antes, unos 1.000 genes de nuestro genoma codifican por una familia de receptores con siete dominios transmembrana, los receptores acoplados a proteína G (GPCR), que median las acciones de múltiples mensajeros, hormonas y neurotransmisores, como la adrenalina, la dopamina, la hormona estimulante del tiroides o los opiáceos (6). Cuando estos receptores reconocen a su mensajero, cambian su conformación y pueden entonces interactuar con la proteína G unida a GDP, lo que a su vez promueve el intercambio de GTP por GDP. La proteína G en su estado activo interactúa con efectores (como la adenilato ciclasa, fosfolipasa  $\beta$ , canales iónicos, etc.) modificando parámetros intracelulares que diseminan la señal extracelular (6). Este proceso es **transitorio**, porque la proteína G hidroliza GTP a GDP y vuelve a su conformación basal. Muchos otros procesos celulares utilizan otro tipo de proteínas G, monoméricas, como las familias de proteínas, Ras, Rap, Rac, Rho, Rab, ARF, etc., para controlar múltiples aspectos de proliferación, diferenciación, morfología del citosqueleto o tráfico vesicular (17-21).

## QUINASAS Y FOSFATASAS

Otra estrategia fundamental en los procesos de comunicación celular es la utilización de procesos de fosforilación y des-fosforilación de proteínas, que pueden modificar de **forma reversible** la actividad de muchas proteínas celulares. La introducción de un grupo fosfato en un residuo de Serina, Treonina o Tirosina por una quinasa, o su desaparición por acción de una fosfatasa, puede modificar la conformación, la actividad, o localización de una proteína (Figura 3). La utilización conjunta de quinasas y fosfatasas permite también disponer de otro tipo de interruptores moleculares, que encienden o apagan funciones celulares. Se estima que casi un tercio de las proteínas pueden ser reguladas por esta estrategia, y en el genoma humano se han identificado más de 500 proteínas quinasas y del orden de 130 fosfatasas (2). Muchos de los genes identificados como oncogenes (es decir, aquellos genes que mutados dan lugar a cáncer) pertenecen a estos grupos de proteínas, lo que da idea de su extraordinaria importancia fisiológica y patológica (22, 23).

## FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Otro aspecto fundamental de los sistemas de señalización celular es su capacidad de control de la expresión génica, mediante la modificación de la actividad de los denominados «factores de transcripción». Se calcula que la regulación transcripcional se basa en al menos 2.000 de estos factores proteicos codificados en el genoma de mamíferos, que en general comparten las características de poseer un sitio de unión a secuencias reguladoras específicas en el DNA, y un dominio que le confiere potencial modulador, por su capacidad de interactuar con otros elementos de la maquinaria transcripcional, afectando positiva o negativamente a su función. Pues bien, la expresión, localización o la actividad de estos factores de transcripción está estrictamente controlada por los sistemas de transducción, también mediante mecanismos que incluyen la fosforilación/defosforilación, la proteólisis, la interacción con otras proteínas o las fluctuaciones de metabolitos que actúan como segundos mensajeros (24).



FIGURA 3. La activación mediante diversos mecanismos de quinasas implicadas en señalización celular (como PKA, PKC, o c-Src, entre otras) permite liberar interacciones inhibitorias y promueve la fosforilación secuencial de distintas proteínas celulares (enzimas, canales, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, etc.), dando lugar a una respuesta fisiológica integrada.

## EL DISEÑO MODULAR PERMITE ENSAMBLAR COMPLEJOS DE PROTEÍNAS SEÑALIZADORAS

Por último, otra estrategia común en los procesos de comunicación intracelular, que también se utiliza conjuntamente con las anteriores, es la existencia de múltiples «módulos» o dominios funcionales en las proteínas transductoras de señal, que van a permitir su ensamblaje y desensamblaje transitorio en complejos multimoleculares implicados en señalización. Muchas proteínas de señalización están construidas a base de «módulos» parecidos, que tienen determinada capacidad de unirse unos con otros, o de reconocer determinadas señales en las células, como por ejemplo la existencia de residuos de tirosina fosforilados (módulos SH<sub>2</sub>), de secuencias ricas en prolina (módulos SH<sub>3</sub>) o de mayor concentración de derivados lipídicos del fosfatidilinositol (módulos PH) (12, 25-27). Tony Pawson, uno de los pioneros en la caracterización funcional de estos módulos, ha sugerido que esta estrategia permite generar una gran diversidad de proteínas señalizadoras a partir de distintas combinaciones de un número limitado de dominios funcionales con características comunes (Figura 4).

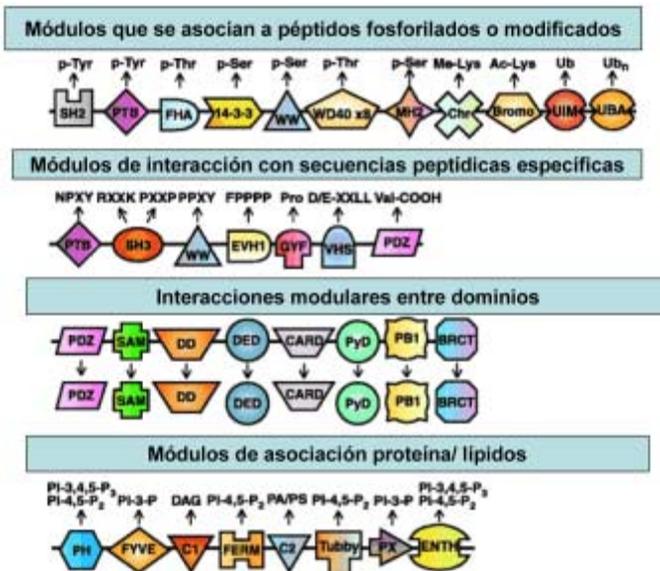


FIGURA 4. Principales interacciones modulares que participan en el ensamblaje de complejos de señalización (modificado de referencias citadas en texto).

En definitiva, pueden construirse sistemas de señalización muy complejos y altamente regulados, combinando las distintas estrategias de los interruptores moleculares de las proteínas G, las quinasas/fosfatasa, y los procesos de ensamblaje/desensamblaje controlado de complejos multimoleculares basados en la estructura modular de muchas de las proteínas implicadas.

Por ejemplo, muchos de los denominados factores de crecimiento, mensajeros que regulan la proliferación y diferenciación de múltiples tipos celulares, son reconocidos por proteínas receptoras que, como consecuencia de este acto de complementareidad molecular, dimerizan y estimulan una actividad quinasa residente en la propia proteína receptora, que se auto-fosforila en residuos de tirosina (5). Estos aminoácidos así modificados actúan como «reclamo» de otras proteínas que poseen unos módulos funcionales denominados SH<sub>2</sub>, que reconocen específicamente tirosinas fosforiladas (en determinados contextos de secuencia) (27). De esta forma, se promueve un reclutamiento o ensamblaje específico de proteínas intracelulares. En muchas ocasiones, estas proteínas modulares reclutadas contienen como otra de sus piezas un factor de intercambio GTP/GDP de las proteínas G monoméricas Ras. De esta forma, la llegada del mensajero extracelular permite, en un momento y en un lugar específico, el encendido de este «interruptor molecular» en el interior de la célula. La proteína G Ras activa a su vez a otra quinasa (Raf), que entonces estimula a otra quinasa (MEK), y ésta a otra quinasa (MAPK) que finalmente se traslada al núcleo a modificar la expresión génica mediante la fosforilación de factores de transcripción que se unen a secuencias presentes en el DNA de diversos genes (28-30). Estos sistemas en **cascada** son muy típicos y presentan un extraordinario poder de amplificación.

En resumen, la utilización combinada de quinasas, proteína G y módulos de ensamblaje permite articular una amplia dinámica de cambios secuenciales, de modificación de la localización y actividad de proteínas celulares, característicos de los sistemas de señalización celular.

## **MECANISMOS DE REGULACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN: EL EJEMPLO DE LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G**

Otra característica general de los sistemas de señalización celular es su capacidad de modular las características de la respuesta a un determinado estímulo en función de las circunstancias concurrentes, de lo que podríamos llamar su «memoria de activación». Así, la respuesta de una célula a un mismo estímulo podrá ser mayor o menor si previa o simultáneamente ha recibido otro estímulo de un mensajero diferente, en lo que se denominan procesos de transmodulación. Por otra parte, se conoce como desensibilización al fenómeno biológico por el que la respuesta celular disminuye con el tiempo en presencia de un estímulo de intensidad constante. Dicho de otra forma, el sistema de alguna forma recuerda si ha sido estimulado previamente por el mismo mensajero. Esta pérdida de respuesta ante la presencia crónica de un estímulo tiene una notable importancia fisiológica y farmacológica. Estos procesos de transmodulación, desensibilización y control son un importante área de estudio actual dentro del campo de la señalización celular.

Se han investigado en profundidad en los últimos años los mecanismos de regulación de la señalización a través de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). La estimulación de GPCR conduce, a través de su interacción con proteínas G heterotriméricas y otras proteínas celulares, a la modulación de múltiples vías de señalización intracelular. Éstas incluyen las rutas «clásicas» de segundos mensajeros controlados por adenilil ciclasas, fosfolipasas y canales iónicos y, según se está demostrando más recientemente, las distintas cascadas de quinasas activadas por mitógenos y por estrés (ERK/MAPK, JNK, p38, ERK5) o la vía PI3K/Akt (6, 28, 30). Estas rutas, a través de sus efectos sobre distintos procesos celulares y sobre la transcripción génica, tienen gran importancia en el control de la proliferación, diferenciación, supervivencia o quimiotaxis.

Además de promover la activación de proteínas G, la estimulación de GPCR conduce a su interacción con unas quinasas específicas, denominadas GRKs (del inglés G protein-coupled receptor kinases), que los fosforilan en residuos intracelulares. Eso permite a su vez que se unan al receptor fosforilado las proteínas llamadas arrestinas, que

evitan que el receptor se comunique con las proteínas G aunque esté presente el estímulo, esto es, promueven la desensibilización del sistema (31, 32).

La fosforilación específica del receptor (sólo en su estado activado) por la quinasas GRKs y la posterior unión de las arrestinas se ha mostrado como un mecanismo universal de regulación de la práctica totalidad de la GPCR, e incluso podría ser extensible a otras familias de receptores. Estos mecanismos de regulación utilizan las mismas estrategias (fosforilación y ensamblaje secuencial y controlado de proteínas) que las propias de la diseminación de la señal.

El trabajo de diversos grupos de investigación durante estos últimos años ha desvelado otras y muy importantes funciones adicionales para las GRKs y las arrestinas. Tras la fosforilación por GRK y la unión de arrestinas, se inicia un proceso de internalización transitoria de receptores que permite su desfosforilación y reciclaje a la membrana plasmática en forma funcional, proceso en el que GRKs y arrestinas están también implicadas, propiciando el acoplamiento de los receptores con la maquinaria endocítica mediante la unión de  $\beta$ -arrestinas a clatrina y a la proteína adaptadora AP-2, quizá también con la participación de la interacción de GRKs con otras proteínas celulares (33). La presencia de los GPCR en endosomas en un entorno de pH ácido propicia la acción de fosfatasas que los desfosforilan y resensibilizan o bien los conduce a degradación en lisosomas.

Se conocen hasta el momento en mamíferos siete genes para GRKs. Todas las GRKs comparten un dominio central catalítico, similar a otras serina/treonina quinasas. El dominio C-terminal es de tamaño variable, y parece facilitar su interacción con fosfolípidos y/o proteínas de membrana. El extremo N-terminal contiene señales de interacción aún no caracterizadas con GPCR, además de una región de homología a la familia de proteínas RGS (Regulators of G protein signaling). Las GRK1 y 7 se expresan fundamentalmente en la retina, GRK4 en testículos, y el resto son de expresión ubicua en el adulto, aunque con diferencias en sus niveles tisulares. De todas ellas, la isoforma GRK2 es la mejor caracterizada y la que ha despertado mayor interés, por su importante papel en la regulación de diversos tipos de GPCR y sus alteraciones en diversas circunstancias patológicas (31, 32).

En lo que respecta a las arrestinas, se han descrito las arrestinas visuales, expresadas en retina, y las denominadas  $\beta$ -arrestina-1 y  $\beta$ -arrestina-2, de expresión ubicua, y cuyas diferencias funcionales se están ahora comenzando a explorar activamente (31, 33). Puesto que un número limitado de (7) GRKs y de arrestinas (3) participan en la regulación de muchos GPCR, se piensa que su función es muy importante y que deben estar finamente reguladas.

Más aún, si se tiene en cuenta que, además de participar en la desensibilización, tráfico intracelular y re-sensibilización de GPCR, datos obtenidos en los últimos años indican que las GRKs y arrestinas son componentes fundamentales de las propias cascadas de señalización iniciadas por estos receptores, por su capacidad de interactuar directamente con otras proteínas celulares, que pueden ser así atraídas al entorno del receptor.

En efecto, datos recientes indican que  $\beta$ -arrestina puede reclutar otras proteínas celulares al complejo de señalización de GPCR, como la tirosina quinasa c-Src, la quinasa JNK3, y componentes de la cascada Raf/MEK/Erk, lo que sugiere un papel esencial para GRKs y  $\beta$ -arrestina en la modulación de cascadas mitogénicas y de estrés por GPCRs. Se ha especulado que el papel de proteína «andamio» de  $\beta$ -arrestina permitirá la activación selectiva de MAPK en determinadas localizaciones subcelulares citoplasmáticas. Por otra parte, datos recientes indican que las funciones adaptadoras de las arrestinas podrían ampliarse. Se ha publicado que  $\beta$ -arrestina 1 interactúa con la proteína transductora Dishevelled, con una fosfodiesterasa de AMPc (PDE4), con el regulador del citoesqueleto Ral-GDS, o con los componentes de la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B y del receptor de la insulina. También con la E3 ubiquitina ligasa Mdm2, lo que promueve la ubiquitinación de  $\beta$ -arrestina y de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, lo que a su vez es crítico para la internalización y la degradación de esos receptores, respectivamente [revisado en (33)].

En la misma línea, resultados recientes de distintos laboratorios (incluido el nuestro) indican que GRKs, y particularmente GRK2, es capaz de interactuar y de fosforilar otras proteínas diferentes de los GPCR, lo que amplía también, como en el caso de las arrestinas, el espectro de sus funciones celulares y plantea la necesidad de un mejor conocimiento de su red de interacciones e interconexiones funcionales (31, 32).

La proteína GRK2 se caracteriza, además de por su función quinasa, por ser una proteína con diversos dominios de unión proteína-proteína que permiten su interacción directa con moléculas relevantes en señalización, como PI3K, el inhibidor de Raf1 o RKIP, la subunidad  $G\alpha_q$  de las proteínas G, subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas G heterotriméricas o el factor regulador de adhesiones focales GIT/Cool, entre otras. El significado funcional de estas interacciones se conoce sólo parcialmente, pero posibilita que GRK2, de modo independiente de fosforilación, modifique la actividad, localización, estabilidad o capacidad de interacción de estos factores, u otros por determinar, con sus moléculas efectoras, como el bloqueo de la interacción de PLC $\beta$  con  $G\alpha_q$  en presencia de GRK2. Por otro lado, GRK2 tiene capacidad para fosforilar diversos sustratos diferentes de receptores de membrana, como fosducinas, sinucleinas, tubulina o el factor ribosomal P2, pudiendo modular procesos como la síntesis de proteínas o la arquitectura del citoesqueleto (31-33).

El relevante papel de GRKs y arrestinas tanto en la modulación como en las propias vías de señalización mediadas por GPCR, sugiere que cambios en la expresión y/o actividad de estas proteínas podrían afectar a la eficacia y características de las vías de transducción mediadas por GPCR y tener trascendencia fisiopatológica. De acuerdo con esa idea, se han descrito cambios en los niveles y/o en la actividad de estas GRKs, en particular GRK2, en distintas situaciones patológicas, como el fallo cardiaco congestivo, la hipertensión (aumento) o la artritis reumatoide (disminución). Estos cambios pueden contribuir al desarrollo o al desencadenamiento de estas patologías (31, 32, 34).

Se han descrito numerosos mecanismos que mantienen a GRK2 inhibida, desde su estructural tridimensional en estado de conformación inactiva hasta la interacción con actinina, Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, caveolina o proteínas del retículo, interacciones que cambian su localización subcelular e inhiben su actividad. Asimismo, la fosforilación de GRK2 por otras quinastas modula tanto la actividad catalítica frente a receptores como la localización subcelular, promoviendo su estimulación (fosforilación por c-Src y PKC) o inhibición (fosforilación por ERK1/2). Por último, diferentes mecanismos transcripcionales y de control de la estabilidad son responsables de los niveles de expresión de GRK2 (32, 34).

Nuestro grupo ha contribuido en los últimos años a desvelar estos mecanismos, habiendo establecido que la degradación de GRK2 puede

contribuir a las disfunciones de GRK2 observadas en determinadas patologías y a su desarrollo. Así, hemos descrito el rápido reciclaje de GRK2 por la vía del proteasoma dependiente de ubiquitina y su estimulación por GPCR (35), lo cual permite, en condiciones crónicas de activación de receptores, preservar cierta capacidad de respuesta a subsiguientes estímulos. Este rápido reciclaje de la quinasa depende del reclutamiento de c-Src al receptor mediado por  $\beta$ -arrestina y de la fosforilación de GRK2 por c-Src en residuos que hemos definido y que promueven su ubiquitinación y degradación (36). La fosforilación por ERK1/2 en la serina 670 de GRK2 induce también su degradación por el proteasoma (37).

## INTERCONEXIÓN DE REDES DE SEÑALIZACIÓN

El concepto de que la capacidad de una célula para regular múltiples funciones de forma coordinada se basa en la organización de sus redes de señalización ha sido recientemente desarrollado por Iyengar y colaboradores (14). Las interconexiones entre vías de transducción se producen gracias a la existencia de proteínas señalizadoras capaces de recibir e integrar múltiples señales («puntos de cruce» o «junctions») o de interactuar con múltiples efectores (puntos de dispersión de señal o «nodes»), modulando así simultáneamente diversas funciones celulares (múltiples «outputs»). Las adenilil ciclasas serían un ejemplo de proteína integradora de múltiples señales celulares, que recogen información procedente de la actividad de diversos receptores de membrana plasmática (receptores acoplados a distintas proteínas G heterotriméricas, modulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de receptores de glutamato-NMDA o de la vía receptores tirosina-quinasa/Fosfolipasa  $\text{C}\gamma$ , etc.). Los niveles resultantes de AMPc serían un indicador del balance de señales entre las distintas vías, y a su vez modularían a la PKA, que actuaría como «nodo» por su capacidad de fosforilar y regular múltiples componentes celulares implicados en funciones diversas, como proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, metabolismo, etc. Otro ejemplo clásico de «nodo» serían los receptores con actividad tirosina quinasa, capaces de reclutar diversas combinaciones de proteínas transductoras implicadas en distintos procesos celulares (5). Los múltiples efectos de la activación de la vía MAPK/ERK sobre el crecimiento celular son

también el resultado de las distintas acciones del «nodo» MAPK sobre la expresión génica, la síntesis de proteínas, la síntesis de nucleótidos, o el control del ciclo celular (vía el ensamblaje de complejos ciclina D1-Cdk4) (38). Es importante también destacar que las funciones de «junction» y «node» pueden coexistir en una misma proteína. Así, proteínas G monoméricas como cdc42 pueden ser activadas por diversos tipos de receptores, y a su vez interaccionar con varios efectores que regulan la migración celular (vía PAK), la transcripción génica (vía el factor de respuesta al suero SRF), o la traducción de proteínas (vía la S6-quinasa) (14).

Una posible conclusión desconcertante de los recientes estudios sobre vías de transducción sería que toda una serie de caminos de señalización «fundamentales» (las diversas cascadas secuenciales de quinasas que confluyen en MAPK/ERK1/2, JNK, p38, Erk5, etc.; la actividad PI3K; la vía NFkB; los niveles intracelulares de calcio y AMPc) son modulados por una gran cantidad de tipos de receptores que, sin embargo, son capaces de producir respuestas celulares específicas. Esto plantea el problema de entender cómo se genera especificidad en la señal, probablemente una «especificidad combinatorial», es decir como reflejo de una combinación particular de grados de modulación de las diversas cascadas de señalización. Los procesos concretos implicados (proteínas de anclaje y de andamio que permiten el ensamblaje diferenciado de proteínas transductores, los mecanismos de consolidación de la señal y la existencia de umbrales de señalización) son un campo futuro de trabajo de gran interés y dificultad.

## **IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA DE LOS SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR**

Muchas situaciones patológicas se derivan de un funcionamiento alterado (excesivo o disminuido) de los sistemas de comunicación celular. A su vez, múltiples fármacos actúan modulando las cascadas de señalización a diferentes niveles (39, 40).

El cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, los procesos neurodegenerativos o inflamatorios cursan con alteraciones en sistemas de señalización celular, ya sea por cambios en los niveles de

mensajeros, en el número o la funcionalidad de los receptores o de los distintos componentes de las cascadas de transducción, o en una mezcla de estos motivos.

En ocasiones pueden producirse alteraciones genéticas que lleven a una señalización constitutiva e independiente del factor extracelular. Este tipo de alteraciones afectan fundamentalmente a aquellas moléculas que regulan positivamente las rutas de señalización. Por otro lado, pueden producirse alteraciones genéticas que eliminen la función de una proteína concreta, bien debido a la pérdida del gen respectivo o a mutaciones puntuales que creen problemas en la expresión de una proteína o en su actividad biológica (22, 23). Este tipo de disfunciones afectan a moléculas que actúan como reguladoras negativas de las cascadas de señalización. El ejemplo más prototípico de estas disfunciones moleculares es el cáncer, una enfermedad que se origina como consecuencia de la desregulación de las cascadas de señalización que modulan la proliferación celular, la diferenciación celular, la detección/reparación de daño genético, y el proceso de apoptosis.

Ahora sabemos que esta patología se debe a la acumulación de mutaciones que determinan bien la activación constitutiva (en el caso de los oncogenes) o la inactivación (en el caso de los genes supresores de tumores) de proteínas implicadas en la señalización celular. El resultado son rutas de señalización constitutivamente activas, que dan órdenes continuas de proliferación celular sin posibilidad de control externo (22, 23, 40).

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON ONCOGÉNESIS

El repertorio de vías de transducción implicadas en cáncer es creciente, y sólo pretendo aquí enumerar algunas de ellas, para dar idea de su diversidad y potenciales interacciones.

*Receptores con actividad tirosina-quinasa (RTKs).*—Los RTK median las acciones de múltiples factores que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (5), y sus cascadas de señalización concentran un número muy elevado de oncoproteínas. La activación incontrolada de estas vías puede producirse por sobreexpresión del propio factor de

crecimiento (PDGFs, FGFs, entre otros); por mutaciones, fusiones o deleciones en los propios receptores que conducen a su dimerización y/o activación constitutiva de su dominio citoplásmico catalítico (por ejemplo, mutaciones en Neu/Erb2 o en el receptor de CSF-1, las fusiones Tel.PDGFβR o RIαPKA-Ret); o por la sobreexpresión o amplificación del receptor, como sucede con el receptor HER-2, cuyos niveles están aumentados en el 25-30% de los tumores de mama [ver revisiones (22, 23, 41)]. Este tipo de receptores desempeña también un papel importante en metástasis y angiogénesis. Así, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor (Met) son importantes en la motilidad e invasividad de células epiteliales y endoteliales. Por otra parte, muchos tumores sólidos producen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en respuesta a hipoxia, lo que es crítico para la angiogénesis característica de esas situaciones (42).

*Proteínas adaptadoras, transductoras y moduladoras de RTKs.*—La disregulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular puede tener también su origen en cambios en la expresión o actividad de proteínas citosólicas adaptadoras que conducen la señal de RTKs, como ShC, Nck o Crk. Las alteraciones en la familia de tirosina quinasas citosólicas tipo Src, generalmente por pérdida de alguno de sus mecanismos autoreguladores, son también muy importantes por sus repercusiones en el control del ciclo celular, la adhesión celular, la supervivencia y la angiogénesis (43). También la alteración de proteínas reguladoras negativas de RTKs, como Cbl (implicada en la ubiquitinación y degradación de RTKs y tirosina quinasas citosólicas) puede promover transformación celular (44).

*Proteínas G monoméricas de las familia ras y rho/rac/cdc42.*—El papel central de Ras en muchas vías de señalización celular hace que diversos tipos de alteraciones relacionadas con ella estén implicadas en el desarrollo de tumores (20, 22, 23). Son frecuentes las mutaciones constitutivamente activas de H-Ras, K-Ras y N-Ras, y las alteraciones en sus proteínas activadoras Ras-GEF (intercambiadores de GDP por GTP), en sus proteínas atenuadoras Ras-GAP (que incrementan su actividad GTPásica), o en proteínas efectoras de ras (raf y la cascada MEK/ERK 1/2, PI3K, PKC-ZETA, etc.) también están implicadas en tumorigénesis. Aunque se conoce en menor detalle, lo mismo sucede para la familia rho/rac/cdc42, habiendo sido caracterizadas como onco-

proteínas formas mutantes de factores de intercambio de nucleótidos específicos, como Dbl, Vav, Lbc y un largo etcétera. Es importante destacar aquí las importantes conexiones entre esa familia de proteínas y el control del citoesqueleto, en el contexto de los importantes cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto y en la desorganización del citoesqueleto de actina que tiene lugar en las células transformadas, y la relación de esos sucesos con la capacidad de las células tumorales para crecer de forma independiente de adhesión a sustrato.

*Vías de señalización mediadas por PI3K.*—La modulación de la actividad de distintas isoformas de PI3K es una diana habitual en las vías de señalización de numerosos RTKs y de otros tipos de receptores (45, 46). Los productos de la actividad PI3K modulan una gran variedad de efectores celulares, entre los que destaca la serina/treonina quinasa Akt/PKB. Esta vía está implicada en el control de la proliferación, supervivencia y migración celular, mediante la acción de PKB sobre dianas como GSK3, Bad o factores de transcripción antiapoptóticos de la familia Forkhead (47). De acuerdo con ese papel, el oncogen v-Akt es un potente agente transformador. Es interesante mencionar que la inactivación de la subunidad catalítica p110 gamma de PI3K da lugar al desarrollo de adenocarcinomas colorectales invasivos en ratones (48). Por otra parte, la proteína encargada de inactivar los productos de la PI3K, la fosfatasa de lípidos PTEN, es un potente gen supresor de tumores, que es uno de los que aparece deletado o mutado con más alta frecuencia en diversos tipos de cáncer (49).

*Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas.*—La numerosa familia (más de 1.000 miembros) de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) se ha relacionado habitualmente con la modulación de vías de segundos mensajeros «clásicos», como el calcio o el AMP-cíclico, y sólo recientemente se está prestando atención a su capacidad de regular la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (6, 28, 30). Además de la capacidad de AMPc de transmodular diversas vías mitogénicas, tanto a través de PKA como directamente modulando intercambiadores de nucleótidos de proteínas G monoméricas, se une un creciente abanico de mecanismos que conectan GPCR con caminos «típicos» de RTKs mencionados más arriba, como las vías ERK/JNK/p38, o la activación de PI3K o de la tirosina quinasa citosólica Src (6).

La migración de células tumorales y el fenómeno de metástasis comparten similitudes con el tráfico de leucocitos, regulado por quimioquinas y sus receptores. Recientemente, se ha descrito que la expresión específica de receptores de quimioquinas en células tumorales es un evento esencial que conduce a la invasión celular y metástasis de esas células tumorales de forma órgano-específica y dependiente de quimioquinas y sus correspondientes receptores, sugiriendo un papel relevante para los mismos en la invasividad celular (50).

*Vía de JAK-STAT.*—La vía de señalización JAK-STAT desempeña un papel esencial en mediar las acciones de citoquinas y factores como el factor de crecimiento, y comparte en su estrategia de señalización muchos elementos con la de RTKs (51). Estas cascadas regulan muchos aspectos críticos del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, y su des-regulación es frecuente en muchos tumores primarios, como los linfomas de células T (52).

*Vía de señalización de TGF- $\beta$ .*—Existen sólidas evidencias del papel del receptor de TGF $\beta$ , a través de los moduladores de transcripción denominados Smads, como supresores de tumores (53). Esta función supresora está alterada en diversos tipos de cáncer debido a mutaciones en el propio receptor de TGF $\beta$ , en las proteínas Smad 2 o Smad 4, o en otros componentes de la vía de transducción. Sin embargo, se ha observado que TGF $\beta$  puede también exacerbar el fenotipo maligno en ciertas situaciones experimentales, así como promover migración y metástasis induciendo transiciones epitelio/mesénquima (53).

*Otras vías implicadas.*—Diversas cascadas de transducción inicialmente identificadas por su papel en desarrollo embrionario, como las vías Wnt/Wingless, Hedgehog/Patched o Notch, parecen desempeñar un papel importante en el control de la diferenciación y proliferación celular en el adulto (54, 55). Por otra parte, es de gran relevancia para los procesos tumorigénicos el adecuado control de la adhesión celular, en la que la expresión de cadherinas y cateninas y los contactos célula-célula desempeñan un papel clave. La expresión de E-cadherina está frecuentemente disminuida en células tumorales, donde también aparecen mutaciones en este gen. Datos recientes sugieren que la expresión de E-cadherinas estaría regulada por el factor de transcripción Snail, lo que refuerza la relación entre la transición epitelio/mesénquima y la capacidad migratoria y los procesos tumorigénicos y metastáticos (56, 57).

## PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Los receptores acoplados a proteínas G median las acciones de mensajeros esenciales para la función del sistema cardiovascular. En efecto, la activación de receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos, angiotensina II o endotelina, desempeña un papel central en la regulación de la contractilidad cardíaca, de la resistencia vascular, en el desarrollo del sistema cardiovascular o en el crecimiento y remodelación de los diversos tipos celulares cardiovasculares. Estos receptores y sus sistemas de transducción constituyen la diana de múltiples fármacos utilizados en el tratamiento del fallo cardíaco congestivo, la angina de pecho, o la hipertensión, enfermedades muy frecuentes y que constituyen un objetivo sanitario de primer orden (58-61). Todos estos receptores tienen en común que están regulados por GRKs y arrestinas. Puesto que, como se ha comentado, los niveles de ciertas GRKs están aumentados en fallo cardíaco congestivo, isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular o hipertensión, es evidente el interés de investigar por qué se producen esos cambios y su repercusión funcional en la patogenia y evolución de diferentes cardiopatías.

Diferentes estímulos patofisiológicos tales como infarto de miocardio, hipertensión, enfermedades de las válvulas cardíacas, miocarditis viral o cardiomiopatía dilatada pueden provocar un aumento en la carga hemodinámica en corazón. Ello genera una respuesta hipertrófica adaptativa de los miocitos cardíacos que se caracteriza por un aumento de la masa y el volumen de cada célula individual y por la alteración del patrón de expresión génica. Como consecuencia se producen cambios en la batería de proteínas contráctiles y se activa la inducción de un programa de expresión de genes embrionarios, no expresados en condiciones normales. Si el estrés hemodinámico persiste, el corazón sobrecargado entra en una fase crítica de transición desde una hipertrofia compensatoria a un fallo cardíaco.

Las situaciones de fallo cardíaco ponen en marcha mecanismos compensatorios del sistema simpático, que aumenta la estimulación adrenérgica, lo que a su vez promueve la desensibilización de los receptores adrenérgicos (posiblemente potenciada por el incremento en GRKs) y una disminución selectiva en el número de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, ya que los niveles de  $\beta_2$ AR no se encuentran tan alterados. Este desaco-

plamiento de receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos de proteínas G puede a su vez facilitar su acoplamiento a otras vías de señalización, como MAPK.

Por otra parte, diversos receptores acoplados a proteínas G $\alpha$ q ( $\alpha$ 1-AR, endotelina 1, angiotensina II) son capaces de promover un fenotipo hipertrófico tanto en modelos celulares como *in vivo*. Consistentemente, ratones transgénicos que sobreexpresan G $\alpha$ q o formas constitutivamente activas de esta proteína desarrollan cardiomiopatía dilatada y fallo cardiaco. La señalización mediada por G $\alpha$ q pone en marcha diversas vías intracelulares que podrían contribuir a este fenotipo, como la estimulación de PKC, de diversos módulos de quinasas mitogénicas y de estrés (Erk 1/2; JNK/p38; Erk5) y la activación de factores de transcripción de la familia MEF-2 y calcineurina. Datos recientes también señalan la importancia de la ruta PI3K/PTEN en el desarrollo y el mantenimiento de hipertrofia cardiaca (58-62).

## OTRAS PATOLOGÍAS

En otras muchas enfermedades se encuentran alterados los niveles de mensajeros y/o las rutas de señalización que controlan. La diabetes, por ejemplo, es resultado de reducidos niveles de la insulina, mensajero clave en el control de la glucosa plasmática (diabetes tipo I) o de una reducida eficacia de la cascada de señalización de la insulina (diabetes tipo II) (63). En patologías cardiovasculares, existen, como ya he comentado, aumentos en los niveles de mensajeros como catecolaminas, angiotensina o endotelina, que alteran a su vez el normal funcionamiento y crecimiento de tipos celulares cardiovasculares, y pueden conducir a hipertrofia cardiaca y a fallo cardiaco. En la enfermedad de Parkinson, la degeneración de las neuronas de determinada zona del cerebro disminuye los niveles del neurotransmisor dopamina.

Es interesante también señalar que diversos patógenos utilizan rutas de señalización para causar sus efectos. Así, la toxina colérica, «estropeando» el interruptor molecular de la proteína Gs de las células del epitelio intestinal, inhibiendo su actividad GTPásica y dejándola irreversiblemente en su estado activo, lo que altera el tráfico de iones y líquido a través del intestino y promueve la deshidratación y diarrea típicas de la infección con *Vibrio cholera*. Otras toxinas bacterianas, como la

pertúsica (causante de la tos ferina), o la botulínica, tienen como dianas otras proteínas G (Gi heterotrimérica y proteínas Rho monoméricas, respectivamente). Otras bacterias, como *Salmonella* o *Yersinia*, y distintos virus (SIDA, herpes, Epstein-Bar, etc.) han desarrollado o tomado evolutivamente moléculas de señalización (en algunos casos versiones truncadas o alteradas constitutivamente) que les permiten controlar a su gusto las rutas biológicas de las células que infectan, facilitando su internalización, proliferación, o la evasión del sistema inmune.

## DIANAS DE FÁRMACOS

El mejor conocimiento de los procesos de señalización implicados y alterados en los distintos procesos fisiológicos y patológicos permite también utilizarlos como dianas de fármacos. La idea básica es aprovechar la gran capacidad de control de las funciones celulares de estos sistemas para modificarlas de la forma más eficaz y específica posible (39-41, 62).

En algunos casos, la estrategia consiste en modular exógenamente los niveles de mensajero, bien para evitar su carencia, como sería el caso de la administración de insulina, o para evitar que se produzca en exceso, como la aspirina y los inhibidores de ciclooxigenasas de nueva generación, que evitan la excesiva síntesis de los mensajeros denominados prostaglandinas y de otros derivados del ácido araquidónico, controlando así procesos inflamatorios.

En otros casos, se administran compuestos químicos capaces de unirse con gran afinidad a los mismos receptores que los mensajeros endógenos, consiguiendo así mimetizar (agonistas) o impedir (antagonistas) su acción. Por ejemplo, agonistas de receptores beta2-adrenérgicos son eficaces broncodilatadores; antagonistas beta1-adrenérgicos se utilizan para el tratamiento de la hipertensión; antagonistas del receptor H2 de la histamina inhiben la excesiva secreción gástrica; agonistas de receptores de opiáceos, como la morfina, se utilizan como analgésicos, etc. Todos estos últimos son ejemplos de fármacos moduladores de distintos miembros de la gran superfamilia de receptores de membrana, denominados receptores acoplados a proteínas G, de los que ya hemos hablado, y de los que se estima que existen del orden de 1.000 en los

genomas de vertebrados, aunque hasta ahora en humanos sólo se conocen los mensajeros endógenos y la función fisiológica esencial de unos 160. Más del 50 por ciento de los fármacos actualmente en el mercado tienen como diana miembros de esta familia de receptores, lo que da idea de su importancia actual y futura. La identificación de los procesos biológicos en los que participan los receptores aún «huérfanos» (es decir, de los que se conoce el gen, pero de los que se ignora la función que controlan y el mensajero endógeno) y de posibles ligandos moduladores es un reto muy atractivo en el inmediato futuro (6).

La modulación farmacológica de los sistemas de señalización celular puede, además, realizarse a otros niveles distintos de la interacción receptor-mensajero. Se trata en este caso de interferir específicamente en las actividades de componentes clave de la cascada de señalización intracelular. Así, puede controlarse la desaparición de segundos mensajeros, como los inhibidores de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (estrategia de fármacos tipo Viagra, por ejemplo).

Un campo de enorme interés es el de las enzimas que fosforilan (quinasas) o desfosforilan (fosfatasa) a otras proteínas, que es, como se ha mencionado, una estrategia ampliamente utilizada en biología para modificar temporalmente su actividad, localización o estabilidad. Fármacos inmunosupresores empleados para evitar el rechazo a órganos transplantados, como la ciclosporina, son inhibidores de una proteína fosfatasa modulada por calcio, denominada calcineurina. En el caso de las quinasas, un área experimental muy activa (con varios ensayos en fases I a III) es la búsqueda de inhibidores de tirosina quinasas asociadas a receptores de factores de crecimiento relacionados con el cáncer (40, 41). Muy recientemente, el mejor conocimiento del papel celular y de la estructura de una tirosina quinasa denominada Abl ha conducido al descubrimiento de un nuevo fármaco, denominado Glivec, que ya ha demostrado ser de gran eficacia en el tratamiento de cierto tipo de leucemia y de cáncer. En definitiva, el estudio del campo de la comunicación celular va a ser clave en el futuro para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

## RETOS FUTUROS

Para avanzar en esta formidable tarea será necesario, sin duda, un mejor conocimiento de las redes de interacción funcional entre genes y proteínas, y de su control por los sistemas de señalización celular. Tendremos que entender mejor cómo se genera especificidad y complejidad en las distintas cascadas de transducción de señal, comprender cómo la célula integra las distintas señales que recibe en el tiempo; los patrones de localización subcelular de los mensajes generados, las fluctuaciones espacio-temporales de la señal, o qué determina la amplitud y la duración de la activación de los sistemas de señalización celular (1). También debemos tener en cuenta que las células en el organismo y las que están alteradas en patologías no están aisladas. Por ejemplo, los procesos cancerosos son el resultado de un conjunto de interacciones entre las células transformadas y otros tipos celulares. Por lo tanto, hay que intentar resolver la situación de ese conjunto integrado, considerando todas las interrelaciones relevantes, procurando desarrollar los adecuados sistemas experimentales.

Este conocimiento más profundo del «interactoma» celular debe ir acompañado de otras estrategias. Es fundamental la información sobre los genes que son críticos para modificar el estado fisiológico normal y provocar la patología. Para identificarlos existen dos grandes aproximaciones: los estudios de asociación genética, cuando puedan establecerse claramente en humanos; y los estudios de modificación de la expresión génica en modelos animales mediante disrupción o modificación génica, o las nuevas tecnologías de RNA de interferencia.

En la actualidad, tras la secuenciación del genoma del ratón y de otros organismos modelo, hay programas de investigación muy activos para variar la expresión de todos los genes de una manera sistemática, y ver cual es su repercusión a nivel de fenotipo, dando así idea de cual es la función fisiológica relevante de estos genes. Este es un reto muy importante, porque supone ser capaces de llegar a una caracterización fenotípica en profundidad de los modelos animales, lo que requiere instalaciones, personal y metodología adecuada.

Actualmente, la mayor parte de la información sobre la función génica, y sobre la posible utilidad como diana terapéutica de determinados genes, se basa en la utilización de modelos experimentales, como son

cultivos celulares, modelos animales de enfermedades, y la modificación de expresión génica en distintas especies modelo. Sin embargo, desde un punto de vista crítico, hay que plantearse hasta que punto son sistemas que reflejan adecuadamente la complejidad de la fisiología y de la patología humana. Para sacar el mayor partido posible a esta información tendremos que conocer, cada vez mejor, los cambios concretos en la expresión génica y las alteraciones fenotípicas reales asociadas a las patologías humanas, utilizando para este objetivo las nuevas metodologías genómicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) DOWNWARD, J. (2000): The ins and outs of signalling. *Nature*, **411**: 759-62.
- (2) HUNTER, T. (2000): Signaling-2000 and beyond. *Cell*, **100**: 113-27.
- (3) LEFKOWITZ, R.J. (2004): Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **25**: 413-22.
- (4) RODBELL, M. (1994): Signal transduction: evolution of an idea. *Nobel Lecture*, 220-237.
- (5) SCHLESSINGER, J. (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**: 211-25.
- (6) PIERCE, K.L.; PREMONT, R.T. and LEFKOWITZ, R.J. (2002): Signalling: Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**: 639-50.
- (7) BOCKAERT, J. and PIN, J.P. (1999): Molecular tinkering of GPCR. *EMBO J*, **18**: 1723-29.
- (8) LAVIN, M.F., et al. (2005): ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.*, **569**: 123-32.
- (9) BRAHIMI-HORN, C., MAZURE, N. and POUYSSEGUR, J. (2005): Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal*, **17**: 1-9.
- (10) RHEE, S.G., et al. (2005): Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol*, **17**: 183-9.
- (11) CARLING, D. (2004): The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*, **29**: 18-24.
- (12) PAWSON, T. (1995): Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**: 573-80.
- (13) PAWSON, T. and SCOTT, J.D. (1997): Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**: 2075-80.
- (14) JORDAN, J.D.; LANDAU, E.M. and IYENGAR, R. (2000): Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell*, **103**: 193-200.
- (15) LIM, W.A. (2002): The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr Opin Struct Biol*, **12**: 61-8.

- (16) Pawson, T.; Raina, M. and Nash, P. (2002): Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett*, **513**: 2-10.
- (17) McCUDDEN, C.R., et al. (2005): G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, **62**: 551-77.
- (18) ROSSMAN, K.L.; DER, C.J. and SONDEK, J. (2005): GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 167-80.
- (19) SCHWARTZ, M. (2004): Rho signalling at a glance. *J Cell Sci*, **117**: 5457-8.
- (20) BAR-SAGI, D. and HALL, A. (2000): Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, **103**: 227-38.
- (21) SCITA, G., et al. (2000): Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *Embo J*, **19**: 2393-8.
- (22) MCCORMICK, F. (1999): Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*, **9**: M53-6.
- (23) HUNTER, T. (1997): Oncoprotein networks. *Cell*, **88**: 333-46.
- (24) BRIVANLOU, A.H. and DARNELL, J.E. JR. (2002): Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**: 813-8.
- (25) SCHLESSINGER, J. (2004): Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, **306**: 1506-7.
- (26) PAWSON, T. (1997): New impressions of Src and Hck. *Nature*, **385**: 582-3, 585.
- (27) PAWSON, T.; GISH, G.D. and P. NASH (2001): SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*, **11**: 504-11.
- (28) GUTKIND, J.S. (2000): Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*, **2000**: RE1.
- (29) KOLCH, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **351 Pt 2**: 289-305.
- (30) WERRY, T.D., SEXTON, P.M. and CHRISTOPOULOS, A. (2005): «Ins and outs» of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab*, **16**: 26-33.
- (31) KOHOUT, T.A. and LEFKOWITZ, R.J. (2003): Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol*, **63**: 9-18.
- (32) PENELA, P.; RIBAS, C. and MAYOR, F. JR. (2003): Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal*, **15**: 973-81.
- (33) LEFKOWITZ, R.J. and SHENOY, S.K. (2005): Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **308**: 512-7.
- (34) LOMBARDI, M.S.; KAVELAARS, A. and HEIJNEN, C.J. (2002): Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. *Crit Rev Immunol*, **22**: 141-63.
- (35) PENELA, P., et al. (1998): Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J Biol Chem*, **273**: 35238-44.

- (36) PENELA, P., et al. (2001): Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J*, **20**: 5129-38.
- (37) ELORZA, A., et al. (2003): MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, **278**: 29164-73.
- (38) WHITMARSH, A.J. and DAVIS, R.J. (2000): A central control for cell growth. *Nature*, **403**: 255-6.
- (39) HOPKINS, A.L. and GROOM, C.R. (2002): The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, **1**: 727-30.
- (40) COHEN, P. (2002): Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, **1**: 309-15.
- (41) TIBES, R.; TRENT, J. and KURZROCK, R. (2005): Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **45**: 357-84.
- (42) HICKLIN, D.J. and ELLIS, L.M. (2005): Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, **23**: 1011-27.
- (43) SCHLESSINGER, J. (2000): New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell*, **100**: 293-6.
- (44) JOAZEIRO, C.A. et al. (1999): The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, **286**: 309-12.
- (45) VOGELSTEIN, B. and KINZLER, K.W. (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, **10**: 789-99.
- (46) VANHAESEBROECK, B. and ALESSI, D.R. (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, **346 Pt 3**: 561-76.
- (47) BRAZIL, D.P.; YANG, Z.Z. and HEMMINGS, B.A. (2004): Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, **29**: 233-42.
- (48) SASAKI, T., et al. (2000): Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature*, **406**: 897-902.
- (49) DI CRISTOFANO, A. and PANDOLFI, P.P. (2000): The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, **100**: 387-90.
- (50) LI, Y.M., et al. (2004): Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, **6**: 459-69.
- (51) RAWLINGS, J.S.; ROSLER, K.M. and HARRISON, D.A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, **117**: 1281-3.
- (52) MITCHELL, T.J. and JOHN, S. (2005): Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology*, **114**: 301-12.
- (53) MASSAGUE, J., BLAIN, S.W. and LO, R.S. (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, **103**: 295-309.
- (54) HOOPER, J.E. and SCOTT, M.P. (2005): Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 306-17.
- (55) REYA, T. and CLEVERS, H. (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**: 843-50.

- (56) KANG, Y. and MASSAGUE, J. (2004): Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, **118**: 277-9.
- (57) SCHLESSINGER, K. and HALL, A. (2004): GSK-3beta sets Snail's pace. *Nat Cell Biol*, **6**: 913-5.
- (58) ROCKMAN, H.A., KOCH, W.J. and LEFKOWITZ, R.J. (2002): Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, **415**: 206-12.
- (59) OLSON, E.N. (2004): A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*, **10**: 467-74.
- (60) BARKI-HARRINGTON, L.; PERRINO, C. and ROCKMAN, H.A. (2004): Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, **63**: 391-402.
- (61) SELVETELLA, G., et al. (2004): Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res*, **63**: 373-80.
- (62) VLAHOS, C.J.; MCDOWELL, S.A. and CLERK, A. (2003): Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov*, **2**: 99-113.
- (63) BRADY, M.J. (2004): IRS2 takes center stage in the development of type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **114**: 886-8.