

REB

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Revista de Educación Bioquímica
Universidad Nacional Autónoma de México
reb@bq.unam.mx
ISSN (Versión impresa): 1665-1995
ISSN (Versión en línea): 187-3690
MÉXICO

2005

Rodrigo Flores Vieyra / Juan Carlos Raya Pérez / M. Eugenia Torres Márquez
PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DE CA²⁺: CARACTERÍSTICAS Y
ACTIVACIÓN

Revista de Educación Bioquímica, septiembre-diciembre, año/vol. 24, número 3-4
Universidad Nacional Autónoma de México
Distrito Federal, México
pp. 74-80

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>



PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DE Ca^{2+} : CARACTERÍSTICAS Y ACTIVACIÓN*

Rodrigo Flores-Vieyra, Juan Carlos Raya-Pérez y M. Eugenia Torres-Márquez

RESUMEN

La fosforilación reversible de las proteínas es clave en la regulación de vías metabólicas y en la mayoría de las funciones celulares. Una gran proporción de las proteínas cinasas (PK) forman parte de cascadas de señalización y algunas de estas cascadas involucran modificación en los niveles de segundos mensajeros como el Ca^{2+} . En esta revisión se describen las características estructurales fundamentales de estas proteínas junto con los modelos propuestos para su activación por Ca^{2+} .

PALABRAS CLAVE: CDPK, PKC, CaMK, CCaMK

ABSTRACT

Reversible protein phosphorylation is key to the regulation of metabolic pathways and most aspects of cell function. Numerous protein kinases are part of signaling cascades, some of which are mediated by second messenger levels modification, like Ca^{2+} . In this review, Ca^{2+} dependent kinases main structural characteristics as well as their proposed calcium dependant activation models are described.

KEY WORDS: CDPK, PKC, CaMK, CCaMK

INTRODUCCIÓN

La fosforilación reversible de las proteínas es un mecanismo modulador de una gran cantidad de las funciones celulares (1) y virtualmente de todos los seres vivos. El proceso es llevado a cabo conjuntamente por la acción de proteínas cinasas y fosfatasa que mantienen los niveles de fosforilación de las proteínas blanco. Las proteínas cinasas [2.7.1.37 ó 2.7.3.11-12] se definen como enzimas que tienen la capacidad de transferir el fosfato gamma del ATP a un residuo de un aminoácido receptor localizado en una proteína que funciona como sustrato (2). Los residuos de aminoácidos que son sustrato de la acción de las proteínas cinasas, son Ser, Tre, Tir e His, en sus

grupos hidroxilo e imidazol, respectivamente. En esta revisión sólo se considerarán a las proteínas cinasas de residuos de Ser/Tre, pues dentro de ellas están los miembros que se ha demostrado son modulados por Ca^{2+} .

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS

La clasificación de las proteínas cinasas en cinco grupos se ha realizado con base en la homología entre dominios catalíticos (3) independientemente de que el sitio de unión para el ATP se encuentra altamente conservado.

A) Grupo AGC: Este grupo considera a las cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos proteína cinasa A

(PKA), proteína cinasa G (PKG), además de las cinasas dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (PKC). Una característica importante de este grupo es la regulación de su actividad por segundos mensajeros como el diacilglicerol, el Ca^{2+} , el AMPc o el GMPc.

B) Grupo CaMK: Este es representado mayoritariamente por dos sub-grupos principales, el subgrupo de las cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK) y las dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK y CCaMK) y aquéllas con cierto parecido estructural a las no fermentadoras de sacarosa de la levadura (SNF1, por sus siglas en inglés) denominadas SnNRK.

*Recibido: 8 de mayo de 2005 Aceptado: 13 de septiembre de 2005

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, Apdo. Postal 70-159, México 04510 DF. Teléfono 5623-2510, Fax 5616-2419. Correo E: metorres@servidor.unam.mx

C) Grupo CMGC: Incluye a los subgrupos cinasas dependientes de ciclina (CDK), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cinasas de la glucógeno sintetasa (GSK-3) y la caseína cinasa II (CKII). Estos cuatro subgrupos actúan en un proceso posterior a la activación por segundos mensajeros.

D) Grupo PTK: Este grupo se ha encontrado hasta ahora en animales, hongos y algunas bacterias, tiene como característica que fosforila específicamente residuos de tirosina.

E) Únicas: Incluye una amplia gama de proteínas cinasas clonadas a partir de plantas que no se han podido clasificar en alguno de los cuatro grupos anteriores.

Las proteínas cinasas de interés de esta revisión se encuentran en los primeros dos grupos, ya que estos contienen a las cinasas dependientes de Ca²⁺. La pregunta que podría surgir, una vez que se hayan establecido las características generales de las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺ es, si en la célula se dan variaciones en los niveles de Ca²⁺ libre y si estas se encuentran en el rango de activación de las cinasas que se describirán. En cualquiera de los dos casos la respuesta es sí; los niveles de Ca²⁺ libre en células de animales y de hongos se ha reportado alcanzar hasta 1.2 μM, ante estímulos como adrenalina o AMPc, respectivamente. Mientras que en células de vegetales las estimaciones han llegado a ser de hasta 2-3 μM para los cambios que se dan en el tubo polínico en crecimiento. El valor de la Kd para Ca²⁺ de las diferentes cinasas está alrededor de 1 μM, como se señalará para cada familia de manera particular en el texto correspondiente.

Grupo CaMK

Subgrupo CDPK. Muchas de las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺ no requieren calmodulina,

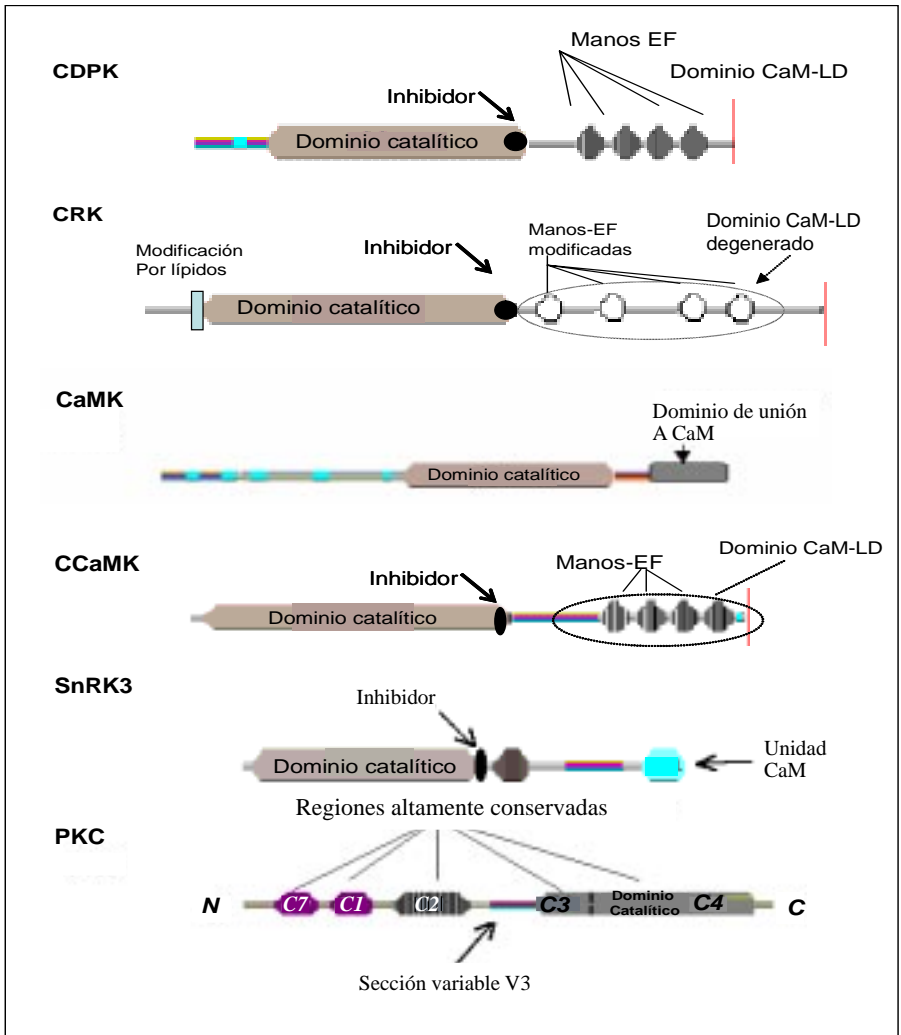


Figura 1. Diagrama estructural de las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺. Se indican el dominio catalítico que comparten las cinasas, así como el sitio de auto-inhibición. El dominio de manos-EF (■) es variable en los subgrupos. En CRK se presenta al dominio manos-EF en círculos abiertos para indicar que estos han degenerado.

fosfolípidos o diacilglicerol, lo que marca una diferencia entre las familias CaMK y AGC. Este grupo de cinasas se ha encontrado en plantas vasculares y no vasculares y en el protozoario *Plasmodium falciparum* (4). Este tipo de proteínas se distingue por presentar una estructura en el carboxilo terminal que tiene parecido con el sitio de regulación mediado por calmodulina (CaM-LD) (Fig. 1). Las CDPK presentan cuatro dominios: el dominio catalítico, el dominio auto-inhibitorio, un dominio variable y el dominio específico para la unión de Ca²⁺ (Fig. 1). Este último comparte características con el de la

calmodulina (CaM). Todas las CDPKs caracterizadas hasta el momento son activadas por Ca²⁺(5), su Kd está en el rango micromolar, por ejemplo para la DcCPK1 de zanahoria la Kd es de 1.7 μM (6). Las CDPKs caracterizadas de *Arabidopsis* (a excepción de CPK25) presentan, en el dominio que une al Ca²⁺, cuatro secuencias de aminoácidos denominados manos EF. Estas manos EF son estructuras de 29 residuos, que forman una α-hélice (hélice E), seguida de una asa (que es la región donde se une el ión, al agruparse varios dominios EF) y una segunda α-hélice. Los dominios de manos-EF se presentan en pares

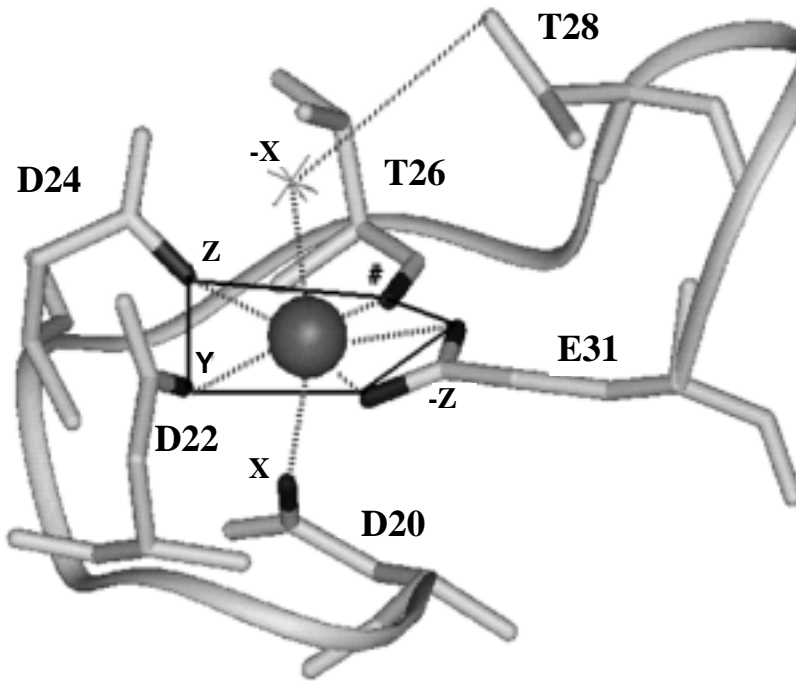


Figura 2. Estructuras del asa de una mano-EF. Se marca la bi-pirámide de base pentagonal que forma el anillo de coordinación en línea continua; las líneas discontinuas muestra los anclajes que forman los átomos de oxígeno con el átomo de Ca^{2+} (esfera al centro). El residuo E31 corresponde al doceavo residuo de la estructura, presenta dos sitios de coordinación. El residuo T28 corresponde al residuo 9 el cual presenta puentes de hidrógeno.

orientados cara a cara. Los residuos 1, 3, 5, 7, 9 y 12 de la asa son los encargados de quelar al Ca^{2+} formando un complejo de arreglo piramidal con una base pentagonal (Fig. 2), que proporciona siete ligandos oxigenados. Los residuos 1, 3, 5 suministran ligandos monodentados, el residuo 12 que es un ligando bidentado, generalmente corresponde a un glutámico, El residuo 7 coordina directamente al Ca^{2+} por los oxígenos de su grupo carboxilo. El residuo 9 permite la formación de puentes de hidrógeno los cuales unen al Ca^{2+} (7).

Modelo de regulación por Ca^{2+} para CDPK. Hasta la fecha se proponen dos modelos de activación para esta proteína: en el primer mecanismo (Fig. 3A), se propone que una estructura flexible pero de movimiento limitado (por analogía de tipo baleero) une el dominio CaM-LD a la cinasa. Después de la estimulación

por Ca^{2+} el dominio CaM-LD cambia la conformación del dominio inhibidor, desplazando a éste y permitiendo así la activación de la cinasa. Este modelo es muy parecido al propuesto para explicar la activación de la familia CaMK, con la excepción de que la región CaM-LD está unida covalentemente mientras que la calmodulina actúa como una proteína independiente. El segundo modelo (Fig. 3B), propone que la unidad CaM-LD está siempre unida al dominio inhibidor, independientemente de los niveles de Ca^{2+} . No obstante, al incrementarse la concentración del ión, la estructura de esta región se modifica generando a su vez un rearrreglo del sitio inhibitorio de tal manera que lo desplaza del sitio activo.

Subgrupo CRK. Este subgrupo, que originalmente se reconoció como semejante a CDPK (8) y que de allí derivó su nombre (CDPK related

kinase), se ha hipotetizado tiene un origen evolutivo reciente a partir de un grupo particular de isoformas de CDPK (Fig. 1). Se piensa que el dominio CaM-LD evolucionó a un dominio de manos-EF modificado (Fig. 1). En algunas CRK el extremo C presenta dominios que pueden unir Ca^{2+} , pero no por esto activan a la cinasa; por lo que se considera que han degenerado. El peso molecular del subgrupo CRK oscila entre 64.3 y 68 kD y sus dominios variables son de longitud homogénea, su extremo amino presenta modificaciones post-traduccionales como la esterificación por miristato y palmitato. Resulta interesante que las CRK solo se han encontrado en angiospermas. Hasta la fecha no se han reportado funciones fisiológicas reales o hipotéticas para las CRK, en ningún organismo (4).

Subgrupo CaMK. Dentro de este grupo de cinasas activadas por calmodulina, son 4 las que han sido mejor estudiadas: las CaMK I, II, III o MLCK (por sus siglas en inglés) y la IV. Las MLCK-I, II y IV se encuentran asociadas a varias proteínas en el citoplasma, las membranas de los organelos incluyendo la plasmática, o a elementos del citoesqueleto. La MLCK o cinasa de la cadena ligera de miosina se considera el modelo más simple, incluye a las formas de músculo esquelético, músculo liso y células no musculares; esto es porque parece estar asociada exclusivamente con la actomiosina y fosforila sólo un sustrato, la cadena ligera de la miosina (9). El cDNA que codifica para la MLCK de conejo permite predecir que se trata de una proteína de 610 aminoácidos (aa); aunque en realidad es de 603 aa y consta de tres dominios: el extremo N, el catalítico (residuos 302-539) y el regulador (residuos 577-593). Este último en el extremo C, contiene por tanto al sitio de unión a CaM (Fig. 1). Los estu-

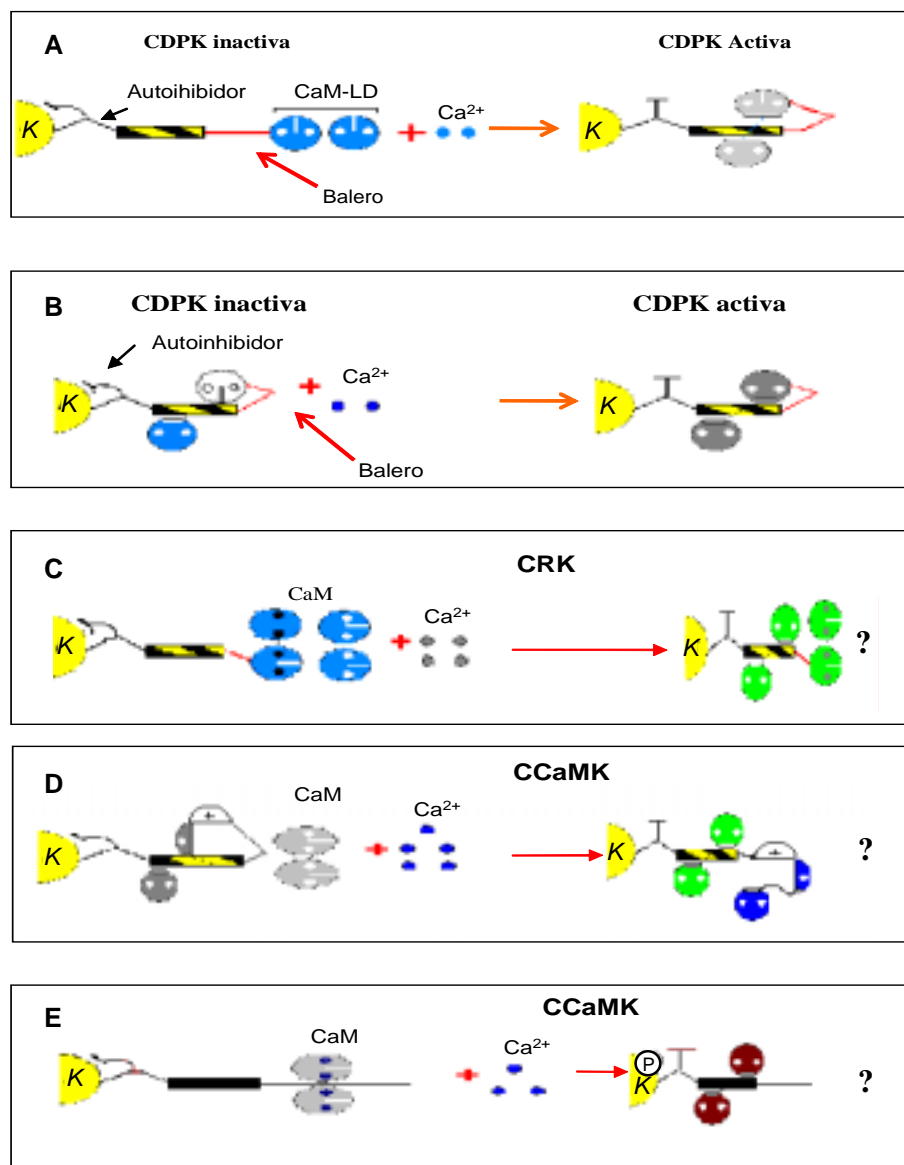


Figura 3. Modelos de activación por Ca²⁺ de las CDPK, CRK y CCaMK. Las regiones marcadas como CaM-LD y CaM representan los sitios de unión a calcio. Los cambios de tono así como los de forma, indican un cambio en la estructura de los mismos, el cual se describe en el texto.

dios de hidrodinámica y de espectrofotometría de dicroísmo circular sugieren que los dominios catalítico y regulador forman una estructura globular con un alto contenido de alfa-hélice, mientras que el resto de la proteína es asimétrica y rica en residuos de prolina (10). *In vitro* es dependiente de la unión con Ca²⁺/CaM, esta última proteína tiene una K_d para el calcio de 1 μM (9). En músculo liso, la MLCK, regula la contracción y en células no musculares participa en la

motilidad, la mitosis, la dinámica del citoesqueleto de actina y la secreción (9). La función de las otras CaMK se ha establecido principalmente en la regulación de la transcripción (11).

Modelo de regulación por Ca²⁺ para la CaMK. La unión del complejo Ca²⁺/CaM con la región que lo une en la proteína cinasa causa un cambio conformacional muy grande. La hélice central actúa como un balero flexible, que se dobla y enrolla

de forma que los dominios globulares de la CaM envuelven completamente al péptido blanco (Fig. 4A). Esta interacción a su vez desplaza la región inhibitoria de la cinasa que deja expuesto al sitio de unión al sustrato. Se ha propuesto que la interacción entre el extremo C de la CaM y el dominio N de la cinasa forman un complejo inactivo. El incremento en Ca²⁺ permite entonces la interacción de la CaM con su cinasa en sitios adicionales que permiten la activación de la enzima (9).

Subgrupo CCaMK. Este nombre se ha usado para describir un grupo de cinasas cuyo extremo C presenta tres manos EF en lugar del sitio de unión a CaM, característica que la distingue de las CDPK (Fig. 1). Este grupo de proteínas ha sido clonado del tabaco y las azucenas (*Lilium longiflorum*) (12) pero no se han encontrado proteínas representativas de este tipo en *Arabidopsis*. La conformación estructural de esta familia en general tiene parecido al del subgrupo CDPKs, aunque el dominio específico encargado de la unión a Ca²⁺ es más parecido al de la familia de las visininas. Estas son proteínas que unen Ca²⁺ por estructuras conformadas por tres manos-EF y son abundantes en tejido nervioso (13). Las CCaMKs tienen un sitio de unión de calmodulina que se superpone al sitio de regulación (Fig. 1). Aunque el mecanismo de activación por Ca²⁺ y calmodulina es complejo, se ha propuesto que se da por una auto fosforilación en respuesta a la unión de un dominio tipo calmodulina de otra proteína. Esta autofosforilación, trae como consecuencia aumento en la afinidad por el sustrato.

Modelo de activación por Ca²⁺ para CRK y CCaMKs. El modelo de activación por Ca²⁺ para las CRK se basa

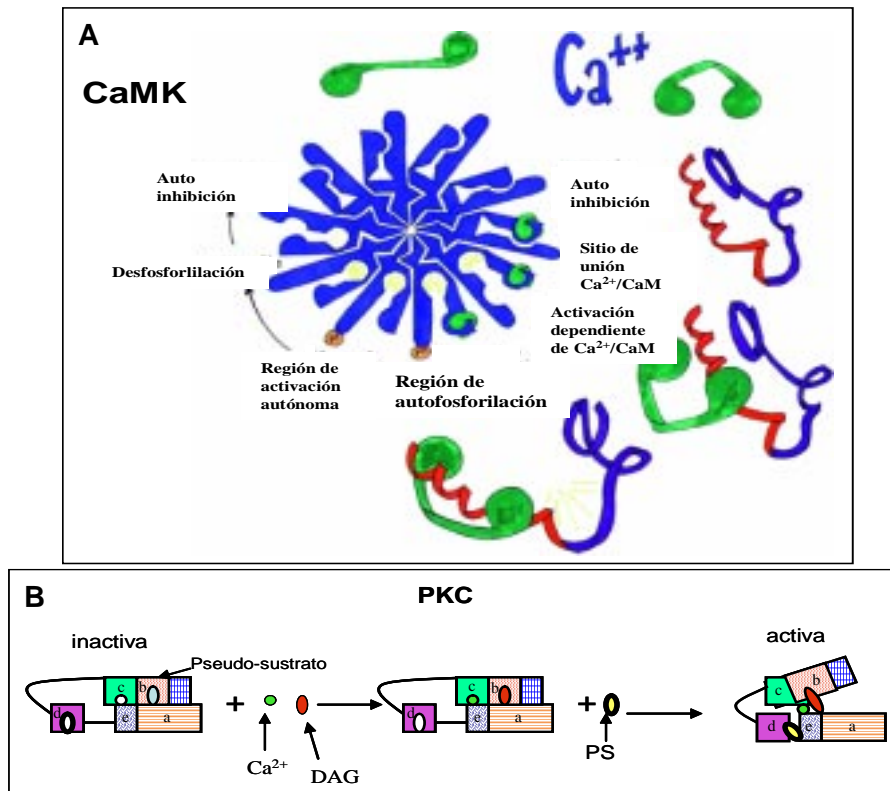


Figura 4. Modelos de activación por Ca^{2+} de las CaMK (A) y la PKC (B). La región () corresponde al dominio catalítico, las regiones C1a y C1b están indicadas como () y () respectivamente, la región C2 y C3 está indicada con () y ()

en el potencial que tiene el complejo Ca^{2+} -CaM de una proteína activadora exógena para estimular la actividad de la cinasa. El proceso de activación consiste en que al unirse el Ca^{2+} a la CaM (Kd $\sim 1 \mu M$), dirige el complejo Ca^{2+} -CaM al sitio inhibitorio, lo que provoca el cambio estructural de éste y por tanto la activación de la cinasa (Fig. 3D). Algunas interrogantes que no resuelve este modelo de activación, es la función que pudiera tener el dominio C-terminal de la proteína, pues parece capaz de unir Ca^{2+} , pero no participa directamente en la activación de la cinasa (14). Las cinasas CCaMKs presentan además de un sitio que une al complejo Ca^{2+} -CaM de una proteína exógena; un dominio, semejante al de visinina, el cual funciona como un sensor adicional para la activación por Ca^{2+} . De tal manera que a niveles basales de Ca^{2+} el dominio semejante a visinina estaría unido al sitio inhi-

bitorio, pero al incrementar la concentración de Ca^{2+} , la proteína activadora que trae consigo el complejo Ca^{2+} -CaM sería capaz de desplazar al dominio de visinina y tendría entonces el sitio de activación libre para ejercer su función (Fig. 3E). Aun se desconoce la posición del dominio de visinina en el sitio inhibitorio y si en realidad el complejo Ca^{2+} -CaM es capaz de desplazar tal dominio del sitio inhibitorio, pues también se puede especular que el desplazamiento se produjera por el incremento mismo de Ca^{2+} (15).

Grupo AGC

Dentro de los miembros de la familia AGC, son las PKC donde dirigiremos nuestra atención, por contener miembros cuya actividad es regulada por Ca^{2+} . Esta familia de proteínas consiste de 12 isoformas con estructuras estrechamente relacionadas entre sí.

Todas las especies de PKC presentan diferencias en su modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato; se subdividen en tres grupos. Las clásicas son dependientes de Ca^{2+} y diacilglicerol, α , βI , βII , γ ; las nuevas que son insensibles a Ca^{2+} : δI , δII , ϵ , θ , η ; y las atípicas que no son reguladas por Ca^{2+} ni diacilglicerol, ζ , PKM- ζ y ι/λ . Las isoformas clásicas consisten en una sola cadena polipeptídica (Fig. 1) con una estructura homóloga general de 4 regiones altamente conservadas y 5 regiones variables distribuidas en dos dominios, uno regulador y el otro catalítico separados por la región variable V3 (16).

Las PKC o sus ortólogos, se encuentran ampliamente distribuidos en los eucariotes, con la posible excepción de las plantas. En organismos pluricelulares complejos pareciera haber expresión de algunas isoformas en tejidos específicos. En general, se encuentran en forma soluble, aunque contienen regiones que les permite asociarse a las membranas. Dentro de las funciones más importantes de la PKC están las que modulan a los receptores de membrana plasmática, ie. receptores acoplados a proteínas Gq o receptores con actividad de tirosina cinasa que son componentes del mecanismo de transducción de señales. Entre los diversos procesos celulares en los que participa la PCK pueden mencionarse: la secreción de insulina y calcitonina, la liberación de neurotransmisores, la síntesis de ADN y la regulación de la expresión de ciertos genes como el que codifica para γ -interferón.

Modelo de regulación por Ca^{2+} de las PKC convencionales. Las PKC convencionales, sensibles a Ca^{2+} con una Kd de 700 nM para la proteína asociada a la membrana (17), contienen un dominio auto-inhibitorio, conocido también como el pseudo-sustrato, en el extremo N de la proteí-

na. También en esta región N se encuentran los dominios denominados C1 y C2 donde se encuentran los sitios de unión de diacilglicerol/ésteres de forbol y fosfolípidos ácidos/Ca²⁺, respectivamente. En estado basal la PKC (Fig. 4B) se encuentra inactiva por tener el sitio activo ocupado por el pseudo sustrato. La movilización del pseudo sustrato se da cuando el diacilglicerol y la fosfatidil serina se unen a los sitios C1 y C2, pues modifican la estructura de éste. La acción del Ca²⁺ es sinérgica con la del diacilglicerol para permitir la acción activadora de la fosfatidil serina (18).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Ha quedado establecido el papel del Ca²⁺ como un segundo mensajero en prácticamente las formas de vida eucariotes. De igual manera, a medida que se avanza en el estudio de las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺, en general, corroboramos lo extendidas que están entre los diversos organismos. Las manos-EF como regiones de interacción con Ca²⁺ se encuentran en todas los dominios reguladores de las diferentes proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺ estudiadas. El conocimiento más íntimo de

la forma en que son activadas y reguladas estas enzimas permitirán saber si estos dominios fueron los primeros que surgieron en la naturaleza para unir al Ca²⁺ y así modular la actividad. De ser así, algunos de ellos perdieron su función (CRK) o se separaron a proteínas reguladoras independientes (CaMK). Esto nos indicaría un posible origen monofilético.

Agradecimientos. Este trabajo se realizó con apoyo parcial del donativo IN218303, DGAPA, UNAM.

REFERENCIAS

1. Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biol* 4: E127-E130.
2. Metzler D E (2001) *Biochemistry*. Academic Press. San Diego, CA, USA pp. 541-545.
3. Hanks S K y Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576-596.
4. Hrabak E M, Chan C W M, Gribskov M, Harper J F, Choi J H, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo H G, Sussman M R, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu J-K y Harmon A C (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 132: 666-680.
5. Harper J F, Binder B M y Sussman M R (1993) Calcium and lipid regulation of *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33: 7278-7287.
6. Farmer P K y Choi J H (1999) Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.). *Biochim et Biophys A* 1434: 6-17.
7. Nelson M R y Chazin W J (1998) Structures of EF-hand Ca²⁺-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *BioMetals* 11: 297-318.
8. Lindzen E y Choi J H (1995) A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol Biol* 28: 785-797.
9. Means A R (2000) Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol* 1: 4-13.
10. Herring P B, Stull J T y Gallagher P J (1990) Domain characterization of rabbit skeletal muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 265: 1724-1730.
11. Sun P, Lou L, y Maurer R A (1996) Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J Biol Chem* 271: 3066-3073.
12. Patil S, Takezawa D y Poovaiah B W (1995) Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein-kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4897-4901.

- 13.** Burgoyne R D y Weiss J L (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J* 353: 1-12.
- 14.** Hua W, Liang S y Lu Y (2003) A tobacco (*Nicotiana tabaccum*) calmodulin-binding protein kinase, NtCBK2, is regulated differentially by calmodulin isoforms. *Biochem J* 376: 291-302.
- 15.** Newton A C (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370: 361-371.
- 16.** Parker P J y Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117: 131-132.
- 17.** Mosior M y Epan R M (1994) Characterization of the calcium-binding site that regulates association of protein kinase C with phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 269: 13798-13805.
- 18.** Newton A C (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Biol* 9: 161-167.