

## ADENDUM TEMA 1 “RUTA FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASA”

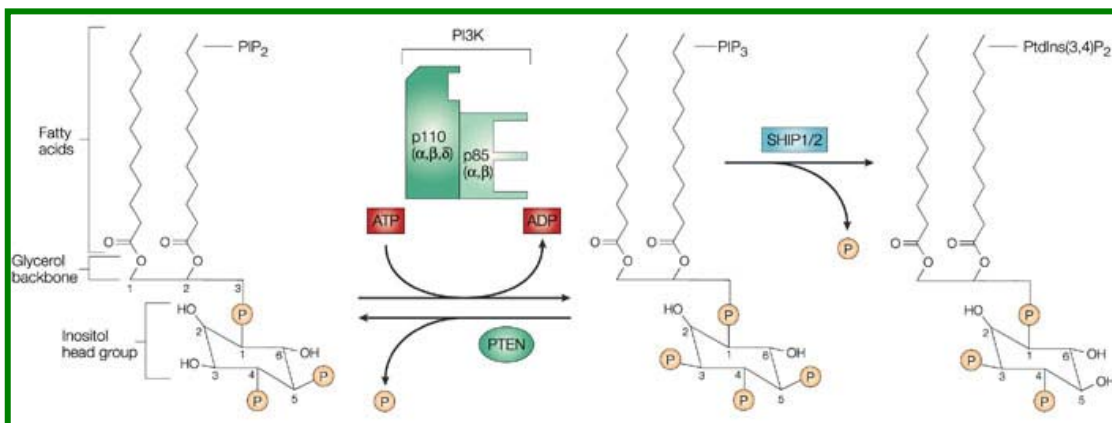
### 1.6.2.2 Ruta de la Fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)

Además de la ruta de las MAPK, descrita anteriormente, otra de las rutas que activan los receptores con actividad catalítica tirosina quinasa (RTK) es la ruta de la **fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)**. Ambas rutas comparten otra característica común, que es el que pueden ser también estimuladas por receptores acoplados a proteínas G.

La ruta de la PI3K representa una vía, diferente entonces a la de las MAPKs, que es activada por receptores con actividad catalítica TK de insulina y factores de crecimiento y de otras señales que activan receptores acoplados a p.G, así como por receptores de citoquinas con efectos en la regulación transcripcional implicadas en la proliferación celular. Aunque, puede ser distinta totalmente a la ruta de la MAPK, puede también interactuar con ella a nivel de ras.

**PI3K:** La PI3K cataliza la fosforilación de los fosfatidilinositoles, principalmente del PtdIns 4,5 P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>), para dar como producto el PI 3,4,5 P<sub>2</sub> (PIP<sub>3</sub>) que es el segundo mensajero de esta ruta. Las enzimas de la Clase I fosforilan en 3 el PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub>, mientras que las de la clase II fosforilan el PI 4 P convirtiéndolo en PI(3,4)P<sub>2</sub>. Dentro de la clase I existen dos subgrupos, el IA que transmite señales a partir de receptores con actividad catalítica tirosina quinasa y el IB que lo hace a partir de receptores acoplados a p.G.

La PI3K es una enzima con 2 subunidades: una **reguladora** denominada **p85** y otra **catalítica** denominada **p110**. Como se muestra en la **Figura 1** la PI3K puede fosforilar el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) en la posición D3 para formar el segundo mensajero PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>). La fosforilación en el sitio D3 es necesaria para su unión al dominio de homología con pleckstrina (PH) de AKT (no mostrado). La desfosforilación de PIP<sub>3</sub> para regenerar PIP<sub>2</sub> se lleva a cabo por la 3-fosfatasa PTEN. Adicionalmente, el PIP<sub>3</sub> puede ser desfosforilado en posición D5 por SHIP1 o SHIP2 para generar PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, otro segundo mensajero potencial.



**Figura 1: El ciclo PI (4,5) P<sub>2</sub>-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>**

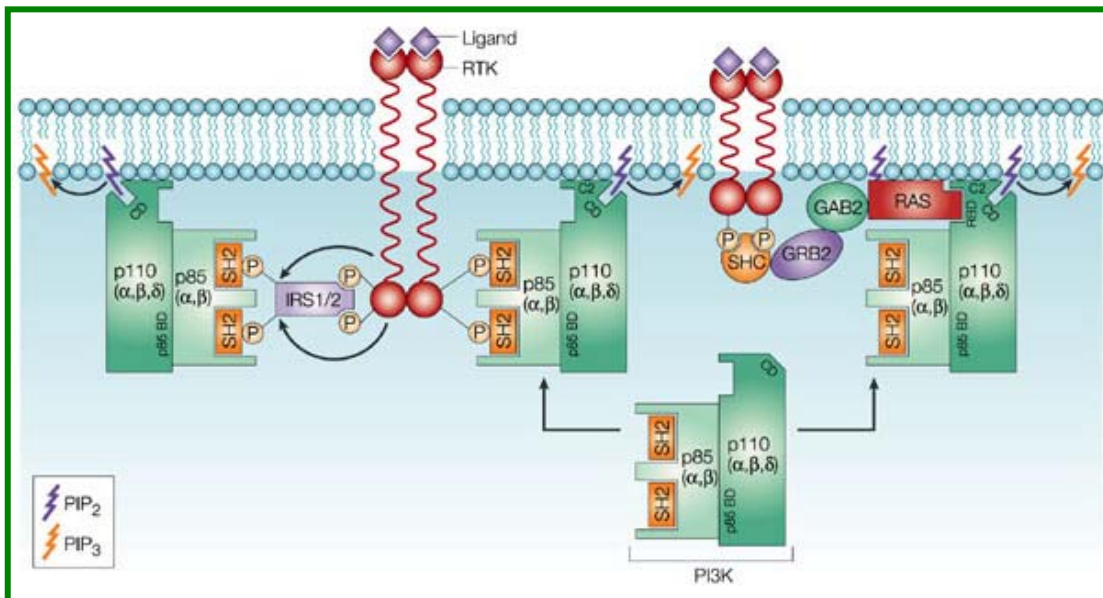
Los fosfatidil-inositoles fosfato están compuestos por un grupo ácido fosfatídico asociado a membrana y una mitad de glicerol que está unido a un grupo cabeza de inositol fosforilado. La fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) puede fosforilar el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) en la posición D3

para formar el segundo mensajero  $PtdIns(3,4,5)P_3$  ( $PIP_3$ ). La fosforilación en el sitio D3 es necesaria para su unión al dominio de homología con pleckstrina (PH) de AKT (no mostrado). La desfosforilación de  $PIP_3$  para regenerar  $PIP_2$  se lleva a cabo por la 3-fosfatasa PTEN.

### Activación de la PI3K por receptores

La activación de la PI3K por los receptores con actividad TK se puede hacer de 3 modos diferentes (**Figura 2**):

- 1) Por interacción directa de los sitios fosfotirosina (Y-P) del receptor con los dominios SH2 de la subunidad reguladora p85 de la PI3K
- 2) Por interacción de los residuos Y-P con proteínas adaptadoras como IRS 1 o 2 (caso del receptor de insulina).
- 3) Mediante interacción de los residuos Y-P del receptor con SHC-Grb2-Ras, que activa directamente la p110 o subunidad catalítica de la PI3K.

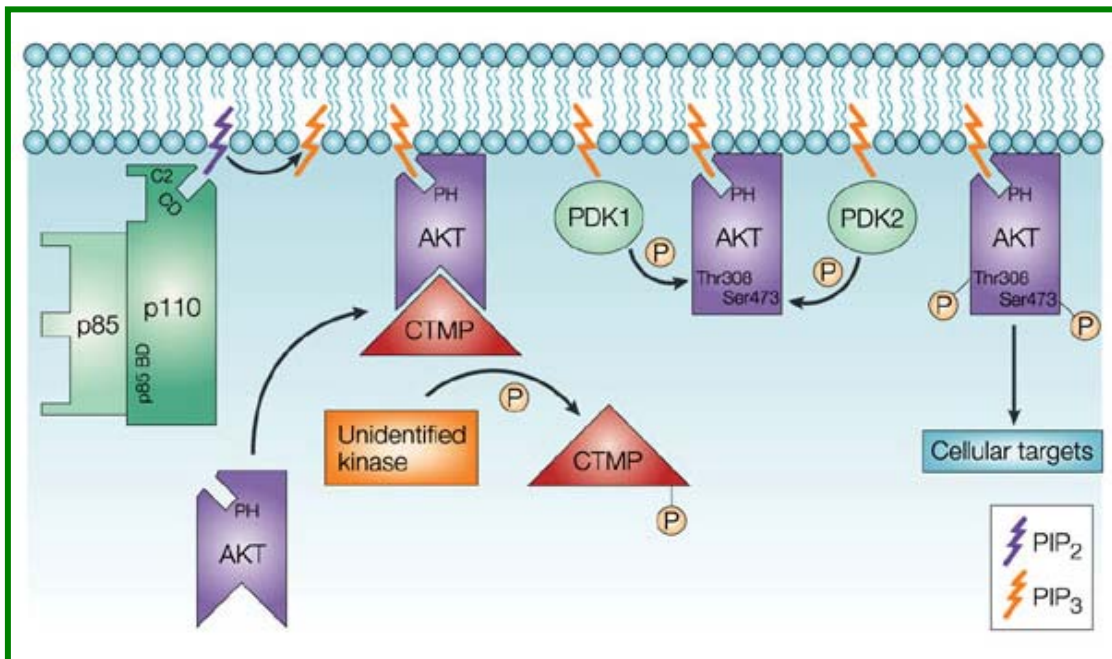


**Figura 2: Modelo de activación de PI3K.**

La autofosforilación de RTKs activados por ligandos produce un reclutamiento de PI3Ks heterodiméricas inactivas de la clase IA a través de la interacción de residuos fosfotirosina (Y-P) y los dominios SH2 de la p85 reguladora de la PI3K, o de proteínas adaptadoras IRS1 e IRS2. IRS1 y IRS2 son fosforiladas por el receptor activado, generando sitios de interacción con proteínas con dominios SH2 de la p85 e induciendo el ensamblaje apropiado del complejo de señalización. Estas interacciones Y-P/SH2 ponen a la PI3K en proximidad cercana a su sustrato en la membrana plasmática y bloquean la acción inhibitoria de p85 sobre la subunidad catalítica de PI3K p110, que está así libre para convertir el  $PtdIns(4,5)P_2$  ( $PIP_2$ ) en  $PtdIns(3,4,5)P_3$  ( $PIP_3$ ). Alternativamente, la unión de PI3K a Ras activado puede también estabilizar su localización en la membrana y activar el dominio catalítico. Esto ocurre mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras SHC, GRB2 y GAB2 a RTKs activadas. C2= dominio C2; CD = dominio catalítico; p85 BD = dominio de unión a p85; RBD = dominio de unión a RAS.

### Función de PI(3,4,5)P3 como segundo mensajero: Activación de PKB/AKT

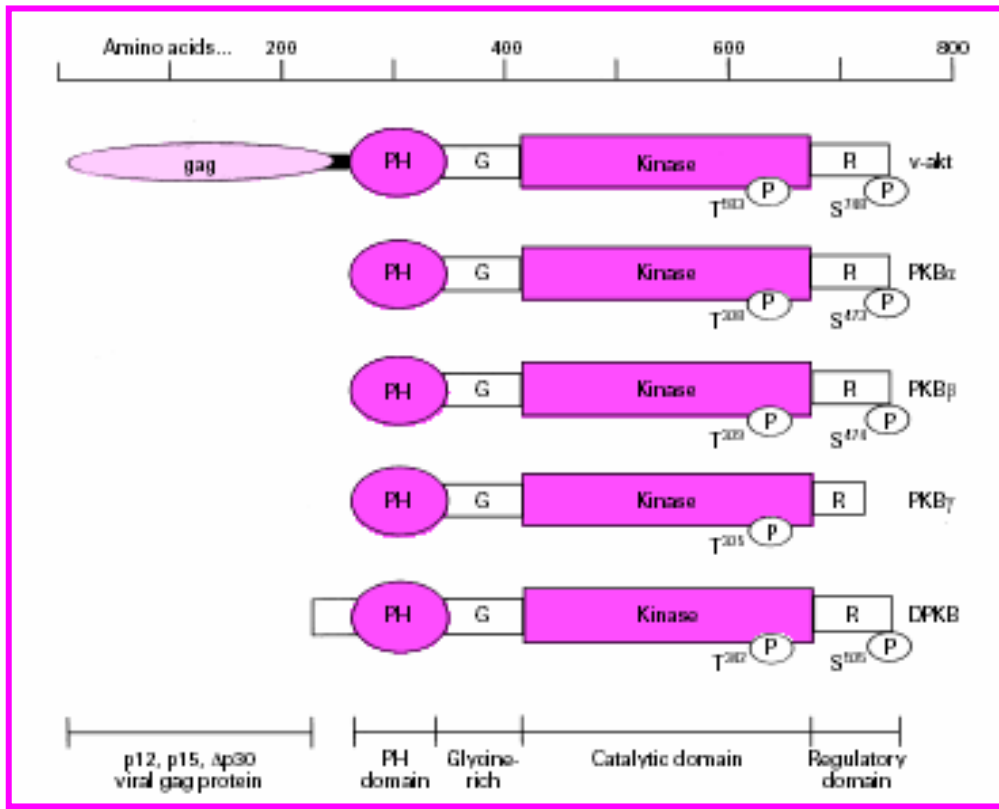
La función de los fosfolípidos como mensajeros consiste siempre en permitir el anclaje de proteínas enzimáticas (quinasas) normalmente citosólicas a la membrana plasmática, con el fin de que estas puedan interactuar con sus sustratos y fosforilarlos. Así, PIP3 va a reclutar a la membrana plasmática a tres serina treonina quinasas citosólicas (PDK1, PDK2 y PKB o AKT), a través de su interacción con dominios de homología con pleckstrina (PH) de estas proteínas (**Figura 3**). PDK1 y PDK2 son serina treonina quinasas dependientes de fosfolípidos que van a fosforilar ya en la membrana plasmática a otra serina treonina quinasa denominada **PKB o AKT**. La fosforilación de la AKT en los aminoácidos Thr308 y Ser473 por PDK1 y PDK2, respectivamente, activa PKB que se encuentra como trímero inactivo, permitiendo la autofosforilación de la misma en otros residuos aminoacídicos y la formación de un complejo de PKB activo e independiente de fosfolípidos que puede ya dissociarse de la membrana plasmática y viajar al citosol, al núcleo o a otros orgánulos para fosforilar proteínas.



**Figura 3: Regulación de la actividad AKT.** La activación de AKT se inicia por translocación a la membrana, lo que ocurre tras la estimulación celular y producción de PtdIns(3,4,5)P3 (PIP3). La localización de AKT en la membrana plasmática se lleva a cabo mediante una interacción entre dominios de homología con pleckstrina (PH) y PIP3. La asociación de AKT en la membrana con la proteína moduladora carboxi terminal (CTMP) impide que AKT pueda ser fosforilada y activa. La fosforilación de CTMP por una quinasa no identificada libera CTMP de AKT y permite a AKT ser fosforilada por dos quinasas dependientes de fosfolípidos PDK1 y PDK2 en los residuos Thr308 y Ser473, respectivamente. La fosforilación de estos dos residuos produce activación completa de AKT. C2 = dominio C2; CD = dominio catalítico; p85 BD = dominio de unión de p85.

## Estructura de la PKB

Al igual que otras Ser-Tre quinasas la PKB consta de una sola cadena polipeptídica, con los dominios catalítico (quinasa), regulador (por 3 fosfatidilinositoles), dominio rico en glicina (G) y de homología con pleckstrina (PH) que la permiten su interacción con PI3P (**Figura 4**).



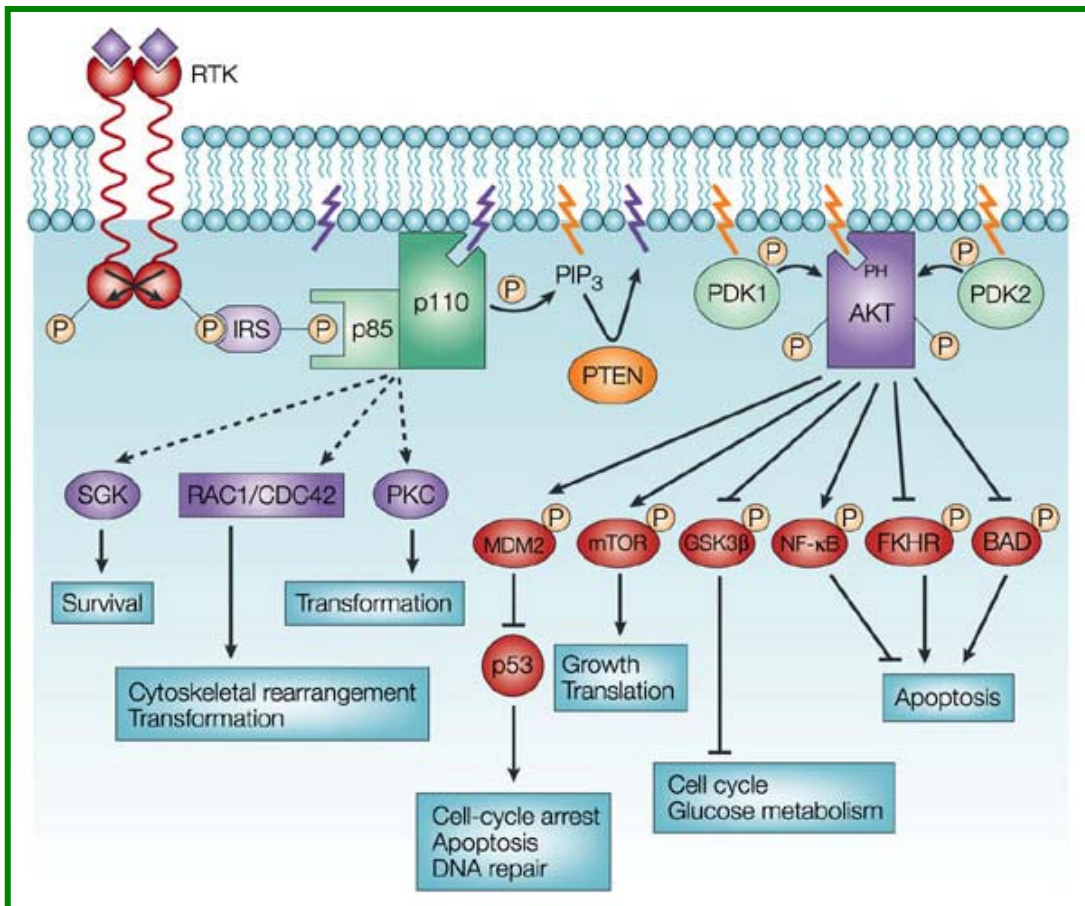
### **Figura 4: Representación esquemática de la estructura de la PKB**

Se indican la estructura en dominios y el tamaño de v-Akt, isoformas de PKB ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y PKB de *Drosophila* (DPKB). v-Akt consiste en la fusión de PKB con la tripartita viral gag protein (pink) y es miostoilada, alcanzándola en la membrana. El extremo N-terminal de PKB contiene un dominio de homología con pleckstrina ('PH') y una región rica en glicina ('G'). El extremo C terminal tiene un papel regulador ('R') y muestra similitud con las isoformas de PKC. Se indican las posiciones de los sitios de fosforilación activadores en todas las isoformas de PKB. Debe notarse que la PKB $\gamma$  carece de la mayoría de los residuos de Ser C-terminales fosforilables, por lo que son formas truncadas.

## Señalización por PI3K

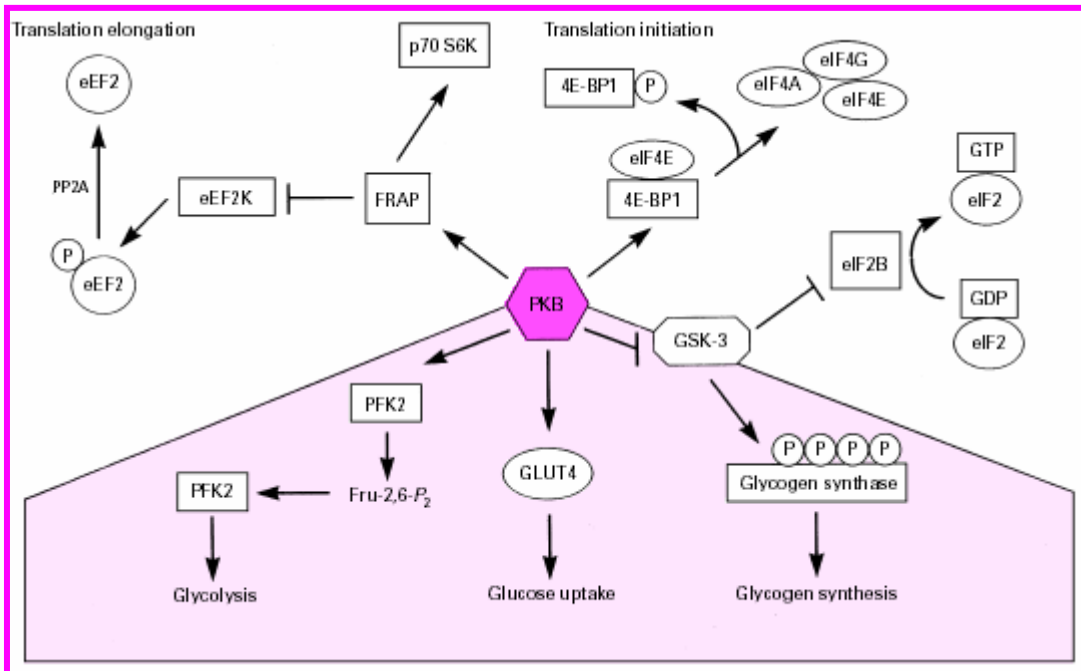
A través de PKB/AKT, la PI3K regula numerosas funciones fisiológicas, como la supervivencia y proliferación celular, la reorganización del citoesqueleto, la apoptosis y el metabolismo de la glucosa entre otras. En la **Figura 5**, se recogen algunas de estas funciones y los mecanismos de señalización implicados en las mismas.





**Figura 5: Señalización por PI3K: el gran abanico.** La activación de la clase IA de PI3Ks ocurre a través de la estimulación de RTKs y el concomitante ensamblaje del complejo receptor-PI3K. Estos complejos se localizan en la membrana, mientras que la subunidad catalítica p110 de la PI3K cataliza la conversión de  $PtdIns(4,5)P_2$  (PIP2) a  $PtdIns(3,4,5)P_3$  (PIP3). PIP3 es un segundo mensajero que ayuda a activar AKT. Mediante fosforilación AKT media la activación e inhibición de muchas proteínas diana implicadas en la regulación del crecimiento celular, supervivencia y proliferación a través de varios mecanismos. Además, se ha visto que PI3K regula la actividad de otras dianas celulares como el suero y la quinasa inducible por glucocorticoides (SGK), las proteínas G pequeñas RAC1 y CDC42, y la PKC, de una forma independiente de AKT a través de mecanismos mal caracterizados. La actividad de estas dianas conduce a la supervivencia, reorganización del citoesqueleto, y transformación. GSK3 = glucógeno sintasa quinasa 3 ; NF- $\kappa$ B, factor nuclear  $\kappa$ B; PDK1/2 = proteínas quinasas dependientes de 3 fosfoinosítidos 1 y 2..

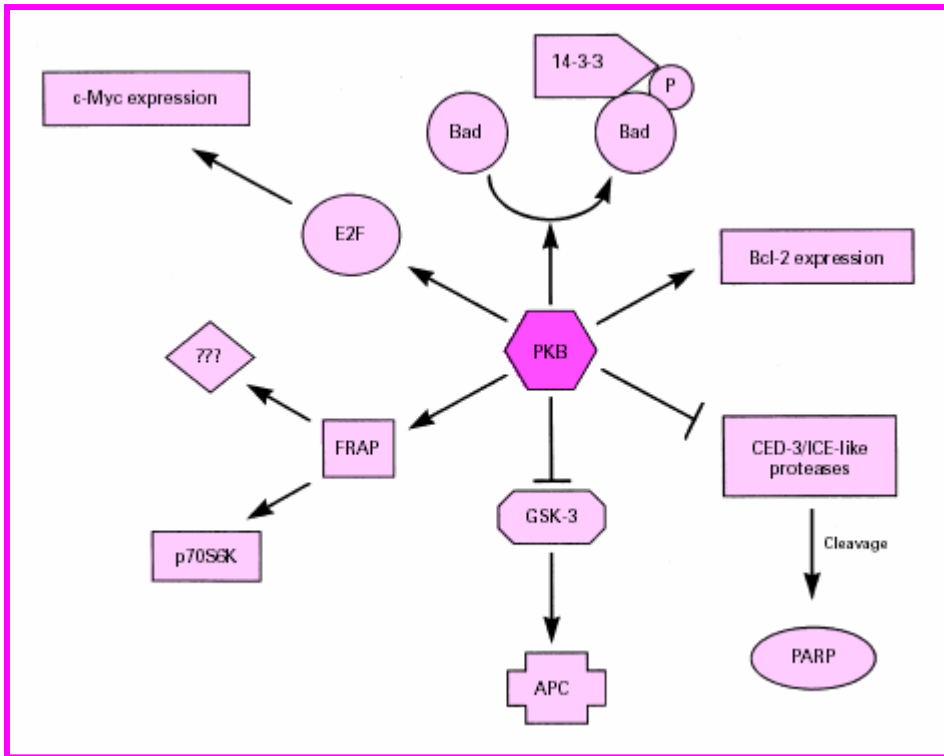
Como ejemplo de funciones metabólicas reguladas por la ruta de PI3K/PKB podemos citar la en el caso de la insulina la activación de la síntesis de glucógeno (fosforilación inactivante de la GSK3 por PKB que de esta forma no puede fosforilar la GS), la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática para activar el transporte de glucosa a los tejidos extrahepáticos (muscular y adiposo) y la activación de PFK1, y así de la glucólisis, así como la activación de la síntesis de proteínas por esta hormona **(Figura 6).**



**Figura 6: Funciones metabólicas reguladas por PKB**

Las funciones metabólicas de PKB (rojo) pueden dividirse en aquellas que regulan la síntesis de proteínas y las que regulan la glucogenólisis (rosa). Mientras que un papel para PKB se ha implicado en muchos de estos procesos, una ligazón directa entre ellos requiere futura confirmación. Síntesis de proteínas: La fosforilación de 4E-BP1 (PHAS-I) por PKB conduce a su disociación de eIF-4E, dando lugar a la formación de un complejo eIF4F y a un incremento en la iniciación de la traducción. La activación de p70S6K por PKB puede también conducir a un incremento en la traducción de una clase de mRNAs específicas, mientras que la inhibición en la actividad de GSK-3 produce la desfosforilación y activación de eIF2B, conduciendo a un incremento en la iniciación de la síntesis de la cadena peptídica. La inhibición de la fosforilación de eEF2 por rapamicina resulta en la activación de la elongación de todas las cadenas peptídicas. Metabolismo de la glucosa: La fosforilación de PFK2 mediada por PKB resulta en la producción de fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) y en la activación de la glucólisis, mientras que la inhibición de GSK-3 resulta en un incremento en la síntesis de glucógeno mediante la regulación de la fosforilación de la glucógeno sintasa. Además, la activación de PKB puede mediar el transporte de glucosa vía translocación de transportadores GLUT4 a la superficie celular.

Entre los mecanismos que median el efecto antiapoptótico de esta ruta de señalización destacan: el incremento en la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica, la fosforilación de Bad que hace que de esta forma no pueda interactuar con Bcl-XL y no pueda formar el heterodímero que se requiere para activar la apoptosis y la inhibición de las caspasas (Figura 7).



**Figura 7: Señalización anti-apoptótica mediada por PKB**

La regulación de la muerte celular programada es crítica en el control del desarrollo y la homeostasis de organismos pluricelulares. La PKB (rojo) ha sido recientemente implicada como componente crítico de la señalización antiapoptótica a través de la sobreexpresión de varios constructos mutantes. La fosforilación de Bad directamente por PKB resulta en la disociación de Bcl-2 y la asociación con proteínas 14-3-3. La expresión de la PKB catalíticamente activa en mutantes promueve la expresión de Bcl-2 y c-Myc, posiblemente a través de la mejora de la transactivación de E2F. La inhibición de las proteasas similares a ICE (caspasas) también resulta en la protección celular. La inhibición de GSK-3 por PKB regula la adenomatous polyposis coli y  $\beta$ -catenina, la cual modula la adhesión, proporcionando una ligazón potencial con anoikis. Abreviaturas: APC, adenomatous polyposis coli.

**Activación de la ruta de PI3K por señales acopladas a receptores acoplados a proteínas G**

La activación de esta ruta por receptores acoplados a p.G se produce bien a nivel de activación de Ras, mediada por las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteína G heterotriméricas, que son capaces de activar a ras, reclutándolo a la membrana o bien a nivel de Raf-1, que es activada por algunas isoformas de PKC como la PKC $\alpha$  en receptores acoplados a la activación de PLC.

**Bibliografía:**

Vivanco I. and Sawyers C.L. (2002) *The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. Nature Reviews* 2:489-501.

Coffer P.J. and Woodgett J.R. (1998) *Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem. J.* 335: 1-13.