

INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**LA ESPECIFICIDAD EN LAS VÍAS DE COMUNICACIÓN CELULAR**



DISCURSO DEL

**EXCELENTÍSIMO SEÑOR DON JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN**

LEIDO EN LA SESION DEL DIA 24 DE ENERO DE 2008

PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DE LA

**EXCELENTÍSIMA SEÑORA DOÑA MARÍA CASCALES ANGOSTO**

**24 de Enero de 2008**

Depósito legal: SA-6-2008

Imprime: Ediciones TGD  
Avda. de Los Castros s/n (Edificio Interfacultativo)  
39005 Santander (Cantabria)  
Tel. 942 20 11 08  
[tgdt@ono.com](mailto:tgdt@ono.com)

## INDICE

	Págs.
Abreviaturas.....	5
Introducción.....	7
<b>LA ESPECIFICIDAD EN LAS VÍAS DE COMUNICACIÓN</b>	
<b>CELULAR: Antecedentes.....</b>	<b>11</b>
Moléculas de la comunicación celular.....	14
La fosforilación de proteínas.....	15
La fosforilación en tirosina y los oncogenes virales.....	19
Dominios de interacción conservados regulan la transferencia de información.....	22
Las vías de señalización se construyen por interacciones proteína-proteína reiteradas.....	26
La aparición de nuevos dominios constituye una base para la rápida evolución de nuevas rutas de señalización.....	28
Los microorganismos patógenos modifican las vías de señalización.....	29
Segregación espacial en vías de señalización.....	31
El retorno al estado basal: proteína fosfatasas.....	38
La inhibición de quinasas y de fosfatasas y nuevos fármacos.....	44
Las interacciones entre dominios y la fosforilación reversible pueden explicar procesos complejos.....	52
Afinidad y especificidad.....	54
El Futuro: Redes y Sistemas.....	55
Epílogo.....	57
Bibliografía.....	59
Discurso de Contestación.....	69

## Abreviaturas

GTP	Guanosina tri fosfato
ATP	Adenosina tri fosfato
MAPKK	<i>Mitogen activated kinase kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated kinase</i>
DNA	Acido Desoxiribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
KD	Kilodalton
SH2	Dominio 2 de homologia con Src
P-tirosina	Fosfo tirosina
C-terminal	Carboxilo terminal
P-tir	Fosfo tirosina
Asn	Asparragina
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos
PIP3	Fosfatidil inositol 3 fosfato
N-WASP	Proteína del síndrome Wiscott-Aldrich
CML	Leucemia mieloide crónica
P-monoester	Monoester fosfato
PP1	Proteína fosfatasa 1
3D	Tres dimensiones
SIPP1	<i>Splicing and PP1 interactor</i>
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
Rb	Retinoblastoma
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
SLE	<i>Systemic Lupus eritomatosus</i>
NFAT	<i>Nuclear factor for activated T cells</i>
IL	Interleuquina
FKBP	<i>FK506 binding protein</i>
PP2B	Proteína fosfatasa 2B
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
LPS	Lipopolisacárido
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>

eIF2B	<i>eucaryotic initiation factor 2B</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
APC	<i>Adenomatous poliposis coli</i>
Km	Constante de Michaelis
AKAP	<i>PKA anchoring protein</i>
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
C.elegans	<i>Cenorabditis elegans</i>
S.cerevisiae	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
S.pombe	<i>Schizosacharomyces pombe</i>

## **Introducción**

*Excelentísima. Señora Presidenta  
Excelentísimos Señoras y Señores Académicos  
Señoras y Señores*

Como farmacéutico y como Profesor de Universidad es un honor singular el ser elegido académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Quiero por ello en primer lugar, expresar mi agradecimiento, a los miembros de esta Real Academia, que me han considerado digno de ocupar un sillón, junto a ellos, en esta prestigiosa Institución. Recordando lo que decía en una ocasión mi ilustre paisano y gran poeta español Gerardo Diego, yo tendría que decir que mas que un “sillón de honor” siento que vengo a ocupar un “sillón de amor”, porque estoy convencido, que ha sido el amor (de maestros, de profesores, de colegas, de amigos) y no mis escasos méritos, lo que ha pesado más, a la hora de abrirme las puertas de esta Real Academia. Y amor también por mi parte, porque así puede calificarse la satisfacción que siento al entrar a formar parte, de este selecto grupo de personalidades que han destacado en diferentes campos de las Ciencias Farmacéuticas.

Mi gratitud se extiende en primer lugar hacia los Excmos. Srs. D. Antonio Doadrio López, D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo y D. Antonio Martínez Fernández, miembros de esta Real Academia, que han propuesto con su firma mi candidatura. Empaña mi satisfacción, el que Don Antonio Doadrio, se encuentre en situación delicada de salud, y no pueda acompañarnos hoy. Quiero expresar mi agradecimiento a Jose Antonio Cabezas, amigo, y por así decirlo, hermano mayor en la escuela de D. Ángel, y a D. Antonio Martínez también amigo, y compañero de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, mi primer destino como catedrático.

Por vuestra elección, voy a ocupar la vacante producida, por el fallecimiento de Don Ángel Santos Ruiz. Ocupar esta vacante, supone para mi un reto demasiado difícil, y una gran responsabilidad, que acepto con inmenso reconocimiento a la figura de Don Ángel. Don Ángel Santos Ruiz, fue la persona que me abrió las puertas a la Bioquímica y me ayudó a alcanzar mi pasión de ser profesor universitario. El fue, como

yo, originario de Cantabria, y ambos tuvimos que salir de nuestra querida tierra, para seguir nuestra vocación. Como dice el gran poeta francés André Gide “No se descubren lejanas tierras sin haber perdido de vista y durante mucho tiempo la orilla”.

Don Ángel fue Doctor en Farmacia y en Medicina. Se inició en la investigación con el Profesor Gregorio Marañón. Trabajó con Sir Jack Drummond, prestigioso investigador inglés, en el campo de las vitaminas y fue el primer catedrático de Bioquímica y uno de los impulsores principales del desarrollo de la Bioquímica en España.

D. Ángel dedicó sus primeros trabajos a la bioquímica del glutatión. Posteriormente, con la ayuda de distintos colaboradores fue cultivando diversas parcelas que el desarrollo de la Bioquímica, iba señalando como campos de interés, como la Bioquímica de los oligoelementos, la Bioquímica de la germinación de las semillas, los enzimas descarboxilantes o la Bioquímica de las hepatopatías experimentales. En todos ellos, su labor quedó plasmada en numerosas e interesantes contribuciones.

En la Facultad de Farmacia, y en la Universidad Complutense de Madrid, sus 42 años de Catedrático y 15 de Decano, dejaron una profunda huella. Con la creación de un moderno Departamento universitario, supo atraer hacia él a algunos de los mejores alumnos, y proporcionó a la Facultad de Farmacia y a la Universidad Complutense una dimensión científica importante. Su obra “Tratado de Bioquímica”, escrita en colaboración con dos de sus primeros discípulos, Vicente Villar Palasí y José Antonio Cabezas, fue la fuente, en la que generaciones de estudiantes, nos asomamos por primera vez a aquella nueva Ciencia. Su labor como canalizador de vocaciones investigadoras fue colosal. Las más de cien tesis doctorales realizadas en el departamento de Bioquímica avalan esta labor extraordinaria.

Don Ángel, fue también Director de esta Real Academia durante más de 15 años. Durante este tiempo, y durante todo el tiempo que permaneció como Académico de Número, Don Ángel fomentó las relaciones internacionales, los cursos de doctorado, las visitas de científicos, el acondicionamiento de las instalaciones y en fin, participó

con asiduidad, en todo tipo de sesiones y discursos, con la pulcritud y sabiduría que ponía en todas sus acciones.

Don Ángel Santos-Ruiz formó y pasó la antorcha a muchos discípulos, algunos de ellos catedráticos de Bioquímica, y entre ellos verdaderas personalidades, como el ilustre miembro de esta Real Academia D. Federico Mayor Zaragoza.

Conocí a Don Ángel, como estudiante de Farmacia, pero sobre todo, siendo estudiante de Doctorado en el Departamento de Bioquímica. Siempre demostró interés por la marcha de mi trabajo, y los progresos realizados. Con ocasión de la asistencia a un Congreso Internacional, tuve ocasión de iniciar con él una relación más próxima, que fue siempre en aumento a partir de aquel momento. Se preocupó de que alcanzara no solo la madurez científica, sino también, la madurez en toda la dimensión de mi persona. Me ayudó a ir recorriendo etapas para llegar a científico y profesor universitario, unas veces con su consejo, y otras con su silencio. Me mostró su orgullo al pasar a formar parte de su gran familia de discípulos-catedráticos y me transmitió su valiosa experiencia.

Deseo también extender mi gratitud hacia su familia, en especial a su esposa Carmen y a su hijos, en particular, a su hija Mamen, compañera de estudios, que siempre me acogieron con simpatía.

Quisiera ahora, en esta solemne ocasión, hacer mención expresa de algunas personas que más han contribuido a mi formación científica y en definitiva a que haya podido llegar aquí.

Considero a Doña María Cascales Angosto mi primera maestra. La estoy muy agradecido. Dirigió mi Tesis Doctoral, me introdujo en la investigación y hoy a va a pronunciar en nombre de la Academia la contestación a mi discurso.

En segundo lugar, considero al Profesor Julio Rodríguez-Villanueva otro de mis maestros. Aun sin pertenecer al grupo de sus discípulos directos, me acogió como tal. Después me ayudó a llevar a cabo mi primera estancia posdoctoral en Bristol, con su amigo y compañero Mark H. Richmond profesor de aquella Universidad. Mas



tarde, me comunicó su entusiasmo por la Universidad y su valiosa experiencia como Rector.

En tercer lugar considero a Sir Mark H. Richmond como a un verdadero maestro, que me introdujo en la Biología molecular, y me indujo a comprometerme definitivamente con ella.

Y tras el agradecimiento a mis maestros quiero testimoniar mi agradecimiento a mis colaboradores y discípulos, que no solo colaboraron conmigo eficazmente, sino que contribuyeron a mi mejoramiento como investigador, y entre los que cabe destacar a Isabel de Andrés, Fernando de la Cruz, Juan M. García Lobo, Javier León, José Carlos Rodríguez Rey, Juan Carlos Zabala, Manuel González-Carreró y Ana Eguiraun.

Por último quiero también agradecer a mi familia. A mis padres, a quienes debo cuanto soy, que hicieron posible, que pudiera seguir mi vocación, y en especial a mi esposa Mariluz y a mis tres hijos, por haber aceptado mi pasión por esta actividad, pues la Universidad y la investigación son también una actividad pasional.

Quiero terminar este prólogo con dos palabras sobre el tema y el plan de este discurso. Como farmacéutico y como biólogo molecular decidí abordar la tarea de presentar una visión de la Comunicación celular y de las vías de señalización. Hace algunos años, con ocasión de un acto en la Facultad de Farmacia de Madrid, Sir Richard Sykes, antiguo colega mío en Bristol, y entonces presidente de una importante empresa farmacéutica, señalaba en una conferencia, la importancia que para la industria farmacéutica tenía poder identificar nuevas dianas celulares. Muchas de ellas, están relacionadas con las vías de señalización, y su consideración, implica, entre otras cosas, el problema de la especificidad. Pues bien, yo quiero responder a este reto, hablando de la especificidad en las vías de comunicación celular, tratando de señalar, cómo el diseño de nuevos medicamentos esta muy ligado a este proceso.

# LA ESPECIFICIDAD EN LAS VÍAS DE COMUNICACIÓN CELULAR

## Antecedentes

Para un observador extraño, por ejemplo para un extraterrestre, que procedente de otro planeta aterrizara con su nave sobre el nuestro, probablemente a medida que acercara a la Tierra, quedaría sorprendido por la profusión de ríos, que a modo de vías de comunicación, recorren la superficie de nuestro planeta. A punto de aterrizar, seguramente quedaría también impresionado, por las redes de autopistas y carreteras que comunican entre si los núcleos urbanos y alrededores de cualquier aeropuerto. Tras haber aterrizado, quedaría sorprendido entre otras cosas por nosotros, por los seres humanos. Y una de la características de los seres humanos que posiblemente más le sorprendiera tal vez fuera, nuestra capacidad para la comunicación, así como también nuestra capacidad para adaptarnos a diferentes condiciones y situaciones ambientales.

Si este presunto observador descendiera ahora a nivel de nuestro organismo, resultaría asimismo sorprendido, por cómo el conjunto de órganos y tejidos que forman el cuerpo humano, están comunicados a través de canales y vías, que constituyen las arterias y las venas, las prolongaciones nerviosas, etc.

Si descendiera a nivel celular, quedaría todavía mas sorprendido, por cómo éstas han elaborado, una verdadera red de comunicaciones que permiten a las estructuras subcelulares y a las moléculas, entrar en contacto y responder coordinadamente a las diferentes señales que llegan desde el exterior.

Los científicos han denominado a estos canales virtuales, vías o rutas de señalización, y estas rutas desempeñan en las células, papeles tan importantes como el de recibir y procesar señales hormonales, señales que regulan el crecimiento celular, la supervivencia o incluso la propia muerte celular.

Ni siquiera la consecución de objetivos científicos tan importantes como la secuenciación del genoma humano y otros genomas, ha restado

interés, al objetivo de tratar de entender cómo funcionan estas redes de comunicación celular, como trabajan, cómo están controladas.

Sidney Brenner, uno de los padres de la Biología Molecular, con ocasión del discurso de recepción del Premio Nóbel de Fisiología y Medicina de 2002, decía a este respecto lo siguiente: “Las Ciencias biológicas han experimentado un desarrollo sin precedentes en los últimos años, a través de nuestra capacidad de acumular datos descriptivos, pero ahora necesitamos convertir datos en conocimiento, y para ello, necesitamos esquemas generales. Tan “genocéntrica” se ha hecho la biología moderna que hemos olvidado que las unidades reales son las células y no los genes. Y añadía “Me gustaría proponer dos ideas que pienso van a constituir un reto de futuro. Y una de ellas es construir lo que yo llamaría un Mapa Celular” (1).

La célula pues, es la unidad básica de la vida, y es por lo tanto importante, considerar los principios y mecanismos por los cuales las células se comunican y responden a estímulos internos y externos.

Si bien podríamos entender inicialmente, que el descubrimiento de estos procesos, es un tema de pura curiosidad científica, a medida que se han ido conociendo aspectos parciales, se ha ido convirtiendo también en una tarea urgente, debido a que sabemos que defectos en los sistemas de comunicación pueden dar lugar a enfermedades. Por tanto, entre las implicaciones de estos nuevos conocimientos, va a estar, el de poder llegar a corregir las anomalías que se presentan mediante el descubrimiento de nuevos fármacos.

La necesidad de un esquema general, a la hora de abordar un fenómeno tan complejo, como decía Sydney Brenner, es algo característico de la manera de abordar los problemas en Biología Molecular, para lo que cuenta ya, en su corta historia, con notables precedentes.

A mediados del siglo pasado, en pleno auge de la Química y de la Bioquímica, la cuestión más importante entonces, la cuestión de cómo la información genética se almacenaba en la célula, puede decirse que apenas era considerada, no estaba en la agenda, como diríamos actualmente. Esto era debido, entre otras cosas, a la falta de un esquema

general. ¿Cómo un heteropolímero, de solo cuatro monómeros diferentes, podía explicar la elevada especificidad de los genes?. Fue precisamente un físico, Erwin Schrödinger, quien proporcionó la primera clave para resolver este enigma, cuando en unas líneas de su famoso libro *What is life?*, sugirió, que el código genético podía ser similar al código Morse, usado ya entonces, frecuentemente, por los telegrafistas (2). Su idea, casi pasó desapercibida, y fue redescubierta varios años después, cuando los magnetofones, los aparatos utilizados para grabar y escuchar voces, se empezaron a popularizar. De repente, la propuesta de Schrödinger de que la información podía estar representada por una secuencia específica, lineal, de unos pocos elementos empezó a ser valorada. El resto de la historia es bien conocido, pero lo que quiero destacar aquí, es que el esquema proporcionado por el código Morse fue determinante, y nos enseñó su importancia, para abordar otros sistemas complejos en el mundo de la Biología.

Algo parecido es lo que está ocurriendo con la comunicación celular. Hasta hace poco tiempo, los principios de la comunicación celular eran casi un misterio. En las dos últimas décadas, sin embargo, un concepto unificador sobre la organización celular ha adquirido especial relevancia. Uno de sus principios, es que los sistemas que median la comunicación celular, están constituidos por complejos de moléculas, y que las proteínas que forman parte de estos complejos, contienen módulos o dominios que median las interacciones moleculares o poseen actividad catalítica. La cuestión de la especificidad en estas interacciones es del máximo interés. Como veremos, las interacciones proteína-proteína basadas en módulos, constituyen el esquema general por el que las rutas de señalización se ensamblan y regulan. En este esquema, las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, llevan a cabo un papel fundamental, al regular las interacciones. Aunque en general, estas interacciones son de naturaleza sencilla, pueden ser utilizadas para construir sistemas mucho más complejos.

## Moléculas de la comunicación celular

Casi con seguridad, se puede decir, que los mecanismos que permiten que una célula pueda influir en el comportamiento de otra célula, existían ya en el mundo de los organismos unicelulares, antes de que los organismos pluricelulares aparecieran sobre la Tierra. Algunas pruebas de ello, proceden de estudios realizados en organismos eucariotas unicelulares, como las levaduras. A pesar de que estas células, llevan una vida independiente, pueden comunicarse entre si, y cada una de ellas puede influir en el comportamiento de otras, por ejemplo, para el acoplamiento sexual. La levadura *S. cerevisiae*, por ejemplo, segrega un péptido denominado “factor de acoplamiento” que constituye una señal, para que las células de tipo de acoplamiento contrario (de sexo contrario diríamos) dejen de proliferar y se preparen para el acoplamiento.

Si las células de levadura, se comunican secretando unos cuantos tipos de péptidos pequeños, las células de animales superiores, se comunican mediante centenares de moléculas, que incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos e incluso gases disueltos como el óxido nítrico. La mayoría de estas moléculas-señal, son secretadas al espacio extracelular, otras se liberan por difusión a través de la membrana, y otras quedan expuestas al espacio extracelular, aunque permanecen unidas a la célula señalizadora.

Sea cual sea la naturaleza de la molécula señal, la célula diana responde mediante una proteína específica, el receptor, que se une a la molécula señal, e inicia una respuesta en la célula diana. En esta respuesta, los procesos que definen la función celular, tales como la forma de las células, la expresión genética, el movimiento, la proliferación etc., tienen que estar interconectados dentro de cada célula individual, de modo que esta se comporte como un todo coherente, en lugar de solo una colección de partes.

Una de las características de las moléculas de la señalización intracelular es que funcionan como “interruptores moleculares” esto es, que la recepción de una señal las “activa”, y esta activación hace, que la información fluya a través de la célula.

Estos “ interruptores moleculares” son fundamentalmente de dos tipos. El primero, es una clase de proteínas que se caracteriza por tener gran afinidad por el nucleótido GTP, y por ello reciben el nombre de proteínas que unen GTP (*GTP binding proteins*) o simplemente proteínas G. El segundo, es otra amplia clase de proteínas, que se activan por fosforilación, es decir por la adición covalente de un grupo fosfato a una proteína intracelular y es a esta segunda clase de moléculas de señalización, a las que me voy a referir principalmente, en esta disertación.

## **La fosforilación de proteínas**

El hecho de que las proteínas puedan ser fosforiladas es algo que se conoce desde hace mucho tiempo. Ya en el siglo XIX se sabía, que el grupo fosfato podía unirse covalentemente a proteínas. La mayoría de los ejemplos de estas “fosfoproteínas” se encontraba en la leche, como las “caseínas”, o en la yema del huevo como la “fosvitina”, y durante algún tiempo, se consideraron, un procedimiento biológico capaz de proporcionar al organismo un nutriente importante, como el Fósforo. Por tanto, durante casi un siglo después de su descubrimiento, la existencia de fosfoproteínas se consideró tan solo una consecuencia de reacciones metabólicas ordinarias (3,4).

En los años 1950 esta idea empezó a cambiar, a medida que las fosfoproteínas empezaron a ser consideradas “reguladores clave” en la vida de las células. Un factor de esta nueva situación, tuvo lugar en 1954, cuando se observó que un enzima, podía catalizar la transferencia de un grupo fosfato a otra proteína, una reacción llamada de fosforilación (5). La proteína responsable, era un enzima del hígado, que catalizaba la fosforilación de la caseína y se denominó “proteína quinasa”. Un año después, el papel de la fosforilación se hizo mas interesante, cuando Fisher y Krebs por un lado, y Sutherland por otro, encontraron, que el enzima implicado en el metabolismo del glucógeno, la glucógeno fosforilasa, podía ser regulada por la adición o eliminación de un grupo fosfato, sugiriendo, que la fosforilación reversible de proteínas podía controlar la actividad de los enzimas (6,7). Con el transcurso del tiempo, esta idea, no solo ha sido confirmada por multitud de investigaciones, sino que además, se ha extendido a prácticamente todos los campos de la

biología celular. Mas recientemente, y tras la secuenciación de numerosos genomas, sabemos, que aproximadamente 1/3 de todas las proteínas de una célula de mamífero, están fosforiladas (8). El estudio de la biología celular actual, está pues, lleno de ejemplos de regulación por fosforilación, y de cómo el efecto de esta fosforilación afecta a aspectos tan fundamentales, como la actividad enzimática, el movimiento de proteínas entre compartimentos subcelulares, las interacciones de proteínas entre si y con otros componentes, o la propia degradación de las proteínas.

La variedad y diversidad de proteínas fosforiladas es enorme y asimismo, muchas enfermedades parecen hoy debidas a una fosforilación anormal de proteínas. Todos estos elementos, han hecho que la fosforilación de proteínas esté desde hace tiempo en la frontera de la investigación biomédica, un hecho, que fue reconocido ya en 1992 por la Academia sueca, cuando Fisher y Krebs recibieron el Premio Nóbel en Fisiología y Medicina, por sus trabajos pioneros en este campo.

### Fosforilación reversible de proteínas

Desde el punto de vista bioquímico, la fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona que consiste en la adición de un grupo fosfato a un residuo de aminoácido en una proteína. Como el grupo fosfato se encuentra cargado negativamente, su adición a una proteína, produce generalmente, un cambio en su conformación, es decir en su estructura tridimensional (9). La reacción es reversible, y por el proceso inverso, (defosforilación) la proteína recupera su conformación original. Casi siempre, cada una de estas dos conformaciones confieren a la proteína una actividad biológica diferente, y entonces la fosforilación de la proteína va a actuar como un interruptor molecular que “enciende o apaga” la actividad de la proteína.

El mecanismo de fosforilación de proteínas presenta tres características que lo hacen especialmente conveniente para las células.

Así:

- es rápido, esto es, se lleva a cabo en pocos segundos,
- es simple, no requiere la síntesis o degradación de otras proteínas,
- es reversible.

Estas características, junto a la amplia disponibilidad de ATP como donador de fosfato en el interior de las células, han determinado, porqué este mecanismo, ha sido adoptado, para la regulación de tantos procesos biológicos con preferencia a otros (8,10).

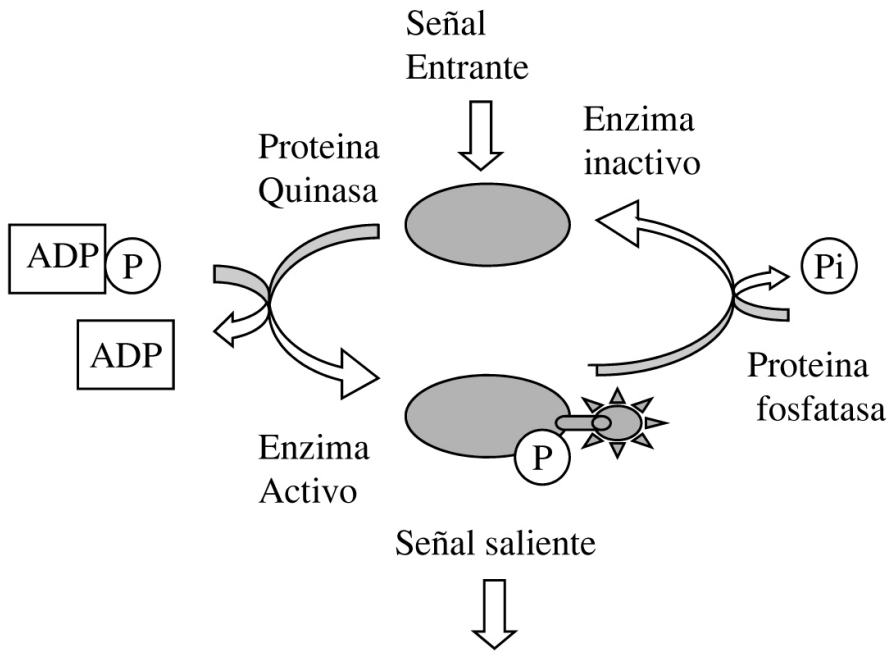
### Proteína quinasas

El estado de fosforilación de una proteína no es algo intrínseco de cualquier proteína, sino que está determinado, por la acción concertada de proteína quinasas y proteína fosfatasas, que son los enzimas, que catalizan la reacción en uno y otro sentido (Figura 1). Por ello, buena parte de la investigación en este campo se ha dirigido a la identificación, estructura, regulación y mecanismo de este grupo de enzimas.

Las proteína quinasas forman una superfamilia de proteínas homólogas, la mas grande del genoma humano (11). Una primera estimación, aproximada de su número, alcanzó notable popularidad en un artículo de Toni Hunter, que llevaba por título:“A thousand and one kinases“(12) y que indicaba por tanto el gran numero previsible de proteína quinasas.

Lo cierto es, que aunque hay una importante diversidad de estructuras, modos de regulación y especificidades de sustrato, las proteína quinasas, presentan también aspectos comunes. El aspecto común principal, es el dominio catalítico conservado, con su centro catalítico de 250-300 residuos de aminoácidos. A continuación, un primer grado de diversidad, se refiere a la especificidad de sustrato. La mayoría de las proteína quinasas son serina/treonina quinasas, es decir, fosforilan específicamente residuos de serina y/o treonina. Un grupo más pequeño, está constituido por aquellas que fosforilan exclusivamente residuos de tirosina y por último, existe un numero pequeño de quinasas, que actúan sobre serina o treonina, y tirosina, simultáneamente, y reciben el nombre de quinasas duales.





**Figura 1.** Fosforilación reversible de proteínas. Proteína quinasa y proteína fosfatasa.

Estructuralmente distintas, son las histidina quinasa, que se encuentran principalmente en procariontas, como parte de mecanismos de transmisión de señal de dos componentes.

En resumen, el complemento completo de proteína quinasa del genoma humano, lo que se conoce también como el “kinoma” humano, está compuesto por 518 proteína quinasa y constituye una base funcional para casi cualquier proceso fisiológico, dado su implicación, en los procesos de transmisión de señal, en todos los tipos de células (Tabla1) (13).

**Tabla 1. Subfamilias de proteína quinasas en humanos**

Funcion	Subfamilia	Nº	Notas
Inmunología	JAK	4	Receptores Citoquinas
Hemopoiesis	PDGFR	4	Factores de crecimiento
Angiogenesis	VEGFR	4	Angiogénesis
	Tec	5	Tirosina quinasa no receptor
	Src	11	Tirosina quinasa no receptor
	IRAK	4	IL-1 Quinasa asociada a receptor
	Tic	2	Tic y Tek, RTK's
	IKK	4	Ikk quinasa, señalización por NFκB
	RIPK	5	Señalización por NFκB
	Axl	3	Homeostasis Sistema Inmune
	Neurobiología	Eph	14
Trk		3	Receptores neurotrofina
MAPK			
MAPK	Ste 11	9	MAPKKK
	Ste20	31	MAPKK
	Ste7	8	MAPKK
Apoptosis	DAPK	5	Protein quinasa de apoptosis
	RIPK	5	Señales de muerte por TNF
	Lmr	3	Tirosina quinasa de apoptosis
Señales Ca <sup>2+</sup>	CaMK1	5	Ca-calmodulina quinasas
	Ca MK2	4	Ca-calmodulina quinasas
EGF	EGFR	4	Familia de EGF
	RSK	4	S6 quinasa ribosómicas
Otras	Tac	3	Tac3 activadas por EGFR
	Src	11	Src en la señalización por EGFR
	Hunc	1	Quinasa asociada a Neu
	Trio	3	Ortólogos de mosca y gusanos
	PDK	5	Piruvato DH mitocondrial
	HIPK	4	Quinasas de homeodominios
	STKR	12	TGβ, Receptores activina
	BRD	4	Quinasa con bromodominios
	Wnk	4	Hipertension
	CDKL	5	Quinasa dependientes de ciclina
	NKF	6	Nuevas familias

## La fosforilación en tirosina y los oncogenes virales

Hace treinta años, cuando no existía aún la menor idea de cómo podía ser la organización de los sistemas de comunicación celular, existían, algunos virus DNA y RNA, capaces de inducir transformación maligna, y cuyos genomas, podían ser analizados por las técnicas

habituales. Sus efectos, han permitido aprender mucho, no solo sobre el proceso maligno, sino también sobre las vías de señalización. Por ejemplo, el virus del sarcoma de ROUS (RSV), que tras la infección de células animales, produce cambios en la morfología celular, en sus propiedades de adhesión, en el metabolismo y en la supervivencia, sugiriendo, que estas distintas facetas del comportamiento celular, están interconectados. Se pensó entonces correctamente, que conocer como un virus, como el RSV, interaccionaba con la maquinaria celular podría revelar aspectos mas profundos de biología celular. Trabajos realizados en los años 70, mostraron que la actividad transformante de RSV, podía ser atribuida a un gen viral el *v-Src*, (14) que fue identificado por Bishop y Varmus, como una copia “pirata” de un gen celular normal, el gen *c-Src* (15). Esto reducía el problema, a la cuestión de identificar las proteínas codificada por *c-Src* y otros oncogenes virales similares, y determinar después, su acción biológica. Brugge y Erikson, fueron los primeros investigadores en identificar la proteína de 60 kD *v-Src*, y en encontrar, que era capaz de producir pequeños tumores (16). La proteína *v-Src*, fue identificada como una proteína quinasa, un hallazgo que se consideró interesante, porque la fosforilación de proteínas, parecía una manera lógica y posible por la que un solo polipéptido podía ejercer una influencia tan dominante en la célula (17). Posteriormente, el análisis de fosfoaminoácidos en las células infectadas demostró que la modificación relevante podía ser la fosfotreonina.

Algunos años después, (1979) Toni Hunter, estudiando las propiedades de un producto de otro oncogén viral totalmente diferente, el antígeno T mediano del virus del polio, e influido posiblemente por la idea, de que los oncogenes virales podían ser proteína quinasas, encontró que tras la infección del virus, era el mismo antígeno T mediano el que resultaba fosforilado. Mas importante aún, encontró también, que el aminoácido fosforilado en este caso era la fosfotirosina, una modificación que no se había encontrado con anterioridad en proteínas (18).

Prosiguiendo con este tipo de estudios, un año mas tarde, Hunter y Sefton encontraron que la proteína *c-Src*, el homólogo celular de *v-Src*, poseía también actividad tirosina quinasa, y que esta actividad inducía una elevación en la fosforilación de la tirosina celular. Estos hallazgos permitieron establecer una estrecha correlación entre la fosforilación en tirosina y el proceso de transformación (19).

Más adelante, Courtneidge y Alan Smith, mostraron que el antígeno T mediano, no es solamente una tirosina quinasa, sino una proteína de agregación que se une y activa a diferentes quinasas de la familia Src de la célula hospedadora (20). Es decir, que aunque se tratara de una proteína más compleja, el antígeno T mediano, en definitiva actuaba por un mecanismo semejante.

Paralelamente a estos hallazgos, en 1980, Witte y Baltimore, describieron que la oncoproteína v-Abl, codificada por el virus de la leucemia murina Abelson, resultada también autofosforilada (21). Como resumen, este conjunto de observaciones venían a demostrar que la respuesta celular al oncogen viral v-Src era capaz de transformar las células a través de la fosforilación de proteínas en tirosina.

En poco tiempo, una verdadera avalancha de experimentos, vino a sugerir que los receptores de varios factores de crecimiento, así como de la hormona insulina, son también tirosina quinasas y que la activación anormal de los receptores, o la expresión ectópica de los ligandos extracelulares, podía inducir la transformación celular (22-27). Por tanto, la señalización por receptores de tirosina quinasa resultaba importante para la respuesta celular normal a un conjunto de proteínas señal, como factores de crecimiento, hormonas metabólicas y mitógenos y la activación patológica de tales rutas de señalización, podía provocar un fenotipo canceroso.

Todo ello condujo a que muchos investigadores, se formularan la cuestión de cómo las tirosina quinasas ejercen su efecto sobre las células y cómo se consigue la especificidad necesaria en la señalización a través de receptores.

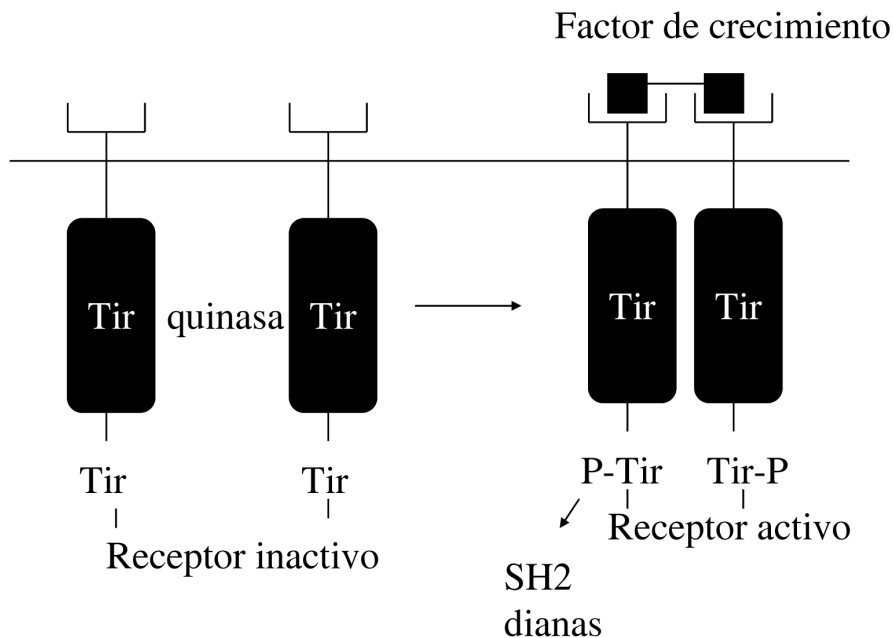
Como en el caso de otras enzimas, se pensó inicialmente que la especificidad, se podría alcanzar, a través de la capacidad del sitio activo de la quinasa para reconocer motivos de aminoácidos en proteínas-sustrato, (para su fosforilación) (28), con objeto, de llegar a producir un cambio conformacional en enzimas reguladores. Este paradigma parecía inicialmente suficiente para explicar la regulación por proteína quinasas.

## **Dominios de interacción conservados regulan la transferencia de información**

Junto al conocimiento del modo de actuación de los oncogenes virales, un segundo campo muy fructífero, en la determinación de la especificidad de las vías de señalización, procede de la disección de las rutas por las que actúan algunos factores de crecimiento.

Los receptores de los factores de crecimiento proporcionan un modelo sobre como se construyen las rutas de señalización. Estos, poseen por lo general, un dominio extracelular, al que se une el ligando apropiado, una región transmembrana y un dominio citoplásmico, que contiene actividad de proteína quinasa (29,30,31).

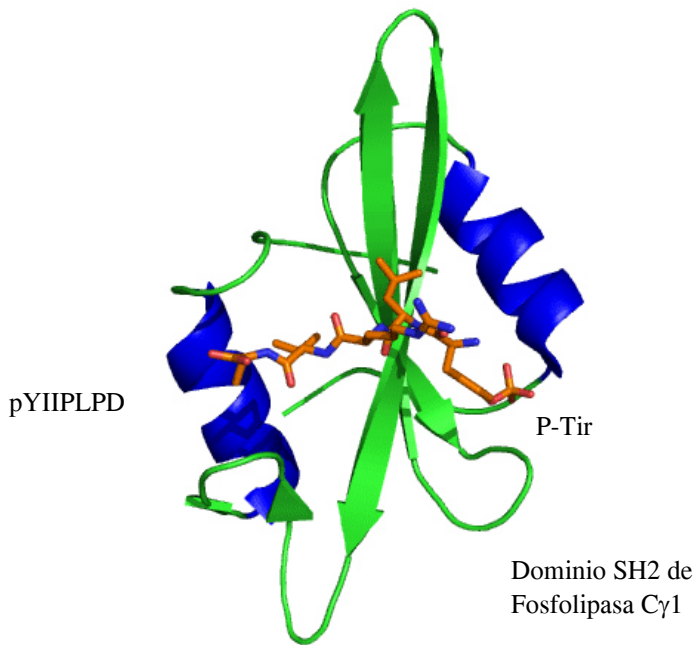
La unión del factor de crecimiento, induce la dimerización del receptor, resultando en la fosforilación cruzada de las cadenas del receptor adyacente en sus regiones citoplásmicas (Figura 2). Esta autofosforilación tiene dos consecuencias. Por un lado, la fosforilación en tirosina dentro del dominio catalítico, induce un cambio conformacional que estimula la actividad quinasa. Por otro lado, la fosforilación en regiones no catalíticas, crea sitios de unión para proteínas de señalización citoplásmicas. Estas proteínas de señalización citoplásmicas, tienen en común, el poseer una o mas copias de un dominio de interacción proteína-proteína, el dominio 2 de homología con Src, mas conocido como dominio SH2.



**Figura 2.** Un receptor tirosina quinasa que atraviesa la membrana plasmática se dimeriza por la unión de un factor de crecimiento. Adicionalmente tiene lugar la autofosforilación y la creación de sitios de unión para proteínas con dominios SH2.

Los dominios SH2, descritos inicialmente por Pawson, contienen aproximadamente, 100 residuos de aminoácidos y están plegados de manera, que los extremos N y C terminales, se juntan en el espacio, y la superficie que se une a ligandos se localiza en la cara opuesta (32,33). Dicho de otro modo, están contruidos de manera ideal, para su inserción en otra proteína, dejando hacia el exterior el sitio de unión al ligando (Figura 3).

Los dominios SH2, reconocen y se unen a residuos de P-tirosina, en el contexto de al menos otros 3 aminoácidos, mas cercanos al extremo C-terminal. Para ello, los dominios SH2 poseen una región, que parece un bolsillo de P-tirosina, y una superficie mas variable, que reconoce los residuos del resto de aminoácidos del fosfopéptido. Esta última región, varía de un dominio SH2 a otro, y proporciona, unas posibilidades mayores, de flexibilidad y de especificidad.



**Figura 3.** Los dominios de interacción como SH2 tienen un diseño modular. Un diagrama de cintas del dominio SH2 C-terminal de fosfolipasa C (PLC)- $\gamma$ -1 (verde y azul) unido a un péptido con la secuencia pTir-Ile-Ile-Pro-Leu-Pro-Asp (dorado) correspondiente al sitio de unión del receptor de PDGF. El residuo de fosfotirosina está en la derecha y el péptido C-terminal hacia la izquierda.

La capacidad de un receptor tirosina quinasa para unir proteínas citoplásmicas, depende por tanto, de las secuencias que flanquean los sitios de autofosforilación, las cuales, van a determinar, qué proteínas con dominios SH2, se unirán al receptor activado. De esta manera, conociendo las propiedades de los dominios SH2 individuales por un lado, y las secuencias de los motivos de unión en el receptor tirosina quinasa por otro, es posible, conocer las posibilidades de unión y en consecuencia el potencial de señalización de un receptor (34).

El genoma humano, contiene 115 dominios SH2, (35,36) lo que indica, que probablemente, un mismo dominio de interacción puede ser usado repetidamente, para acoplar las señales de fosfotirosina con múltiples reguladores intracelulares.

El dominio SH2, (37) ha servido por otra parte, como prototipo, para poner de manifiesto, la existencia de toda una familia de dominios de interacción diferentes, que están presentes en muchas proteínas celulares (38). Estos otros dominios, contienen muchas analogías con los dominios SH2, como por ejemplo, el diseño modular, y el que también están presentes, en cientos de copias en el proteoma humano.

Los diferentes dominios de interacción que han sido caracterizados hasta ahora, presentan una especificidad característica para la unión a diferentes tipos de péptidos. Así, por ejemplo, los dominios SH3, se unen a secuencias ricas en prolina, y los dominios PDZ, lo hacen a motivos de aminoácidos situados en extremos C-terminales (39-41). Es de destacar, que los dominios de interacción, no solo pueden mediar interacciones proteína-proteína, sino que también pueden reconocer fosfolípidos, como en el caso de los dominios PH, o pueden unirse a ácidos nucleicos, como dominios KH o *Puf repeat*, de modo que al hacerlo, regulan procesos básicos, tales como, la síntesis de proteínas (42). En la actualidad, se han caracterizado 94 dominios de interacción diferentes.

Por otra parte, la mayoría de estos dominios, reconocen a sus dianas de manera dependiente de modificaciones post-traduccionales previas, tales como fosforilación, acetilación, metilación de residuos de lisina, hidroxilación de prolina, ubiquitinación, etc. Esto contribuye lógicamente, a una extraordinaria diversidad de posibilidades de unión (34,43-46).

Los dominios de interacción pueden unirse también a otros dominios relacionados, como por ejemplo a dominios de muerte celular, en la activación de rutas de apoptosis (47).

En resumen, los dominios de interacción, son estructuras modulares contenidos en las proteínas, que actúan como conectores entre proteínas de señalización, y controlan, un gran número de funciones celulares, como la transducción de señal, la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico intracelular de proteínas, la expresión genética, la organización de cromatina, la biogénesis de orgánulos, la polaridad celular y la proteólisis (Figura 4).



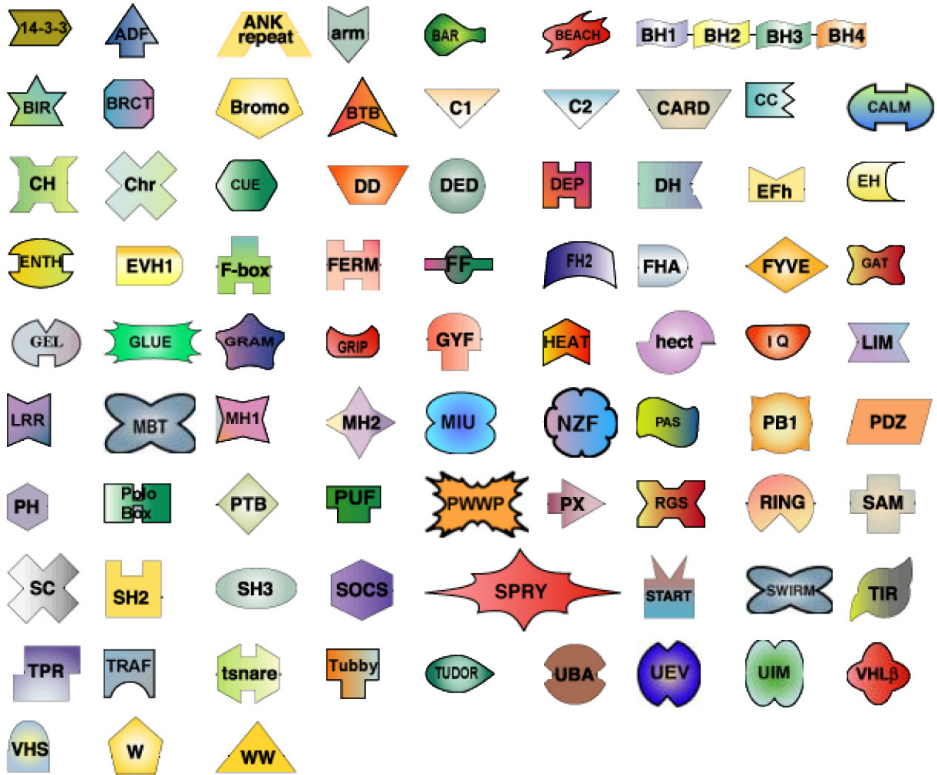


Figura 4. Diversidad de dominios de interacción en proteínas.

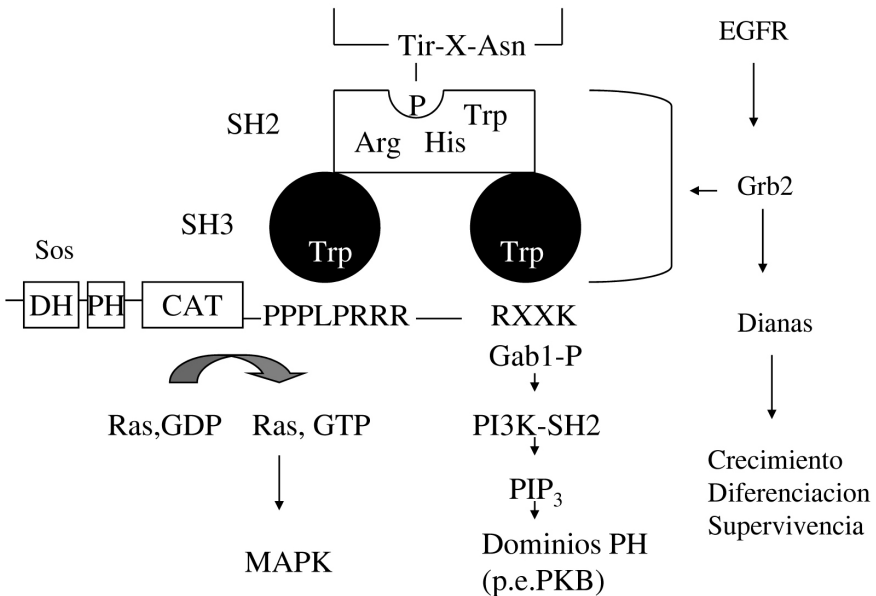
## Las vías de señalización se construyen a partir de interacciones proteína-proteína reiteradas

Las proteínas de señalización por lo general, están compuestas por múltiples dominios de interacción, los cuales son utilizados, como hemos visto, para nuclear la formación de complejos multiproteicos, que son fundamentales en procesos como la transducción de señal.

Por ejemplo, la proteína adaptadora Grb2, contiene un dominio central SH2 flanqueado por dos dominios SH3. Los dominios SH2, se unen como ya hemos dicho, a dominios fosforilados, con la secuencia Tir-X-Asn, que se encuentra en el receptor tirosina quinasa activado. El dominio SH3 de Grb2 por otra parte, se une a dominios ricos en prolina,

en el extremo de la proteína Sos, un factor de intercambio de nucleótidos para la proteína Ras GTPasa, y esta unión, activa la ruta de señalización de Ras- MAPK al inducir el intercambio de GDP por GTP en Ras.

Los datos genéticos y bioquímicos indican que la interacción tirosina quinasa con Grb2, y la de Grb2 con Sos, son necesarias para el proceso de la transducción de la señal. Además, el extremo C-terminal de Grb2 se une también a otra proteína, la proteína Gab1, que a su vez, activa a otra quinasa, llamada PI3K generando PIP3 en la membrana. El PIP3 proporciona ahora, un sitio de unión, para los dominios PH de las serina/treonina quinasas, PKB/Akt y PDK1, las cuales, activan rutas de señalización implicadas en supervivencia y control del ciclo celular (48,49). De este modo, toda una serie de interacciones proteína-proteína y proteína-fosfolípido, pueden concatenarse, para formar una red compleja de señalización, que controla aspectos importantes del comportamiento celular, en respuesta a estimulación por factores de crecimiento (Figura 5).



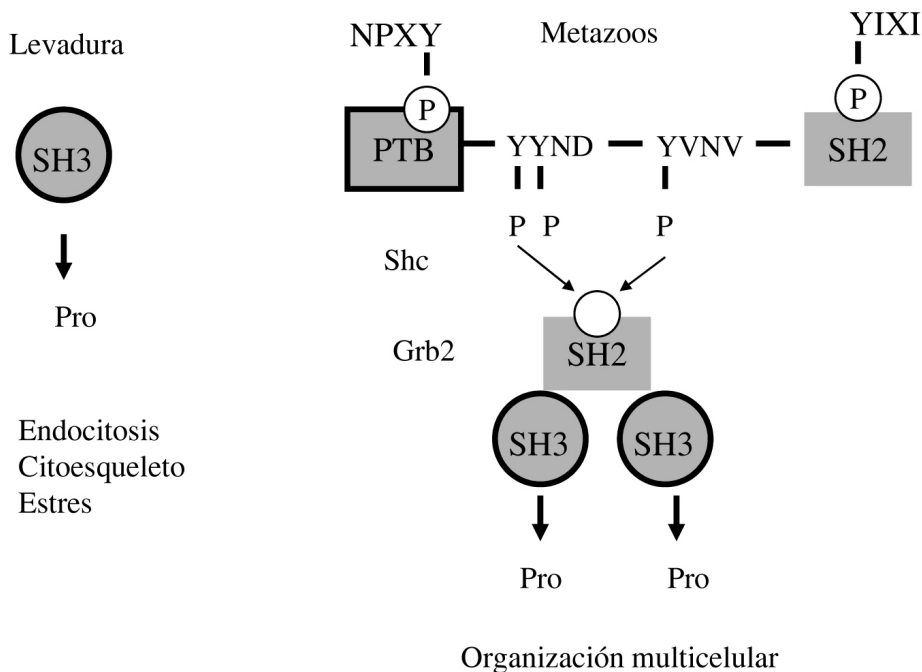
**Figura 5.** Una ruta de señalización organizada por interacciones proteína-proteína y proteína-fosfolípido. La fosforilación de un motivo Tir-X-Asn crea un sitio de unión para el dominio SH2 de Grb2 el cual a través de de sus dominios SH3 recluta a Sos un activador de la ruta Ras-MAPK y a Gab1 un activador de la ruta PI3K/PKB.

## **La aparición de nuevos dominios constituye una base para la rápida evolución de nuevas rutas de señalización**

Una de las características de la comunicación celular, es la capacidad de adaptación a situaciones cambiantes. Esta propiedad, en el esquema de los dominios de interacción, significa, que para la construcción de nuevas rutas de señalización, no sería necesario la síntesis de nuevas proteínas. La observación, de que un conjunto limitado de dominios de interacción, puede ser utilizado de manera repetida, en diferentes proteínas celulares, con objeto de alcanzar distintos objetivos biológicos, sugiere la posibilidad, de que estos dominios, pueden haber sido seleccionados en el curso de la evolución. El diseño de carácter modular, podría haber facilitado, la aparición de nuevas vías de comunicación.

Como ejemplo, se puede citar el hecho, de que en la levadura *S.cerevisiae*, hay 28 dominios SH3, pero no hay en cambio, ni tirosina quininas convencionales, ni tampoco dominios SH2. Los dominios SH2, y la señalización por tirosina quininas, parece pues, que hicieron su aparición simultánea en los organismos multicelulares, y que han colaborado conjuntamente en la formación de nuevas rutas de señalización.

Una vez presentes, los dominios SH2, pueden haber sido incorporados en proteínas ya existentes, como aquellas compuestas inicialmente solo por dominios SH3, para crear nuevas interacciones. Como ha señalado Craig Venter, uno de los artífices de la secuenciación del genoma humano, las proteínas de señalización, en el proteoma humano, son mas complejas, en términos de dominios de interacción, que sus homólogas en invertebrados o eucariotas unicelulares (11,50). Por ejemplo, desde la levadura al ser humano, ha habido una expansión de 10 veces en el número de dominios SH3. Esta capacidad para establecimiento de nuevas conexiones, mediada por los dominios de interacción, es así un reflejo del aumento de complejidad creciente, en la organización celular, que ha tenido lugar, en el paso desde organismos unicelulares a multicelulares (Figura 6).

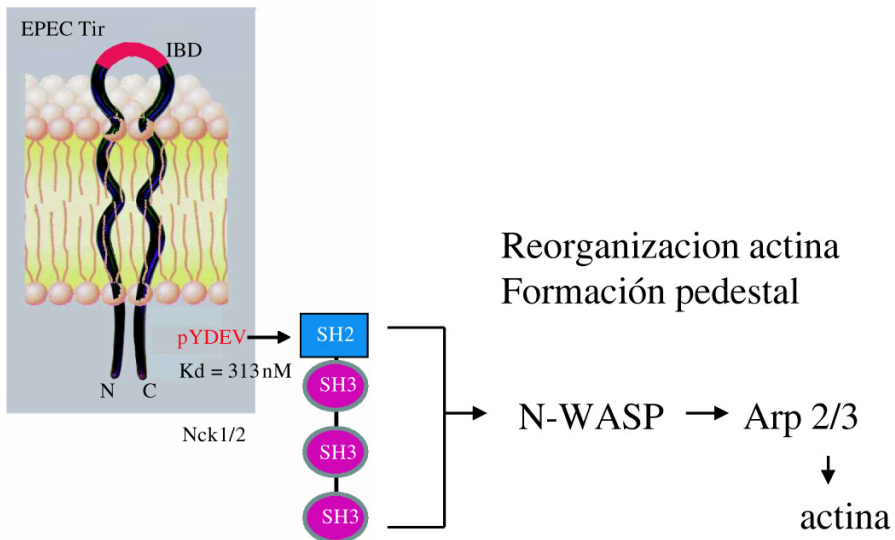


**Figura 6.** Los dominios de interacción pueden ser usados para facilitar la evolución de nuevas vías de señalización. La levadura tiene dominios SH3 pero no tiene dominios SH2 o de señalización por tirosina quinasa. En animales multicelulares el dominio SH2 (más reciente) se une a dominios SH3 existentes (en la proteína Grb2) para crear nuevas vías de señalización que acoplan fosfotirosina a crecimiento celular, diferenciación y/o supervivencia. La capacidad de conexión de esta ruta puede verse aumentada por proteínas como Shc con varios módulos de reconocimiento de fosfotirosinas.

### Los microorganismos patógenos modifican las vías de señalización

La idea que subyace bajo este concepto, proviene del análisis, de algunas proteínas, codificadas por bacterias o virus patógenos. Entre ellas, se encuentran, proteínas codificadas por microorganismos, que se unen, a proteínas diana en la célula hospedadora. Al hacerlo así, cambian el comportamiento de las vías de señalización. Consideremos por ejemplo, la proteína Tir de la bacteria *E. coli* enteropatógena. Esta proteína, se inserta en la membrana de la célula hospedadora, donde es fosforilada en un residuo de tirosina, perteneciente a un motivo de aminoácidos, por los se une, al dominio SH2 de la proteína Nck (Figura

7). La proteína Tir, a través de sus dominios SH3, recluta la proteína N-WASP, que induce la polimerización de actina, y causa una reorganización masiva del citoesqueleto de actina en la célula hospedadora, dando lugar, a nuevas estructuras, de tipo pedestal, a las que la bacteria, puede fijarse con facilidad, proporcionando, una base, para entender su patogenicidad (51). Análogamente, Jack Dixon (52) ha descrito, que el mayor factor de virulencia de la bacteria *Yersinia* es una tirosina fosfatasa. Al parecer, durante el proceso de la infección, *Yersinia*, inyecta la tirosina fosfatasa en los macrófagos, lo que da lugar, a un cambio en el estado de fosforilación de algunas proteínas de modo, que impide su fagocitosis por el sistema inmune, y conduce a enfermedades como la peste bubónica y la tuberculosis.



**Figura 7.** La proteína Tir codificada por *Escherichia coli* enteropatógeno se inserta en la membrana plasmática de una célula hospedadora y a través de la región extracelular (IBD) une la proteína intimina a la bacteria. Una tirosina en la cola citoplásmica C-terminal de Tir es fosforilada en tirosina y se une al dominio del adaptador Nck que contiene dominios SH2/SH3. Nck a su vez, recluta a N-WASP, una proteína que se asocia con el complejo Arp 2/Arp3 para inducir la polimerización de actina.

Una consecuencia pues del conocimiento de los sistemas de comunicación celular, es que los microorganismos patógenos, han aprendido a romper el código de las interacciones moleculares, y son capaces de interferir ahora con las redes de la señalización intracelular en beneficio propio.

En otro contexto, sabemos también, que proteínas de fusión codificadas por oncogenes son responsables de algunos tipos de cáncer. Es bien conocido el caso de una translocación cromosómica conocida como cromosoma Philadelphia, que da lugar a la proteína de fusión bcr-abl, una tirosina quinasa, que al estar activada constitutivamente, da lugar a la estimulación de una ruta de proliferación celular, que conduce a un tipo de cáncer denominado leucemia mieloide crónica (CML).

En el caso del SNC, las proteínas que median los procesos neuronales que conducen a la memoria y al aprendizaje, están contruidos también, por complejos moleculares formados por asociación de proteínas, entre las que se encuentran quinasas y fosfatasa que contienen módulos del tipo de los descritos anteriormente como PDZ, SH3 y EVH1 (41).

En resumen, el modo en cómo se construyen las vías de señalización intracelular indica que agentes patógenos de distinto tipo pueden modificar las interacciones en el interior de las células, interfiriendo así con la señalización celular, y proporcionando al mismo tiempo al virus ,bacteria patógena, proteína oncogénica o prión una ventaja biológica

### **La segregación espacial en las vías de señalización**

Entre las cuestiones que se plantean, una de gran interés es cómo, en el denso ambiente del interior celular, pueden construirse estas vías, de modo, que se preserve la especificidad y se optimizen las interacciones. Algunos principios pueden ya ser establecidos.

## Localización y reciclaje de receptores

La especificidad biológica requiere entre otras cosas, que los receptores y sus dianas citoplásmicas, puedan ser depositados en el sitio apropiado, de manera que puedan ser activados en el momento adecuado y en el lugar preciso.

Los dominios de interacción proporcionan un procedimiento, por el que los receptores celulares, pueden ser dirigidos a compartimentos específicos de la membrana plasmática, por ejemplo a través de la unión selectiva de motivos C-terminales como son los dominios PDZ. Así, en *C. elegans*, el receptor de EGF, LET-23, es reordenado en la superficie de las células a través de una asociación con el dominio PDZ de una proteína adaptadora, LIN-7 (53). Lin 7 regula también la localización de la tirosina quinasa humana ErbB en células epiteliales. Para ello, primero deposita el receptor en la superficie basolateral de estas células, a través de una interacción con el dominio quinasa, y después, estabiliza el receptor en dicho lugar a través de la unión con el extremo C-terminal. Las células epiteliales de las vías respiratorias expresan ErbB 2/4 y su ligando Herregulina, pero localizan la Herregulina en la superficie apical, de manera que queda separada de sus receptores hasta que la polaridad de la célula se altera (54). De este modo, la diferente localización del ligando y del receptor controlan cuando y cómo la señalización va a tener lugar.

La pérdida de polaridad o la sobreexpresión de un receptor como ErbB2 en el cáncer de mama, alteran esta localización activando así rutas de señalización en un lugar inadecuado.

Debido a que la duración de la señal es importante para la naturaleza de la respuesta celular, existen mecanismos que atenúan la señalización a través del reciclaje de receptores.

Así, una vez activados, los receptores tirosina quinasa son internalizados en vesículas recubiertas de clatrina, y de este modo, viajan a través de los endosomas, hacia su degradación en los lisosomas. Este proceso, implica una serie de interacciones proteína-proteína y proteína-fosfolípidos que en conjunto, forman una ruta importante de regulación. En esta ruta, un motivo de P-tir en el receptor activado, se une

inicialmente al dominio SH2 de la proteína-ubiquitina ligasa, c-Cbl, lo que produce la ubiquitinación del receptor en varios sitios. En segundo lugar, el receptor ubiquitinado, es reconocido por proteínas endocíticas llamadas epsinas, que contienen motivos de interacción con ubiquitina (UIM) y son reclutadas en vesículas para su posterior degradación (55,56).

El tráfico de receptores, ha estimulado la idea, de que también otros componentes de las vías de señalización, pueden localizarse de manera semejante en los sistemas de membrana intracelulares, a través de interacciones mediadas por dominios de interacción (57). Este parece ser el caso del receptor de TGF $\beta$ , que es una serina/treonina quinasa (58). Estos receptores reclutan y fosforilan a proteínas llamadas R-Smad, e inducen la formación de complejos (Smad2/Smad 4), que son retenidos en el núcleo, para regular la expresión génica. El proceso es facilitado por una proteína de agregación llamada SARA que se une a las proteínas Smad y al receptor activado, así como también, a PI3P a través de un dominio FYVE. El receptor de TGF $\beta$ , es reclutado en vesículas recubiertas de clatrina y transferido a endosomas. La retención de receptores de TGF $\beta$  en endosomas, estimula la señalización a través de la ruta Smad 2/4. De un modo alternativo, los receptores TGF $\beta$  se localizan en los llamados *lipid rafts*, en la membrana plasmática. Así pues, en este sistema, la proteína de agregación SARA, dirige a los receptores, bien a un sitio interno para señalización activa, bien a otro diferente, para su represión.

De una manera análoga, distintas proteínas de agregación pueden dirigir a componentes de la ruta de la MAPK, a la membrana plasmática o a endosomas resultando así en la activación diferencial de Erk en estos sitios. Por ejemplo, el adaptador endosómico p14, recluta a la proteína de agregación MP1 con sus MEK1 y Erk1 asociadas, dando lugar a la activación de Erk1 en los endosomas, mientras que la proteína de agregación KSR estimula la ruta Erk MAPK en la membrana plasmática (59,60).

Situaciones similares gobiernan también los sitios de activación de las GTPasas de la familia Ras. Una ruta mencionada anteriormente que conduce desde receptores tirosina quinasa a Ras, y que implica a



Grb2 y al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) Sos, lleva a cabo la activación de Ras en la membrana plasmática. Otra ruta de activación de Ras diferente, es la que requiere la fosfolipasa C- $\gamma$ . Esta proteína hidroliza el PI(4,5)P<sub>2</sub> para dar lugar a diacilglicerol e IP<sub>3</sub>, que induce la liberación de calcio a partir de almacenes intracelulares. Esto estimula una RAS GEF (RasGRP1), sensible a calcio/diacilglicerol, que se localiza (a través de un dominio C1) en el aparato de Golgi, induciendo la activación selectiva de Ras en la membrana de este orgánulo (61). Estas dos rutas, pueden por tanto activar diferentes fracciones de Ras, en la membrana plasmática o en el aparato de Golgi, y estimulan así rutas comunes o diferentes, pero en distintas localizaciones.

En resumen la localización subcelular mediada por dominios de interacción constituye un aspecto muy importante de la organización de vías de señalización que subyace en la organización celular y que determina junto a otros elementos la especificidad en la respuesta.

### Sitios de Anclaje y proteínas de agregación

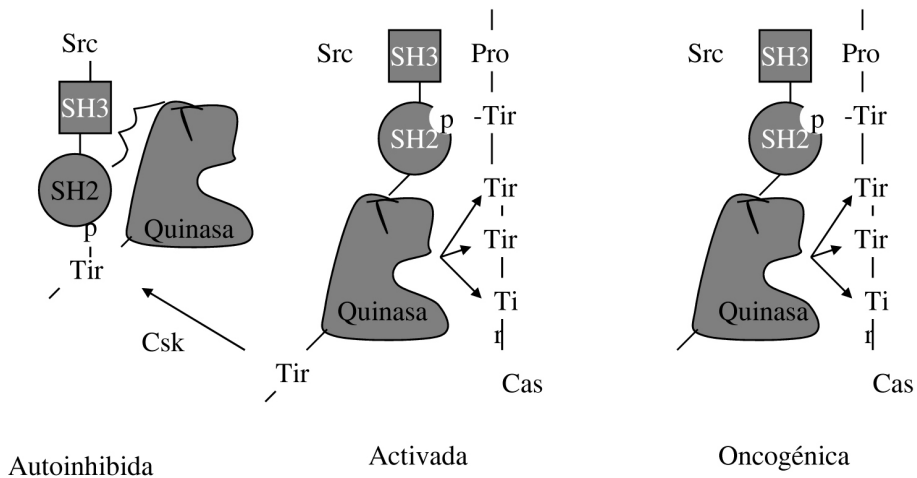
Mecanismos análogos a los empleados para la señalización a través de tirosina quinasas, son empleados también, para la señalización a través de serina/treonina proteína quinasas. Las serina /treonina quinasas sin embargo presentan la característica de unirse a sus dianas celulares, no solo a través de dominios de interacción, sino también, por sitios específicos, diferentes del centro activo, llamados “sitios de anclaje”. A través de ellos se unen a otras proteínas que actúan regulando a su vez, su actividad y la especificidad de sustrato (62).

Tanto la quinasa como el sustrato pueden asociarse también a una proteína de agregación común, que es una proteína, generalmente de tamaño mayor, que actúa a modo de plataforma de integración de varias quinasas que actúan en una misma vía. De este modo, las MAPK, por ejemplo, se unen por sitios de anclaje a sustratos y reguladores por un lado, y forman parte también de plataformas de agregación de un modo tal que confieren especificidad a la ruta.

El análisis estructural de las serina/treonina quinasa como, por ejemplo, la de la proteína p38 que es una MAPK que se activa por estímulos de estrés, revela una hendidura de anclaje en el lóbulo C-terminal de la quinasa, para el motivo de 6 aminoácidos, R/K-X4-X-, que se encuentra en sustratos, tales como, el factor de transcripción MEF 2, y reguladores como la quinasa MKK3b (63). Es de interés destacar que esta interacción, induce un cambio conformacional en el sitio activo de la quinasa lo que sugiere, que el anclaje, puede estar acoplado a la regulación de la actividad quinasa.

En otros casos, como en el de las quinasa dependientes de ciclina (CDKs) que regulan las transiciones en el ciclo celular, su conformación activa, depende de su asociación a las ciclinas, que actúan como subunidades reguladoras. Éstas no solo regulan la actividad de la quinasa sino que también, proporcionan sitios de anclaje para sustratos y otros reguladores, como en el caso de la ciclina A, que se une a través de un parche hidrofóbico a motivos RXL en sus proteína diana, como p107, E2F-1 e inhibidores como p21, p27 etc.(64)

Es frecuente pues, que la unión de serina/treonina quinasa a otras proteínas tanto por sitios de anclaje como a través de proteínas de agregación (*scaffolds*) regulen tanto la actividad como la especificidad. Este principio, se pone de manifiesto en la proteína Polo quinasa, una serina/treonina quinasa que desempeña varias funciones durante el proceso de la mitosis. Así, Plk1 tiene un dominio quinasa N-terminal que fosforila preferentemente motivos en un dominio E/DXZS/T-, y otro dominio C-terminal (*Polo box domain PBD*) que une secuencias S-pS/pT-P fosforiladas. La unión de fosfopéptidos al dominio PBD activa simultáneamente la quinasa y la dirige a sus sustratos. Esto proporciona una manera de acoplar las actividades de distintas quinasa en un proceso complejo como la división celular. En esencia, este mecanismo es muy similar al de las Tirosina quinasa citoplásmicas, como Src y Abl, en las que dominios SH2 y SH3 mantienen a la quinasa, en un estado auto-inhibido, pero dirigen la quinasa activada hacia sus sustratos (Figura8).

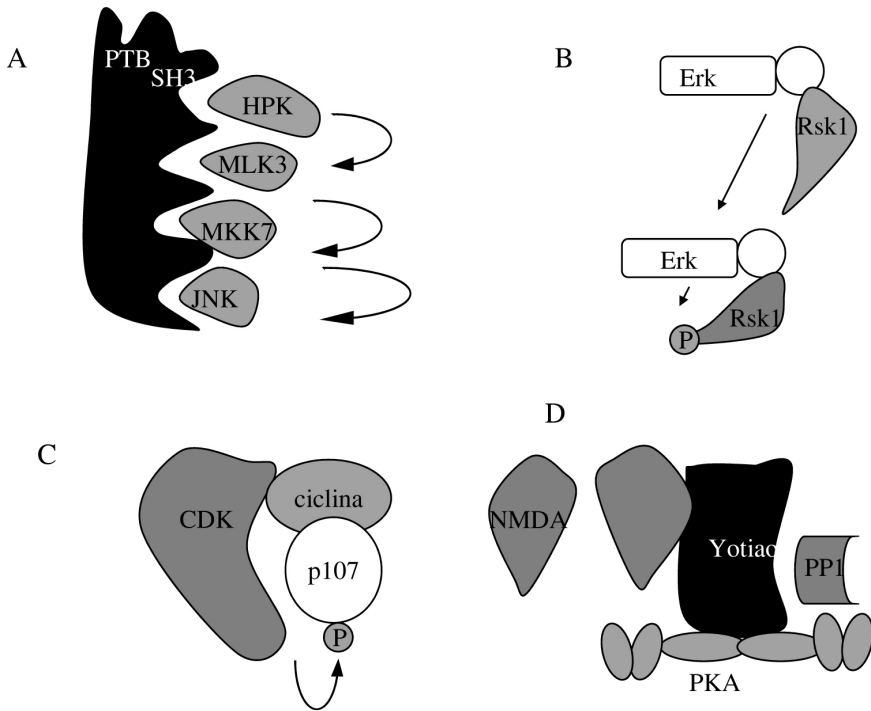


**Figura 8.** Regulación de la actividad de la quinasa Src por dominios de interacción. En el estado autoinhibido, los dominios SH2 y SH3 reprimen la actividad quinasa. Tras la activación los dominios SH2 y SH3 se unen a proteínas citoplásmicas que son dianas para Src como Cas. La delección de la cola C-terminal da lugar a la activación constitutiva de Src lo que resulta en oncogénesis.

El empleo de proteínas de agregación (*scaffolds*) para traducir señales generales en respuestas biológicas específicas, se hace particularmente necesaria en el caso de enzimas que están regulados por segundos mensajeros difusibles como cAMP. Es el caso de las proteínas de anclaje de proteína quinasa A (PKA) llamadas AKAPS. Se trata de polipéptidos grandes, con capacidad de unirse a subunidades reguladoras de PKA dependientes de cAMP y mantener así a PKA en estado inactivo a partir del cual, la subunidad catalítica puede ser liberada cuando interacciona el cAMP.

Las AKAPS tienen otras propiedades importantes. Así, por un lado contienen motivos para su unión a determinantes subcelulares, o a receptores, y por otro, poseen sitios de unión para enzimas de señalización como PKC y la fosfatasa PP2B. Una AKAP por tanto, es una auténtica plataforma de señalización, que puede ser localizada en un sitio específico de la célula, y a través de la actividad combinada de sus proteínas asociadas pueden convertir una señal genérica de cAMP, en una respuesta localizada, que es integrada con otros señales.

Estas observaciones ponen de manifiesto que la señalización por proteína quinasas implican la localización física de la quinasa y del sustrato en un sitio definido de la célula y señalan la naturaleza dinámica y las posibilidades combinatorias que ofrecen las proteínas de agregación o *scaffolds* (Figura 9).



**Figura 9.** Organización de rutas de señalización mediadas por proteínas de agregación. A; Jip 1 actúa como una proteína de agregación en la cascada de Jnk. Jip 1 tiene sitios de unión separados para JNK y las quinasas MKK7(MAPKK),MLK3 (MAPK) y HPK1. Jip 1 contiene también dominios PTP y SH3 que pueden unir el complejo a otras proteínas implicadas en su activación o localización. B; La MAPK Erk se ancla a proteínas diana, una vez anclada fosforila su sustrato Rsk1. C; La subunidad reguladora de la ciclina A de CDK2 se une a sustratos con un motivo RXL conservado como en p107. D. La proteína AKAP Yotiao se une al receptor de NMDA, PKA (inactiva) y PPI (activa), De este modo, Yotiao crea una asociación física de los componentes que reprimen el receptor NMDA en reposo y potencia la activación del canal.

## El retorno al estado basal: proteína fosfatasas

Otra de las cuestiones importantes de la especificidad de la respuesta a estímulos extracelulares es cómo cesa el estado activado y cómo la célula retorna al estado basal.

Dado que la fosforilación de proteínas es un proceso reversible, la coordinación de este proceso requiere la intervención de otro grupo de enzimas que son las proteína fosfatasas. El estudio de este grupo de enzimas a pesar del importante papel de regular la duración de la respuesta, no ha sido tan activo, inicialmente, como el de las proteína quinasa y solo ha empezado a ser considerado mas recientemente (65,66).

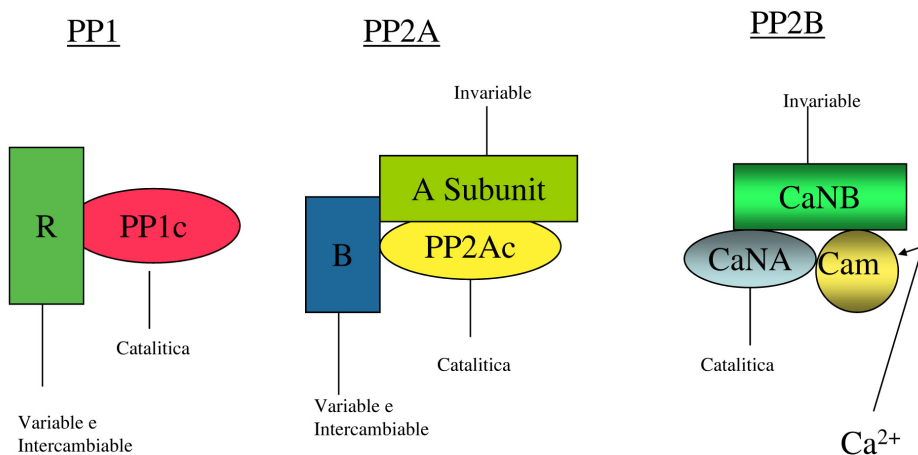
A diferencia de las proteína quinasa que, como hemos visto, derivan de un quinasa ancestral común, las proteína fosfatasas han evolucionado de manera diferente, de modo que se pueden distinguir varias familias, tanto desde el punto de vista estructural como fisiológico (Tabla 2) (67-69). Entre estas familias, la familia de las serin/treonina fosfatasas a las que los miembros de mi grupo y yo hemos dedicado nuestra atención, existen *in vivo*, como un conjunto de holoenzimas, formados por combinaciones, de unas pocas subunidades catalíticas, y un conjunto de subunidades reguladoras, que controlan un amplio espectro de rutas de señalización (Figura 10) (70,71). La necesidad de su regulación se pone de manifiesto porque el enlace P-monoéster, es muy estable, y tiene una vida media estimada de  $10^{12}$  años. La subunidad catalítica de PP1, la serina/treonina fosfatasa más abundante, acelera la velocidad de hidrólisis por un factor de  $10^{21}$ . Esto hace de PP1 uno de los enzimas más eficientes que se conoce, pero su actividad indiscriminada, representa un peligro potencial para la célula, y tiene que ser restringida, por proteínas reguladoras, para prevenir una potente defosforilación indiscriminada (72). En contraste con la diversidad de las proteína quinasa, nosotros encontramos que en las células de mamífero hay solo cuatro isoformas de la subunidad catalítica de PP1 y que estas isoformas son muy homologas entre sí y solo difieren en el dominio C-terminal que lógicamente debía ser responsable de la unión de inhibidores específicos y subunidades reguladoras (73).

**Tabla 2. Clases de proteína fosfatasas, número de genes en humanos y funciones.**

Familia	Clase	Número	Función (o sustrato)
<b>Ser/Thr Fosfatasas</b>			
Familia PPP	PP1	3	Condensación del cromosoma
	PP2A	2	Cohesión de cromátidas
	PP4	1	Reparación de DNA
	PP5	1	Estrés celular
	PP6	1	Ruta NFκβ
	PP2B	3	Respuesta Inmune (NFAT)
	PP7	2	
Familia PPM	PP2C	18	Señalización por TGFβ (SMADs)
<b>Familia PTP</b>			
Class I (classic)	Receptor PTP	21	Adhesión celular /citoesqueleto
	No-receptor PTP	17	Señalización de Insulina
ClassI (DSPs)	MAPKP	11	Señalización por MAPK
	Slingshots	3	Dinámica de Actina
	PRLs	3	Desconocida
	DSP	19	mRNA
	CDC14	4	Citoquinesis
	PTEN	5	Fosfatasa PIP <sub>3</sub>
Clase II PTPs	CDC25s	3	Mitosis (CDKs)
Clase III PTPs	LMWPTP	1	Desconocida

Estudios sobre la distribución de esta proteína en la levadura de fisión, nos indicó su presencia en distintas localizaciones subcelulares, lo que sugería posibles funciones relacionadas con procesos tan diversos como la mitosis, la endocitosis o la polaridad celular (74,75). Una cuestión intrigante era cómo una pequeña subunidad catalítica como la de proteína fosfatasa-1 (PP1), podía interactuar con un número tan grande y diverso de subunidades reguladoras que no estaban relacionadas estructuralmente, y que tenían funciones diferentes. El trabajo de varios grupos entre ellos el nuestro, arrojó el resultado, de que la mayoría de las llamadas subunidades reguladoras comparten entre sí, una pequeña secuencia en común, un motivo pequeño de solo 4-5 aminoácidos, por el que se unen a una hendidura de la estructura globular de la subunidad catalítica, en un dominio opuesto al centro activo. La interacción de este

motivo de aminoácidos, el motivo RVXF, representa el sitio de anclaje para todas las proteínas reguladoras y ello llevó a nuestro colaborador Mathieu Bollen, a proponer un control combinatorio, basado en la competición de diferentes proteínas reguladoras por este sitio en el enzima, y la formación de una gran variedad de holoenzimas con actividades y especificidades de sustrato diferentes. Este modelo ha proporcionado un esquema de carácter general para la comprensión del control hormonal y metabólico de PP1, que se lleva a cabo no por una actividad directa sobre la subunidad catalítica sino a través de la fosforilación de las subunidades reguladoras o por su interacción con efectores alostéricos (76).



**Figura 10.** Estructura de los holoenzimas de las principales clases de proteína fosfatasas.

El concepto de “sitio de anclaje” es importante para entender la especificidad de muchas proteína quinasas y fosfatasas. Desde que Fisher formuló su celebre hipótesis de “la llave y la cerradura” a finales del siglo XIX, para explicar el modo de acción de los enzimas, los bioquímicos hemos considerado que la especificidad de sustrato de un enzima, esta determinada en primer término, por la complementariedad estereoquímica entre el sitio activo y el sustrato. Sin embargo, las serina/treonina fosfatasas (y quinasas) se caracterizan por tener

superficies diferentes del centro activo, que tienen un papel importante en el reconocimiento del sustrato. Así, muchas proteína quinasas y fosfatasas tienen como PP1 sitios secundarios de reconocimiento referidos como sitios de anclaje. Esto conduce a un aumento en especificidad y en selectividad sin alteración y compromiso del sitio activo.

Las proteínas que se asocian de este modo, en el caso de PP1, no solo son reguladoras de la actividad de PP1, sino que también, arrastran a la subunidad catalítica a diferentes compartimentos celulares, y contribuyen de este modo, a localizar distintas fracciones de la fosfatasa, en diferentes compartimentos celulares, en relación con los procesos biológicos catalizados. En esta línea, la identificación de nuevas subunidades adquiere una gran importancia, y nosotros hemos podido identificar dos nuevas subunidades, que dirigen a la subunidad catalítica PP1 a nuevas localizaciones, como en el caso de la proteína SIPP1 que define un nuevo papel de PP1 en relación con la maduración de mRNA (77,78) o de Wsh3, una proteína quinasa implicada en la polaridad de *S.pombe* (75).

En la actualidad, se conocen mas de 65 genes de mamífero que codifican para proteínas de interacción con PP1 (Tabla 3).

**Tabla3. Moduladores de PP1**

Moduladores	Isoformas y homólogos
AKAIs	Inhibidor-1, DARPP32, PPP1R1C
AKAP149	-
AKAP220	-
AKAP450	AKAP450/AKAP350/CG-NAP/Yotiao
ASPPs	ASPP1,ASPP2/p53BP2
Aurora quinasas	Aurora-A,Aurora-B,Ip1(Y)
Bcls	Bcl-2,Bcl-x <sub>L</sub> , Bcl-w
BH-protocadherina	-
Bifocal (D)	-
Cdc25	-
Focal adhesión quinasa	-
GADD34s	GADD34,ICP34.5/γ <sub>1</sub> 34.5,CreP
Gip1(Y)	-
Grp78	-
G-sustrato	-



G-subunidades	G <sub>M</sub> ,G <sub>L</sub> ,G <sub>C</sub> ,G <sub>D</sub> ,G <sub>E</sub> ,G <sub>F</sub> ,G <sub>C</sub> , Gac1(Y),Pig2(Y)
Host-cell-factor	-
Hox11	-
PP2A inhibidores	I <sub>1</sub> <sup>PP2A</sup> /PHAP-I; I <sub>2</sub> <sup>PP2A</sup> /SET/PHAP-IL/TAF-1β
Inhibidor-2	Inhibidor-2,Glc8(Y)
Inhibidor-3	Inhibidor-3/HCG-V, Yfr003c(Y)
Klp38B(D)	-
MYPTs	MYPT1/M110/M130,MYPT2/M20
N-CoR	-
Mek2	-
Neurabinas	Neurabina-I,Neurabina-II/espinofilina
Neurofilamento-L	-
NIPP1	NIPP1/Ard1
Pan 1(Y)	-
Phactrs	Phactr-1,2,3
PHIs	PHI-1/2,CPI-17,KEP1
Fosfofructoquinasa	-
PKR	-
PRIP-1	PRIP-1/p130
Proteína quinasa R	-
PNUTS	PNUTS/R111/p99
PP-1bp80	-
PSF	-
Regs(Y)	-
Retinoblastoma	-
Ribosoma L5	-
RIPP1	-
SARAs	SARA, Endofin
Scd5(Y)	-
Sds22	Sds22/Egp1
Sla1(Y)	-
SNF5	SNF5/INI1
SIPP1	SNP70/NpwBP
Staufen	-
Tau	-
Trithorax	-
TIMAPs	-
Receptor Vitamina D <sub>3</sub>	-

**Tabla3.** Proteínas que interaccionan con PP1. La primera columna muestra en orden alfabético los nombres generales de familias de reguladores de PP1 o el de un representante. Reguladores de levadura y *Drosophila* se designan por (Y) y (D). En la segunda columna los nombres de isoformas y homólogos están separados por / mientras que sinónimos y homólogos están separados por un guión.

En resumen, los estudios sobre PP1 indican, que se trata de un enzima multifuncional, que es dirigido por la especificidad de subunidades asociadas y que regula el retorno al estado basal, tras la activación de vías señalización activadas por proteína quinasas (70).

El modo de funcionamiento de PP1, proporciona también un modelo por el que se rigen otras fosfatasas, como por ejemplo PP2A, que regula el desarrollo embrionario, el cáncer, la apoptosis y los ritmos circadianos entre otros. Análogamente a PP1, PP2A tiene también múltiples proteínas reguladoras. Una particularmente interesante, es el antígeno t del virus del poliovirus, que produce tumores, y ha sido empleado como modelo de tumorigénesis. Este virus, codifica dos proteínas: el antígeno T (grande) y el antígeno t (pequeño). Mientras que el antígeno T (grande) contribuye a la tumorigénesis al unirse a p53 y a la proteína de retinoblastoma, Rb, la función del antígeno t (pequeño) es unirse a la subunidad reguladora de PP2A desplazando a otras proteínas. Otros miembros de esta subfamilia de proteínas se han relacionado con la respuesta celular a agentes genotóxicos (72).

En cuanto a la superfamilia de tirosina fosfatasas se sabe, que hay aproximadamente 100 proteína tirosina fosfatasas (PTP) humanas, que en comparación con las 90 tirosina quinasas calculadas, indica que los niveles de complejidad entre las dos familias son similares. El dominio catalítico de PTP, consta de 280 residuos y se define por varios motivos de secuencia, en particular la secuencia-marca H<sub>3</sub>CX(5)R, que está presente en todas las PTP y que funciona como un lazo con capacidad de unión en el sitio activo. Las clásicas tirosina fosfatasas, incluyen a una clase de proteínas, que son receptores de membrana, y tienen la potencialidad de regular vías de señalización como las tirosina quinasas. Muchas tirosina fosfatasas de tipo receptor, tienen propiedades de moléculas de adhesión celular, en sus dominios extracelulares (68).

Existen también tirosina fosfatasas citoplásmicas que contienen secuencias reguladoras que regulan su propia actividad. Estas secuencias no catalíticas también regulan la localización subcelular, y de manera indirecta, su actividad al restringir el acceso del enzima a sustratos determinados.

Las PTP no solo tienen la capacidad de funcionar como inhibidores de las vías de señalización dependientes de P-Tir, sino que actúan también, como reguladores positivos, como en el caso de CD45. Varias PTP, se han identificado, como productos de genes supresores de tumores. En particular, la sobreexpresión de la proteína cdc25 ha sido detectada en muchos cánceres. Recientemente también se ha descrito un oncogén que es una PTP. Del mismo modo que varios componentes del complejo PI3K son diana de rutas de cáncer como el supresor de tumores PTEN, hay ahora una variedad de síndromes que se explican por una regulación aberrante de la vía Ras-MAPK, como el gen PTPN11 que codifica la PTP SHP2 que contiene un dominio SH2.

La regulación anormal de miembros de la superfamilias de PTP está asociada con otras enfermedades diferentes del cáncer. Así la PTP 1 es un factor de riesgo para enfermedades autoinmunes además de diabetes tipo I, artritis reumatoide y SLE. Esta proteína se expresa en células sanguíneas como un inhibidor de la activación de células T.

### **La inhibición de quinasas y fosfatasa y nuevos fármacos**

Conocer los principios de la organización de las rutas de señalización tiene una aplicación importante en el diseño de nuevos fármacos.

Si como hemos mencionado anteriormente 1/3 de todas las proteínas celulares están fosforiladas y aproximadamente un 3% de todos los genes son quinasas o fosfatasa, no es sorprendente, que la fosforilación anormal de proteínas, sea en muchos, casos causa de enfermedad (8). Así, un número importante de mutaciones en genes que codifican para proteína quinasas y fosfatasa, son la causa directa de algunas enfermedades, como se refleja en la Tabla 4.

La identificación de dianas específicas y la búsqueda de inhibidores de quinasas y fosfatasa, es por tanto, un campo de gran interés.

Algunas toxinas naturales, han resultado ser, inhibidores de fosfatasa tipo 1 y 2A. Así, el llamado ácido okadaico y sustancias

relacionadas, son la causa principal de las diarreas producidas por moluscos marinos (79). Estas sustancias, son producidas por dinoflagelados, que al ser ingeridos por moluscos, los acumulan en sus glándulas digestivas. La infección de “granjas de moluscos” por dinoflagelados que sintetizan ácido okadaico, ha causado serios problemas a la industria marisquera en varios países europeos incluido España.

**Tabla 4. Enfermedades causadas por mutaciones en proteína quinasa y fosfatasa.**

Enfermedad	Quinasa/Fosfatasa
Distrofia muscular miotónica	Miotonin proteína quinasa
Aganmaglobulinemia ligada a cromosoma X	Tirosina quinasa Bruton
Enfermedad de Hirschpringís	Quinasa Ret 2
SCID autosómico recesivo	Quinasa Zap 70
SCID ligada a cromosoma X	Jak 3 quinasa
Craniosinostosis	FGFR quinasa
Cáncer papilar renal	Met receptor quinasa
Leucemia mielomonocítica crónica	PDGFR Tel quinasa
Leucemia mielógena crónica	Abelson tirosina quinasa
Linfoma no Hodking	Alk quinasa
Síndrome Peutz-Jeghers	lkb 1 quinasa
Síndrome Coffin- Lowry	RSK-2 quinasa
Ataxia telengectasia	ATM quinasa
Síndrome Li-Fraumeni	Chk2 quinasa
Síndrome de Williams	Lim 1 quinasa
Diabetes Lepreshaunism	Receptor insulina quinasa
Síndrome Wolf-Parkinson-White	AMP quinasa
Síndrome Wolcott-Rallison	eIF2A quinasa 3
Miopatía miotubular ligada a cromosoma	X MTM 1 tirosina fosfatasa

Análogamente, el péptido heptacíclico microcistina, producido por las algas verde azuladas, es otro potente inhibidor de fosfatasa 1 y 2, y es también, una poderosa toxina que afecta al hígado y al sistema nervioso (80). Las cianobacterias que producen microcistina y sustancias relacionadas, crecen en depósitos de agua potable, y constituyen una amenaza para la salud pública, ya que la dosis letal humana es tan solo de 5 mg. Así, hace algunos años, 60 pacientes de una unidad de hemodiálisis en Brasil, perecieron por envenenamiento con microcistina, por el uso de agua contaminada con esta cianobacteria (81).

A dosis aún mas pequeñas, la microcistina es uno de los carcinógenos mas potentes que se conocen y se piensa, no sin razón, que la elevada incidencia de cáncer de hígado en ciertas partes de China, puede estar relacionada, con los niveles de microcistina en el sistema de agua de bebida (82).

La fosforilación anormal de proteínas es también la causa de enfermedades de alta incidencia como cáncer, diabetes o artritis reumatoide. Sin embargo, la idea de cómo quinasas y fosfatasas pueden ser empleadas como dianas celulares para estas enfermedades, ha tardado mucho en ser desarrollada. En los años 90 la situación empezó a cambiar cuando se conoció el mecanismo de acción de la ciclosporina. La ciclosporina, como muchos recordarán, es la sustancia inmunosupresora que hizo posible el trasplante de órganos. Se sabía desde hacia tiempo, que la ciclosporina se unía a una proteína celular denominada ciclofilina, pero en 1990, Stuart Schreiber encontró, que el complejo ciclosporina-ciclofilina era un potente inhibidor de la proteína fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina llamada también PP2B o calcineurina (83). La inhibición de esta fosfatasa, impide la defosforilación del factor nuclear de células T activadas o NFAT, un factor de transcripción, que es necesario para la producción de IL-2 y por tanto, de la proliferación de células T.

Otro inmunosupresor, el FK506 fue descubierto de una manera similar. El FK506 interacciona con una proteína que recibe el nombre de *FK506 binding proteín* o FKBP, y el complejo FK506-FKBP inhibe a continuación a PP2B.

La sustancia inmunosupresora rapamicina, también se une a FKBP, pero el complejo rapamicina-FKBP no inhibe a PP2B. En su lugar inhibe a la proteína quinasa m-TOR, un miembro de la familia de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que es necesaria para la proliferación de células T dependiente de IL-2. La rapamicina tiene menos efectos secundarios que la ciclosporina, y es por tanto, preferida para la prevención del rechazo en el trasplante de riñón.

Ciclosporina y rapamicina fueron los primeros fármacos utilizados en clínica que ejercían su efecto, por inhibición de una proteína fosfatasa o una proteína quinasa. Sin embargo, no fueron descubiertos

como consecuencia de este conocimiento, sino como es mas frecuente, de una manera empírica. Los intentos para el desarrollo de nuevos fármacos que inhiben a proteína quinasas o fosfatasa, basados en el conocimiento de su estructura 3D o de sus papeles fisiológicos o patológicos, es mucho mas reciente y ha avanzado sobre todo en campos como el cáncer o la diabetes.

### Inhibidores de proteína quinasas en el tratamiento del cáncer

Los factores de crecimiento como EGF y PDGF activan la cascada de MAPK que es necesaria para la proliferación de algunas células y la diferenciación de otras. Sin embargo, como es bien conocido, la activación descontrolada de esta ruta es causa de cáncer. Esto ocurre como resultado de la sobreexpresión del receptor de tirosina quinasa, o su mutación a una forma constitutiva, o bien, por la mutación de Ras a una forma constitutiva oncogénica, algo que ocurre en 25% de los cánceres. Adicionalmente la proteína Raf, otro miembro de esta cascada fue descubierta como un oncogén vírico.

El receptor tirosina quinasa de EGF (EGFR) está sobreexpresado en algunos cánceres de origen epitelial, como el cáncer de mama o de pulmón. Varios fármacos inhibidores de esta proteína quinasa se han desarrollado recientemente y se encuentran hoy en uso en la práctica clínica (Tabla 5). Así en 2004, dos compuestos llamados respectivamente Iressa y Tarceva ambos inhibidores de la tirosina quinasa EGFR fueron aprobados como agentes anticáncer.

La estructura de las proteína quinasas ha sido también importante para la elaboración de anticuerpos monoclonales contra EGFR como fármacos anticáncer. La Herceptina es un anticuerpo aprobado para su uso en el cáncer de mama. La Herceptina se une al dominio extracelular de EGFR donde interfiere con la señalización. Otro anticuerpo llamado Erbitux compite con la región de unión de EGF al receptor pero manteniéndolo en su conformación inactiva y por tanto evitando una respuesta (84).

Otra aproximación interesante en el tratamiento del cáncer es la basada en la idea Judah Folkman de destruir el aporte de sangre a un

tumor. La formación de vasos sanguíneos alrededor de un tumor o angiogénesis, depende de factores de crecimiento como PDGF, FGF y VEGF y el desarrollo de inhibidores de la actividad tirosina quinasa de receptores de VEGF, ha tenido lugar con rapidez en los últimos años (85). Así, recientemente se ha aprobado el anticuerpo anti-VEGF, Avastina, que se une al factor de crecimiento en un sitio próximo al sitio de unión al receptor, evitando la interacción.

**Tabla 5. Inhibidores de Protein quinasas aprobados como fármacos, quinasas inhibidas y uso clínico**

Nombre	Año	Diana celular	Uso clínico
Gleevec	2001	Bcr-abl tirosina quinasa c-kit quinasa	Leucemia mieloide crónica (CML)
Iressa	2003	EGFR tirosina quinasa (Her) o Erb-1	Non small cell cancer de pulmon (NSCL)
Tarceva	2004	EGFR tirosina quinadsa	Cancer de Pancreas
Nexavar	2005	C-VEGFR, PDGFR, p38	Cancer renal
Student	2006	Multiples RTK (PDGRF y VEGFR)	GIST y carcinoma renal
BMS	2006	Src-Abl tirosina quinasa	Leucemia mielode crónica (CML) y Leucemia linfoblastica aguda (ALL)

El primer fármaco inhibidor de una proteína quinasa aprobado fue el Fasudil, un inhibidor de Rho quinasa para el tratamiento del vasoespasma cerebral, pero sin duda, el más conocido, es el compuesto llamado Gleevec o Imatinib, que inhibe la tirosina quinasa Abelson, y se utiliza con éxito en la terapia de la leucemia mieloide crónica. Gleevec fue descubierto alrededor de 1992 pero debido a la baja incidencia de la CML no se dio mucha importancia al descubrimiento, hasta que se comprobó, su extraordinaria eficacia y ausencia de efectos secundarios. Aunque Gleevec es relativamente específico del oncogén Abl, también inhibe a otros oncogenes como c-Kit y PDGFR que son también tirosina quinasas, y por ello se ha considerado su posible uso en otros cánceres. Así, recientemente, se ha aprobado Gleevec para el tratamiento de tumores gastrointestinales del estroma, por sus propiedades inhibidores

frente al oncogén *c-Kit*. De este modo, la reactividad cruzada de los inhibidores de quinasas, que era algo considerado inicialmente como un inconveniente, resulta ahora ventajoso.

La activación de la cascada de MAPK conduce a que células quiescentes entren en el ciclo de división celular en el que un número de quinasas dependientes de ciclina desempeña papeles esenciales. Uno de los primeros inhibidores de CDK la Roscovitina fue desarrollado por Laurent Meijer como un inhibidor de CDK. Otros inhibidores más específicos desarrollados recientemente se encuentran en un estado de desarrollo preclínico. Es interesante señalar, que ciertos colorantes del tipo de la indirubina que son los ingredientes activos en un antiguo remedio chino, han resultado ser también potentes inhibidores de CDK.

Estos compuestos habían sido empleados durante siglos para el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer. Así pues y sin darnos cuenta, inhibidores de CDK pueden haber estado en uso clínico desde hace muchos años.

### Inhibidores de quinasas en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria crónica

Durante la infección bacteriana el llamado lipopolisacárido (LPS) un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, estimula a las células del sistema inmune para producir citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 1 (IL-1). Estos compuestos, son liberados a la circulación, donde estimulan a otras células, para producir otras citoquinas, como IL-6, TNF, IL-1, que colaboran en el montaje de la respuesta inmune para eliminar las bacterias invasivas. Sin embargo, este mecanismo de defensa, es como una espada de doble filo, debido, a que la producción descontrolada de citoquinas proinflamatorias es la causa de enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del colon o la psoriasis. La producción descontrolada de TNF, es también la causa del shock séptico. Por esta razón, muchas compañías farmacéuticas buscan el desarrollo de compuestos capaces de suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias. Hace algunos años se encontró, una clase nueva de sustancias derivadas del piridinil imidazol que suprimían la



producción de TNF por LPS en monocitos, y que resultaban eficaces, en ensayos animales de enfermedad inflamatoria crónica (86). La diana celular de este compuesto resultó ser la proteína quinasa p38, un miembro de las MAPK que son inducidas por shock osmótico. Su eficacia puede estar relacionada con su capacidad de suprimir acciones de TNF así como su síntesis. De manera semejante, otras MAPK constituyen otro grupo de quinasas diana para muchas líneas de desarrollo de nuevos fármacos (87,88).

### Inhibidores de quinasas y fosfatasas en el tratamiento de la diabetes y el infarto

El descubrimiento de la insulina, fue sin duda uno de los grandes avances biológicos y médicos del siglo XX. Sin embargo el conocimiento a nivel molecular de como la insulina produce sus efectos en la homeostasis de la glucosa y en el metabolismo ha resultado ser más difícil de lo previsto, en palabras de Philip Cohen, “una nuez difícil de cascar” (89). A grandes rasgos, la ruta de señalización por insulina, comienza con la autofosforilación del receptor de insulina que es una tirosina quinasa, y a través de varias etapas, culmina en otra proteína quinasa que se conoce como PKB/Akt, la cual fosforila e inhibe, la glucógeno sintasa quinasa 3, una proteína quinasa que hemos mencionado ya anteriormente (90). Como consecuencia, la glucógeno sintasa y el factor de iniciación de la síntesis proteica eIF2B, son defosforilados y activados, contribuyendo así, a la estimulación de la síntesis de glucógeno y de proteínas.

La llamada diabetes tipo II o diabetes resistente a insulina, que es responsable del 90% de todos los casos de diabetes, se caracteriza por la incapacidad de los tejidos a responder a la insulina secretada por el páncreas. Por ello, el desarrollo de fármacos para combatir la diabetes tipo II, se ha centrado, en componentes de la ruta de señalización de insulina cuya inhibición imite en su acción, a la insulina. Dado que la insulina induce la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa (GSK3), se puede esperar, que compuestos capaces de inhibir esta proteína quinasa imiten algunas de las acciones de la insulina, tales como, las de estimular la glucógeno sintasa y contrarrestar la resistencia a la insulina. Con esta idea algunas compañías farmacéuticas como Smith Kline Beecham, han

desarrollado compuestos que estimulan la actividad de glucógeno sintasa y la conversión de glucosa en glucógeno. Recientemente se han descrito inhibidores de GSK3 capaces de disminuir los niveles de glucosa in vivo (91). Tan prometedores parecían estos resultados, que, según se dice, cuando SmithKline Beecham se fusionó con Glaxo, la nueva compañía se denominó GSK (que precisamente son las siglas de la glucógeno sintasa quinasa).

Los inhibidores de GSK3 desarrollados por GSK, no solo imitan la estimulación de la síntesis de glucógeno por insulina, sino que también, evitan la apoptosis de células neuronales, inducidas por la eliminación de factores de supervivencia del medio, o por bajada de la concentración extracelular de iones potasio. Estas observaciones, sugieren que los inhibidores de GSK3, pueden tener también interés terapéutico, en la prevención de la apoptosis neuronal tras un infarto. En comparación con la diabetes, esta aplicación requeriría un tratamiento mucho más corto y el empleo de inhibidores de GSK3 implicaría un riesgo mucho menor.

En resumen y hasta la fecha, al menos seis inhibidores de proteína quinasas y un inhibidor de proteína fosfatasa (ciclosporina), se utilizan eficazmente en la clínica, y más de 23 se encuentran en fase de ensayos clínicos. Como consecuencia de estos desarrollos las proteína quinasas constituyen hoy el segundo grupo más importante de dianas terapéuticas celulares, después de los receptores acoplados a proteínas G.

La mayoría de los inhibidores de proteína quinasas desarrollados, son inhibidores competitivos de ATP, y presentan el problema, de que muchas proteína quinasas tienen una  $K_m$  para el ATP del orden de 10  $\mu M$ . Por ello el énfasis actual, se centra en el desarrollo de compuestos que se unan a formas inactivas de proteína quinasas o que impidan que una proteína quinasa active a otra.

Finalmente hay que mencionar que muchos inhibidores de proteína quinasas son también importantes como reactivos y que pueden ayudar a entender los papeles fisiológicos de otras quinasas. Así, los inhibidores que no pueden ser usados en tratamientos clínicos por su elevada toxicidad, pueden ser extremadamente útiles en la investigación.

## **Las interacciones entre dominios y la fosforilación reversible pueden explicar procesos complejos**

### Interruptores, Dimensión temporal y Memoria

Hasta aquí, hemos visto que principios generales, tales como las modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína, pueden dar lugar a respuestas biológicas específicas en el ambiente poblado del interior de una célula llena de moléculas.

Podemos preguntarnos sin embargo, si este esquema sencillo, puede dar respuesta, a aspectos más complejos de la comunicación celular, como los que representan, la integración de señales múltiples, o los que incorporan la dimensión temporal en algunos procesos biológicos.

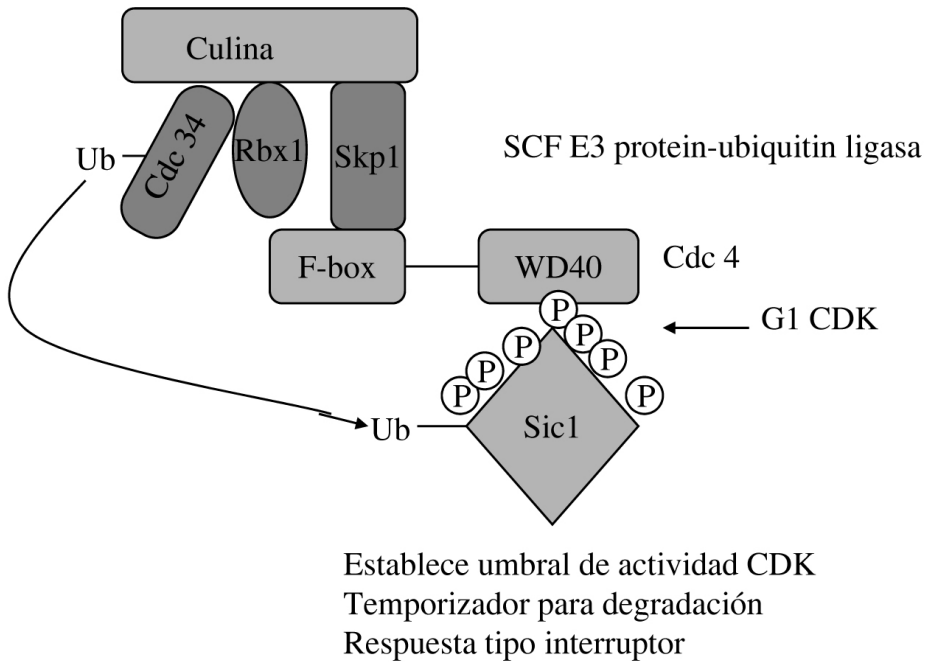
La regulación del proceso de polimerización y ramificación de la actina por las proteínas modulares WASP/N–WASP proporciona un ejemplo de regulación compleja. Así, el extremo C terminal de WASP es capaz de interactuar constitutivamente con el complejo Arp2/3 y promover la polimerización de actina, pero es inhibido en la proteína completa por una interacción intramolecular con el extremo N-terminal (92). Esta inhibición, puede ser revertida por la unión de la GTPasa Cdc42 a un dominio de unión (GBD) situado en la región N-terminal, lo que induce una reorganización conformacional que libera el extremo C-terminal activo.

Al integrar varias señales convergentes, por un lado, se suprime el “ruido” que pueden representar ciertas señales débiles, y por otro, permite una respuesta de tipo interruptor. La proteína WASP se regula también por fosforilación en Y291 dentro del dominio GBD. La fosforilación de Y291 detecta señales procedentes de Cdc42 y de tirosina quinasa, y dirige una respuesta de larga duración a agonistas transitorios, proporcionando a WASP una especie de memoria molecular. Así pues, la integración de señales diferentes no solo no es, incompatible con el esquema propuesto, sino que está implícito en el comportamiento complejo de algunas proteínas de señalización.

Las transiciones a través del ciclo celular, proporcionan también, una manera, de probar la existencia de una dimensión temporal en algunos procesos biológicos. El tiempo, es un aspecto esencial de la organización celular, especialmente en procesos como los del ciclo celular, en los que los sucesos deben tener lugar de una manera ordenada. ¿Cómo pueden las interacciones proteína-proteína y la fosforilación reversible contribuir a esta organización temporal?

En la fase G1 del ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae*, la quinasa dependiente de ciclina de fase G1, CDK, fosforila a Sic1, un inhibidor de CDK, esto es, de la actividad necesaria para el paso a fase S (93). La fosforilación de Sic1 en residuos serina/treonina, es necesaria para su unión a la proteína E3 ubiquitina ligasa, que media su degradación en el proteosoma, y por tanto, libera de la inhibición a CDK, y permite la progresión del ciclo celular.

Es interesante destacar que Sic1 debe ser fosforilado en seis sitios diferentes para su reconocimiento por el complejo ubiquitina-proteosoma. La última de estas fosforilaciones actúa como un interruptor, disparando todo el proceso. Toda una variedad de datos, sugieren que esta multifosforilación representa un umbral para la CDK, que debe ser sobrepasado, para el paso a la fase S del ciclo, y que al mismo tiempo, representa una especie de señal ultrasensible para la degradación de Sic1. Si Sic1 fuera modificado de manera, que solo fuera necesaria una fosforilación para su unión al complejo de degradación, entonces, la entrada en fase S tendría lugar de forma prematura, dando lugar a inestabilidad del genoma. De este modo, la dependencia de la unión de Sic1 al complejo de ubiquitinación, de la fosforilación múltiple, proporciona así un sensor de tiempo, que permite a las células establecer las condiciones ideales para la entrada en fase S (Figura 11).



**Figura 11.** La fosforilación multisitio de Sic1 (inhibidor de CDK de fase S) por CDK de G1 es necesaria para la unión del dominio WD40 de Cdc4, un componente del complejo SCF E3 proteína-ubiquitina-ligasa. Esto establece un umbral para la actividad CDK de G1 necesario para el tránsito por G1, junto con un interruptor muy sensible para la degradación de Sic1.

## Afinidad y especificidad

En las redes de señalización, no se puede decir que haya una afinidad óptima para interacciones proteína-proteína, sino más bien un rango amplio de constantes de disociación, diseñadas para distintas formas de regulación biológica. Es natural pensar que interacciones fuertes de tipo proteína-proteína, proporcionan un alto grado de especificidad y por tanto son más relevantes, biológicamente, que interacciones de baja afinidad.

Las interacciones fuertes, suelen ser de larga duración y pueden ser ventajosas en ciertos casos, como en el de la localización de una PKA inactiva, a AKAP en espera de la llegada de la señal de cAMP. Sin

embargo, tales interacciones fuertes, no pueden proporcionar la flexibilidad que la célula precisa para responder de forma dinámica a las condiciones cambiantes del exterior o a los programas internos de la propia célula. En cambio, interacciones proteína-proteína que son dependientes de modificaciones post-traduccionales como fosforilación, presentan afinidades más débiles, dado que mucha de la energía de unión procede del residuo modificado. Estas afinidades débiles (en el rango micro molar) no solo no significan ausencia de afinidad, sino que por el contrario proporcionan gran flexibilidad (94).

En resumen, mientras que la especificidad *in vivo* puede ser generada por simples interacciones binarias es probable que muchos complejos de señalización utilicen contactos múltiples para asegurar fidelidad. A este fin, dominios individuales pueden ser combinados en un mismo polipéptido para generar control alostérico de proteínas de señalización y complejos multiproteicos.

## **El Futuro: Redes y Sistemas**

En resumen, las modificaciones post-traduccionales y las interacciones proteína-proteína proporcionan una especie de lente, a través de la cual, podemos investigar cómo los complejos multiproteicos del interior celular se ensamblan, y se conectan para formar redes de comunicación. Experimentalmente, el llamado sistema de dos híbridos y la espectrometría de masas, han sido los métodos más empleados, para detectar interacciones proteína-proteína y modificaciones a gran escala, en organismos sencillos como la levadura, *C.elegans* y *Drosophila*.

En general, los datos que resultan, revelan complejos de proteínas altamente conectadas que requieren relativamente pocos enlaces para conectarse entre sí, y que estos complejos se encuentran distribuidos en una red más amplia, organizada más al azar. Tales redes, facilitan la comunicación entre elementos distintos de la célula, de manera que se pueden organizar subsistemas celulares, en unidades funcionales, y responder así, a las condiciones cambiantes, de una manera coherente. El problema es que las redes lineales a las que los bioquímicos estábamos acostumbrados, no resultan ya adecuadas para examinar fenómenos más

complejos como las redes de comunicación celular. Tenemos por tanto que pasar a considerar redes de varias dimensiones.

La comparación entre los datos de interacción entre diferentes especies, el llamado “complexoma”, puede ser muy valioso para identificar sistemas subcelulares conservados en especies diferentes. Aunque las reglas que subyacen bajo las redes celulares de señalización tienen que ser establecidas con mayor claridad, algunas claves han empezado a ser desveladas a partir de los análisis de los factores de transcripción en levaduras.

La integración de datos proteómicos a gran escala, con los análisis de transcripción, y con las interacciones genéticas, promete aportar una ayuda poderosa en la comprensión de cómo las células trabajan en estados de normalidad y de enfermedad, y pueden proporcionar nuevas maneras de modificar la función celular, que sean valiosas, desde el punto de vista terapéutico.

Por otra parte, es preciso reconocer que los estudios proteómicos actuales, nos dan solamente una visión estática de un medio ambiente celular, que es en realidad extraordinariamente dinámico. Es importante por tanto, conocer con más detalle la manera en la que proteínas de señalización se juntan en combinaciones distintas, en diferentes células e incluso en una sola célula. Este tipo de análisis, va a requerir una bioquímica de células individuales, nuevas técnicas analíticas, para seguir la composición cambiante de complejos multiproteicos en las células vivas y el modelado por ordenador para extraer el significado biológico del comportamiento dinámico.

La visualización por técnicas de imagen del movimiento, interacciones y localización de proteínas será especialmente importante. Pequeñas etiquetas fluorescentes, del tamaño de nanómetros, pueden ahora ser usados para rastrear la dinámica de las proteínas en periodos de tiempo prolongados *in vivo*.

La comprensión de las reglas por las que las células operan y cooperan hace pensar en la posibilidad de llegar a construir funciones celulares nuevas. Puede entreverse así una era futura de biología sintética en la que se diseñen vías de señalización artificiales, y en las que la

propia habilidad de las células, pueda llegar a ser reforzada para combatir la enfermedad.

## **Epílogo**

En resumen, un principio que subyace en la organización de los sistemas de comunicación celular es que algunas proteínas, llamadas proteínas de señalización, son reclutadas, a partir del fluido denso, que constituye el interior de las células, en complejos multiproteicos, que se asocian, formando redes de interacción. El uso de dominios modulares de interacción proteína-proteína, proporciona un mecanismo, a través del cual, pueden evolucionar nuevas rutas y funciones, y las posibilidades de conexión entre proteínas puede ser aumentada. En este contexto, la fosforilación de proteínas representa un mecanismo flexible y dinámico para regular las interacciones entre proteínas, y las proteína quinasas y fosfatasa parecen bien adaptadas para esta función. Las estrategias empleadas por quinasas y fosfatasa implican una separación física entre elementos de la proteína que llevan a cabo funciones catalíticas y elementos de conexión. El intercambio de dominios modulares facilita la evolución de nuevas conexiones en las rutas de señalización.

Las interacciones entre proteínas, aunque relativamente simples cuando se consideran de manera aislada, proporcionan una regulación muy sofisticada, dirigiendo la activación de interruptores moleculares o proporcionando instrumentos que supervisan la actividad celular. Las proteínas de la señalización se encuentran pues organizadas en complejos y redes que se encuentran involucrados en muchos aspectos de la actividad celular. El sistema tiene su talón de Aquiles, en el sentido de que puede ser imitado por patógenos microbianos y proteínas oncogénicas dando lugar a un comportamiento anormal.

En este contexto, la fosforilación anormal de proteínas de señalización, es causa de enfermedad. Un interés creciente en el desarrollo de inhibidores de proteína quinasas y fosfatasa activos por vía oral, ha culminado en la aprobación de un número de fármacos para uso clínico. Las proteína quinasas y fosfatasa han llegado a constituir así el segundo grupo más importante de dianas celulares para la industria farmacéutica.

He dicho.



## Bibliografia

1. BRENNER, S. (2002) Nature Gift's to Science. Nobel Lecture
2. SCHRÖDINGER, E. (1943) What is Life? Cambridge University Press. Cambridge
3. MARKS, F. (1996) Protein Phosphorylation. Weinheim: VCH
4. LIPMANN, F., and LEVENE, P. (1932) Serinphosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J Biol Chem.* 98: 109-114
5. BURNETT, G., and KENNEDY, E. P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem.* 211: 969-980
6. FISCHER, E. H., and KREBS, E. G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem.* 216: 121-132
7. SUTHERLAND, E. W., JR., and WOSILAIT, W. D. (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature.* 175: 169-170
8. COHEN, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* 268: 5001-5010
9. HUBBARD, M. J., and COHEN, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *TIBS.* 18: 172-177
10. SEFTON, B. M., and HUNTER, T. (1998) Protein Phosphorylation. Academic Press. San Diego
11. LANDER, E. S., et al.. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409: 860-921
12. HUNTER, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell.* 50: 823-829
13. MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., and SUDARSANAM, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298: 1912-1934
14. MARTIN, G. S. (1970) Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature.* 227: 1021-1023
15. STEHELIN, D., VARMUS, H. E., BISHOP, J. M., and VOGT, P. K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 260: 170-173

16. BRUGGE, J. S., and ERIKSON, R. L. (1977) Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*. 269: 346-348
17. LEVINSON, A. D., OPPERMAN, H., LEVINTOW, L., VARMUS, H. E., and BISHOP, J. M. (1978) Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell*. 15: 561-572
18. ECKHART, W., HUTCHINSON, M. A., and HUNTER, T. (1979) An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell*. 18: 925-933
19. HUNTER, T., and SEFTON, B. M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 1311-1315
20. COURTNEIDGE, S. A., and SMITH, A. E. (1983) Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature*. 303: 435-439
21. WITTE, O. N., DASGUPTA, A., and BALTIMORE, D. (1980) Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. *Nature*. 283: 826-831
22. USHIRO, H., and COHEN, S. (1980) Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*. 255: 8363-8365
23. EK, B., WESTERMARK, B., WASTESON, A., and HELDIN, C. H. (1982) Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature*. 295: 419-420
24. DOWNWARD, J., YARDEN, Y., MAYES, E., SCRACE, G., TOTTY, N., STOCKWELL, P., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., and WATERFIELD, M. D. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*. 307: 521-527
25. HUNTER, T., and COOPER, J. A. (1981) Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell*. 24: 741-752
26. WATERFIELD, M. D., SCRACE, G. T., WHITTLE, N., STROOBANT, P., JOHNSON, A., WASTESON, A., WESTERMARK, B., HELDIN, C. H., HUANG, J. S., and DEUEL, T. F. (1983) Platelet-derived growth factor is

- structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature*. 304: 35-39
27. DOOLITTLE, R. F., HUNKAPILLER, M. W., HOOD, L. E., DEVARE, S. G., ROBBINS, K. C., AARONSON, S. A., and ANTONIADES, H. N. (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*. 221: 275-277
  28. KEMP, B. E., BYLUND, D. B., HUANG, T. S., and KREBS, E. G. (1975) Substrate specificity of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72: 3448-3452
  29. HELDIN, C. H., OSTMAN, A., and RONNSTRAND, L. (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1378: F79-113
  30. HELDIN, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 80: 213-223
  31. HUNTER, T. (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell*. 100: 113-127
  32. PAWSON, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373: 573-580
  33. KURIYAN, J., and COWBURN, D. (1997) Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 26: 259-288
  34. YAFFE, M. B., and ELIA, A. E. (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*. 13: 131-138
  35. PAWSON, T., RAINA, M., and NASH, P. (2002) Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett*. 513: 2-10
  36. PAWSON, T., and NASH, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 300: 445-452
  37. SADOWSKI, I., STONE, J. C., and PAWSON, T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol*. 6: 4396-4408
  38. PAWSON, T., and SCOTT, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 278: 2075-2080

39. MAYER, B. J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* 114: 1253-1263
40. ZARRINPAR, A., and LIM, W. A. (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol.* 7: 611-613
41. SHENG, M., and SALA, C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* 24: 1-29
42. WANG, X., MCLACHLAN, J., ZAMORE, P. D., and HALL, T. M. (2002) Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell.* 110: 501-512
43. YAFFE, M. B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 177-186
44. OWEN, D. J., ORNAGHI, P., YANG, J. C., LOWE, N., EVANS, P. R., BALLARIO, P., NEUHAUS, D., FILETICI, P., and TRAVERS, A. A. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J.* 19: 6141-6149
45. BANNISTER, A. J., ZEGERMAN, P., PARTRIDGE, J. F., MISKA, E. A., THOMAS, J. O., ALLSHIRE, R. C., and KOUZARIDES, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 410: 120-124
46. MIN, J. H., YANG, H., IVAN, M., GERTLER, F., KAELIN, W. G., JR., and PAVLETICH, N. P. (2002) Structure of an HIF-1 $\alpha$  -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science.* 296: 1886-1889
47. STRASSER, A., O'CONNOR, L., and DIXIT, V. M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 69: 217-245
48. LOCK, L. S., ROYAL, I., NAUJOKAS, M. A., and PARK, M. (2000) Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 275: 31536-31545
49. ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B., and COHEN, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7: 261-269

50. VENTER, J. C., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*. 291: 1304-1351
51. GRUENHEID, S., DEVINNEY, R., BLADT, F., GOOSNEY, D., GELKOP, S., GISH, G. D., PAWSON, T., and FINLAY, B. B. (2001) Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol*. 3: 856-859
52. GUAN, K., HAUN, R., S., WATSON, S. J., GEAHLEN, R. L., and DIXON, J. E. (1990) Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 1501-1505
53. KAECH, S. M., WHITFIELD, C. W., and KIM, S. K. (1998) The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the C. elegans EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell*. 94: 761-771
54. VERMEER, P. D., EINWALTER, L. A., MONINGER, T. O., ROKHLINA, T., KERN, J. A., ZABNER, J., and WELSH, M. J. (2003) Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature*. 422: 322-326
55. POLO, S., SIGISMUND, S., FARETTA, M., GUIDI, M., CAPUA, M. R., BOSSI, G., CHEN, H., DE CAMILLI, P., and DI FIORE, P. P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. 416: 451-455
56. SHIH, S. C., KATZMANN, D. J., SCHNELL, J. D., SUTANTO, M., EMR, S. D., and HICKE, L. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*. 4: 389-393
57. GONZALEZ-GAITAN, M., and STENMARK, H. (2003) Endocytosis and signaling: a relationship under development. *Cell*. 115: 513-521
58. DI GUGLIELMO, G. M., LE ROY, C., GOODFELLOW, A. F., and WRANA, J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 5: 410-421
59. TEIS, D., WUNDERLICH, W., and HUBER, L. A. (2002) Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*. 3: 803-814
60. MULLER, J., ORY, S., COPELAND, T., PIWNICA-WORMS, H., and MORRISON, D. K. (2001) C-TAK1 regulates Ras

- signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell*. 8: 983-993
61. BIVONA, T. G., PEREZ DE CASTRO, I., AHEARN, I. M., GRANA, T. M., CHIU, V. K., LOCKYER, P. J., CULLEN, P. J., PELLICER, A., COX, A. D., and PHILIPS, M. R. (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*. 424: 694-698
  62. REMENYI, A., GOOD, M. C., and LIM, W. A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol*. 16: 676-685
  63. CHANG, C. I., XU, B. E., AKELLA, R., COBB, M. H., and GOLDSMITH, E. J. (2002) Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell*. 9: 1241-1249
  64. SCHULMAN, B. A., LINDSTROM, D. L., and HARLOW, E. (1998) Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 10453-10458
  65. HEINRICH, R., NEEL, B. G., and RAPOPORT, T. A. (2002) Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol Cell*. 9: 957-970
  66. HORNBERG, J. J., BRUGGEMAN, F. J., BINDER, B., GEEST, C. R., DE VAATE, A. J., LANKELMA, J., HEINRICH, R., and WESTERHOFF, H. V. (2005) Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. *Febs J*. 272: 244-258
  67. BARFORD, D., DAS, A. K., and EGLOFF, M. P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 27: 133-164
  68. TONKS, N. K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 833-846
  69. MOORHEAD, G. B., TRINKLE-MULCAHY, L., and ULKE-LEMEE, A. (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 234-244
  70. CEULEMANS, H., and BOLLEN, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*. 84: 1-39

71. ORTIZ MELON, J. M. (2006) La diversidad funcional de protein fosfatasa-1 y el papel de nuevas subunidades reguladoras. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72: 283-299
72. GALLEGO, M., and VIRSHUP, D. M. (2005) Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Curr Opin Cell Biol.* 17: 197-202
73. ORTIZ, J. M., LORENZO, M. L., FERNANDEZ-QUINCOES, A., EGUIRAUN, A., LEÓN, J., ALLSHIRE, R., and HASTIE, N. D. (1991) Differential expression of dis2m1, dis2m2 and dis4-2 genes in mouse tissues. *Adv. in Protot. Phosphatases.* 5: 33-35
74. SANGRADOR, A., ANDRES, I., EGUIRAUN, A., LORENZO, M. L., and ORTIZ, J. M. (1998) Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet.* 259: 449-456
75. ALVAREZ-TABARES, I., GRALLERT, A., ORTIZ, J. M., and HAGAN, I. M. (2007) *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci.* 120: 3589-3601
76. BOLLEN, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci.* 26: 426-431
77. LLORIAN, M., BEULLENS, M., ANDRES, I., ORTIZ, J. M., and BOLLEN, M. (2004) SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J.* 378: 229-238
78. LLORIAN, M., BEULLENS, M., LESAGE, B., NICOLAESCU, E., BEKE, L., LANDUYT, W., ORTIZ, J. M., and BOLLEN, M. (2005) Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *J Biol Chem.* 280: 38862-38869
79. COHEN, P., HOLMES, C. F., and TSUKITANI, Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci.* 15: 98-102
80. MACKINTOSH, C., BEATTIE, K. A., KLUMPP, S., COHEN, P., and CODD, G. A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264: 187-192
81. POURIA, S., DE ANDRADE, A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R. L., BARRETO, V. T., WARD, C. J., PREISER, W., POON, G. K., NEILD, G. H., and CODD, G. A.

- (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*. 352: 21-26
82. CARMICHAEL, W. W. (1994) The toxins of cyanobacteria. *Sci Am*. 270: 78-86
83. LIU, J., FARMER, J. D., JR., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., and SCHREIBER, S. L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 66: 807-815
84. JOHNSON, L. (2007) Protein kinases and their therapeutic exploitation. *Biochem Soc Trans*. 35: 7-11
85. MORIN, M. J. (2000) From oncogene to drug: development of small molecule tyrosine kinase inhibitors as anti-tumor and anti-angiogenic agents. *Oncogene*. 19: 6574-6583
86. BADGER, A. M., BRADBEER, J. N., VOTTA, B., LEE, J. C., ADAMS, J. L., and GRISWOLD, D. E. (1996) Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther*. 279: 1453-1461
87. MARGUTTI, S., and LAUFER, S. A. (2007) Are MAP Kinases Drug Targets? Yes, but Difficult Ones. *ChemMedChem*. 2: 1116-1140
88. PIPAON, C., GUTIERREZ, P., MONTERO, J. C., LORENZO, M., EGUIRAUN, A., DE LA FUENTE, J. A., PANDIELLA, A., LEON, J., and ORTIZ, J. M. (2002) Mitogen-activated protein kinase routes as targets in the action of diaza-anthracene compounds with a potent growth-inhibitory effect on cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 1: 811-819
89. COHEN, P. (2002) Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 1: 309-315
90. CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M., and HEMMING, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378: 785-789
91. COGHLAN, M. P., CULBERT, A. A., CROSS, D. A., CORCORAN, S. L., YATES, J. W., PEARCE, N. J., RAUSCH, O. L., MURPHY, G. J., CARTER, P. S., ROXBEE COX, L., MILLS, D., BROWN, M. J., HAIGH, D., WARD, R. W., SMITH, D. G., MURRAY, K. J., REITH, A. D., and HOLDER, J. (1996) The structure of the protein kinase B (PKB) catalytic domain in complex with the peptide substrate, phospho-peptide, and the ATP gamma phosphate. *J Biol Chem*. 271: 10475-10481



- J. C. (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol.* 7: 793-803
92. CARON, E. (2002) Regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and related molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 14: 82-87
93. NASH, P., TANG, X., ORLICKY, S., CHEN, Q., GERTLER, F. B., MENDENHALL, M. D., SICHERI, F., PAWSON, T., and TYERS, M. (2001) Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature.* 414: 514-521
94. ZARRINPAR, A., PARK, S. H., and LIM, W. A. (2003) Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. *Nature.* 426: 676-680

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN DE LA EXCELENTÍSIMA  
SEÑORA DOÑA MARÍA CASCALES ANGOSTO**

Señora Presidenta  
Señoras y Señores Académicos  
Señoras y Señores

Son varias las veces, que he ocupado esta Tribuna, para presentar o contestar, a un nuevo miembro de nuestra querida Academia, con el que me unía una profunda amistad, y que ingresaba en esta casa, siempre avalado por un magnífico Currículum Vitae. Hoy, este solemne momento, tiene para mí unas características muy peculiares, la persona que ingresa y a la que voy a contestar, posee, además de las cualidades antes descritas de admirado amigo y profesional destacado, otras, que hacen que este sea un día para mí muy especial: el nuevo Académico, el Profesor JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN ha sido mi primer doctorando, y va ocupar la vacante de nuestro insigne maestro Don Ángel Santos Ruiz (sillón 27). Como en otras ocasiones, la Real Academia Nacional de Farmacia, se viste de fiesta hoy para recibir de manera solemne al nuevo académico. Con gran alegría y especial satisfacción, acepto hoy la comisión recibida por nuestra Presidenta y la Junta de Gobierno, de adelantarme en nombre de la Real Academia Nacional de Farmacia para contestar al discurso y darle la primera bienvenida en este momento importante de su Ingreso, en nuestra Real Corporación. Este acto, va unido al hecho, de poner de manifiesto ante ustedes los méritos profesionales y la trayectoria científica del Doctor Ortiz Melón, que le han hecho acreedor a acceder al rango de Académico de Número.

La vacante de Don Ángel va a ser ocupada hoy por uno de sus discípulos directos más queridos, que realizó su Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica, dirigido por él desde 1940 hasta 1982. En la celebración del acontecimiento de las cien Tesis Doctorales en mayo de 1979, se confeccionó una lista en la que el profesor Ortiz Melón figuraba con el número 81 y la que les habla con el 61. Por tanto, José Miguel y yo nos encontramos entre los verdaderos y auténticos discípulos de Don Ángel y pertenecemos con el mayor orgullo a la misma familia bioquímica.

## Trayectoria profesional y comentario a su currículum vitae

Mi encuentro con el nuevo académico, se remonta a septiembre de 1966. Fue a mediados de los sesenta, cuando yo hice las Américas en la Universidad de Kansas con una Beca March en el Laboratorio de Santiago Grisolia. A mi vuelta, me reincorporé al centro Coordinado del CSIC, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, dirigido por Don Ángel, y me fueron encomendados dos becarios con magníficos expedientes para hacer la Tesis Doctoral, José Miguel Ortiz Melón y María Jesús Sendino Cubillo (hoy aquí).

Eran años, en los que carecíamos de casi todo, pero poseíamos enormes dosis de juventud y entusiasmo. Solo los que hemos vivido aquellos tiempos remotos, podemos comprender, cuanta ilusión poníamos, y cuantas horas dedicábamos para la realización de unos proyectos, para los que no contábamos apenas con eso que se llama infraestructura. Por recordar algo, el Departamento había adquirido con grandes esfuerzos, un radiocromatógrafo que se alimentaba de gas Q. Era un aparato decisivo para nuestros experimentos y fueron muchas las veces, las que José Miguel y yo en mi estupendo 600, nos desplazábamos a través de las calles de Madrid (entonces había mucho menos tráfico), para dirigirnos a la fábrica a rellenar la bala de gas. Por cierto, que pesaba muchísimo y apenas si cabía en el coche. De esta manera y con innumerables anécdotas similares a la que les acabo de describir, José Miguel pudo realizar su Tesis Doctoral en la Facultad de Farmacia de Madrid, que culminó en 1969 con Sobresaliente *cum laude*.

Desde el principio, pude detectar en el nuevo académico sus cualidades de seriedad, iniciativa, constancia y decisión para emprender el estudio del tema de investigación, que se centraba en el papel del 4-aminobutirato en distintos procesos biológicos, tema iniciado en el Departamento por Federico Mayor Zaragoza, director, a su vez, de mi tesis doctoral. Como no poseíamos animalario, y estaba fuera de nuestro alcance económico trabajar con animales, (hasta entonces habíamos trabajado con cultivos vegetales), consideramos que los cultivos bacterianos, eran el sistema biológico mejor definido, para el estudio de las interconversiones de aminoácidos. Nos vimos entonces, en la necesidad de utilizar técnicas microbiológicas para llevar a cabo este proyecto, lo que me llevó a recomendar a José Miguel a entrar en

contacto con científicos del Instituto Jaime Ferrán del Centro de Investigaciones Biológicas. Tengo aquí que dar las gracias a mi buen amigo y académico Julio Rodríguez Villanueva porque en su laboratorio José Miguel adquirió conocimientos experimentales del cultivo de microorganismos, con los que realizó interesantes aportaciones con la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, utilizando trazadores radiactivos. Para ello tuvo que obtener por vía enzimática el 4-aminobutirato marcado con  $^{14}\text{C}$ , que por entonces no era comercializado como trazador, lo que nos sirvió para estudiar las transformaciones metabólicas de este aminoácido. Al terminar su Tesis, en 1969, se trasladó al Reino Unido para trabajar con Mark Richmond, recién nombrado Profesor de la Universidad de Bristol, donde nuestro nuevo académico se inició en la bioquímica de proteínas, mediante la purificación, caracterización y estudios de regulación, de la  $\beta$ -glucosaminidasa de *Bacillus subtilis*, enzima que interviene en la morfogénesis de la pared celular bacteriana. En paralelo con estos estudios, se llevaban a cabo también, en el mismo laboratorio, estudios sobre las  $\beta$ -lactamasas, enzimas responsables de la resistencia a antibióticos. Además de interesantísimas repercusiones sanitarias, la resistencia a antibióticos presentaba la característica de estar mediada por plásmidos, entidades genéticas autónomas de naturaleza poco conocida entonces, y cuyo estudio se desarrolló rápidamente, por la frecuencia, con la que eran portadores de genes de resistencia. Este tema apasionó al Doctor Ortiz Melón de manera, que cuando finalizó su estancia postdoctoral en la Universidad de Bristol, su inquietud científica, le hizo orientarse hacia este tipo de estudios en una segunda etapa postdoctoral que realizó con Stanley Falkow en la Universidad de Washington. En este laboratorio el Doctor Ortiz Melón llevó a cabo el aislamiento y la caracterización molecular de diversos tipos de plásmidos, y realizó estudios sobre su replicación. Fue entonces, cuando el Doctor Ortiz vivió con entusiasmo el nacimiento de dos acontecimientos científicos espectaculares, que tuvieron gran trascendencia y repercusión en sus investigaciones posteriores, así como en la evolución de la biología molecular. Me refiero a los primeros experimentos sobre recombinación de DNA *in vitro* y al descubrimiento de los transposones bacterianos.

A su vuelta al Departamento de Bioquímica de la Facultad Farmacia de Madrid, el doctor Ortiz Melón, obtuvo una plaza de Colaborador Científico del CSIC lo que le permitió establecer su propio grupo de investigación, iniciándose a la vez en la docencia universitaria como profesor ayudante en la Cátedra de Bioquímica. La estancia en Madrid fue breve, y así, poco tiempo después, iniciaba su carrera universitaria como Profesor Agregado en la Universidad del País Vasco, y como Catedrático en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, hasta establecerse definitivamente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, que es donde ha desarrollado su labor durante los últimos treinta años. Es importante destacar, que la carrera profesional del Doctor Ortiz experimentó en poco tiempo un desarrollo fulgurante: obtuvo el título de Doctor, realizó su etapa post-doctoral en dos laboratorios fuera de España, obtuvo por oposición una plaza de colaborador científico y posteriormente la de catedrático, primero en la Universidad de Santiago, a los 32 años, y posteriormente en la de Santander.

En la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, el Profesor Ortiz Melón continuó el trabajo iniciado sobre plásmidos bacterianos, siendo sus principales aportaciones, la primera descripción de la resistencia plasmídica a la fosfomicina, y los estudios sobre los plásmidos hemolíticos, la caracterización del transposón de hemolisina y del operón que regula la expresión de la toxina hemolítica. No es de extrañar, que durante los años 80 el laboratorio del Profesor Ortiz Melón fuera uno de los primeros en utilizar en España la tecnología del DNA recombinante y que la fama adquirida por aquel joven grupo creado por él, determinó, que la Sociedad Española de Bioquímica eligiera Santander para la celebración del X Congreso de dicha Sociedad, encargando al Doctor Ortiz Melón, la organización del mismo.

Durante algunos años y junto a la labor de investigación y formación de un excelente grupo de colaboradores, el Doctor Ortiz Melón tuvo que compaginar esta ocupación con la de la creación de un moderno Departamento que hoy figura como uno de los más acreditados de la Universidad de Cantabria. Análogamente, asumió con entusiasmo la tarea de dirigir esta Universidad como Rector, cuando sus compañeros de Claustro le eligieron para esta función. Como Rector de Universidad, el Profesor Ortiz Melón contribuyó a la ampliación de aquella Universidad

mediante la creación de nuevas facultades, a fomentar la relación con la nueva Comunidad Autónoma, y a impulsar la investigación científica mediante la creación y apoyo a grupos de investigación. Resulta grato recordar como en aquella ocasión, siendo Rector de la Universidad de Cantabria y coincidiendo con el X Congreso SEB, al que antes he aludido, tuvo ocasión de investir como doctores *Honoris causa* a tres destacados bioquímicos Severo Ochoa, Ángel Santos Ruiz y Alberto Sols, en reconocimiento al papel que los tres habían desempeñado en el impulso de la Bioquímica en España.

El Doctor Ortiz Melón al inicio de su Discurso de Ingreso ha realizado un emocionante y afectivo comentario sobre la figura de Don Ángel, cuyo recuerdo mantenemos sus discípulos con gran veneración y respeto, pero lo que no ha comentado es que Don Ángel recibió de sus manos el Doctorado *Honoris causa*, galardón que Don Ángel agradeció sobremanera, por ser Santander su provincia natal, ya que nació en Reinosa, y en su discurso en aquel momento, hizo varias alusiones a aquella parte de España que le vio nacer. Si es verdad que existe otra vida y Don Ángel está en ella, seguro que estará disfrutando de este momento. Una fotografía de este emocionante momento aparece en el libro homenaje a Don Ángel que publicó esta Academia y yo tuve la satisfacción de editar.

Volviendo a las tareas de su Departamento el Doctor Ortiz Melón consideró la necesidad de extender la actividad científica al campo de los organismos eucarióticos. Los avances experimentados en la tecnología del DNA recombinante permitían ya abordar con posibilidades de éxito, algunos temas de biología molecular directamente relacionados con enfermedades y por tanto con los objetivos de una Facultad de Medicina. La circunstancia se presentó, cuando nuestro académico Federico Mayor Zaragoza, que había creado, años antes, una red de laboratorios dedicados al diagnóstico precoz de enfermedades metabólicas, confió al laboratorio del Doctor Ortiz Melón uno de los nodos de dicha red. El contacto con esta problemática movió al Doctor Ortiz Melón, junto con sus colaboradores y discípulos, a iniciar una línea de investigación centrada en las células de mamíferos, que presentaba aplicaciones hacia el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades genéticas. Dentro de esta idea, y tras un año sabático, el Doctor. Ortiz Melón se ocupó del papel de las proteína quinasas y fosfatasa en el ciclo

celular y transducción de señal. Las proteína fosfatasas, menos estudiadas que las quinasas, constituyen un interesante campo de investigación y dentro de ellas, la proteína fosfatasa I presenta una gran diversidad de funciones cuyo significado el grupo del Doctor Ortiz Melón ha contribuido a clarificar. La respuesta ha venido de la identificación de un buen número de proteínas diferentes que interactúan con la subunidad catalítica de proteína fosfatasas I formando holoenzimas, que no son más que una manifestación de las interacciones proteína-proteína que emplean para ello sitios de anclaje (*docking sites*) y motivos peptídicos lineales. En el caso de la proteína fosfatasa 1, un motivo formado por solo cuatro aminoácidos, está presente en la mayoría de las proteínas que se asocian a la subunidad catalítica y contribuyen a regular su actividad así como a la formación de complejos multiproteicos con funciones diferentes en señalización. Empleando técnicas de proteómica, como el sistema de dos híbridos, el Doctor Ortiz Melón identificó una nueva proteína, la SIPP, con funciones en el procesamiento del mRNA, un importante proceso biológico poco conocido molecularmente. Esta proteína, interactúa a través de un dominio de interacción WW con la proteína PQBP1 cuyas mutaciones están relacionadas con el llamado síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X. Otro aspecto del trabajo del Doctor Ortiz Melón recientemente publicado en el *Journal of Cell Science* está relacionado con la localización subcelular de la PP1. Empleando técnicas genéticas de marcaje con epítomos fluorescentes en *S. pombe* el Doctor Ortiz Melón y sus colaboradores han descrito, nuevas localizaciones de PP1, indicativas de funciones implicadas en la regulación de la mitosis, en el proceso de endocitosis y en el crecimiento polarizado de la levadura de fisión.

El Doctor Ortiz Melón es Licenciado y Doctor en Farmacia por la Universidad de Madrid con la calificación de Sobresaliente y premio Extraordinario respectivamente y especialista en Bioquímica Clínica. En 1972 obtuvo por oposición la plaza de Colaborador Científico del CSIC y en 1976 la de Catedrático de Bioquímica en la Universidad de Santiago de Compostela. En 1978 se incorporó a la Universidad de Cantabria donde ha permanecido desde entonces. Ha ocupado cargos de Director del Departamento de Biología Molecular. Jefe de Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Vicerrector y Rector de la Universidad de Cantabria.



Durante mas de 20 años ha dirigido un grupo de colaboradores y discípulos, lo que ha permitido, que en su Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, se hayan formado numerosos farmacéuticos médicos, químicos y biólogos y entre los que figuran actualmente 5 catedráticos de Universidad, 11 profesores titulares 12 investigadores postdoctorales y 21 becarios de investigación que se agrupan en torno a 11 grupos de investigación. Durante ocho años (82-90) dirigió también el servicio de Bioquímica del Hospital Marques de Valdecilla en el que obtuvieron la especialidad de Bioquímica Clínica 12 residentes entre ellos varios farmacéuticos.

La actividad investigadora del Doctor Ortiz Melón queda reflejada en la dirección de 12 tesis doctorales y 6 tesinas de licenciatura. Ha presentado numerosas comunicaciones y ponencias a Congresos nacionales e internacionales, ha publicado también numerosos trabajos en revistas del máximo prestigio dentro de su especialidad. Es autor o coautor de 7 libros. Ha sido coorganizador de mas de 10 congresos y reuniones internacionales. Ha figurado como investigador principal en más de una decena de proyectos de investigación. Ha participado y participa como miembro ordinario en diversas Sociedades científicas y en comités de evaluación y asesoramiento como el Consejo Nacional de Educación, la Comisión Asesora para la Investigación científica y técnica (CAYCYT), el Consejo Nacional de Prevención de la Subnormalidad, el Consejo Científico del Centro Nacional de Biología Celular y retrovirus (Carlos III), el Consejo Científico de la Fundación Valdecilla y el Consejo Social de la Universidad de Cantabria. Es Académico correspondiente de la RANF desde 1975 y Académico de Numero de la Real Academia de Medicina de Cantabria y ha recibido premios y distinciones como el premio de la Real Academia de Farmacia o el de Montañés de Año del Ateneo de Santander.

En el profesor Ortiz Melón hay que destacar además su capacidad de relación con otros muchos grupos de investigación, no solo de la Universidad de Cantabria sino también de otros ámbitos científicos y culturales así como con miembros de esta Real Academia y con científicos afamados de Europa y de Estados Unidos.

## **Comentario a su discurso**

Acabamos de escuchar el discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia del profesor Jose Miguel Ortiz Melón titulado La especificidad en las vías de comunicación celular. Esta intervención, realmente brillante, con alto contenido científico, pone de manifiesto con el exigido rigor académico, algunas de las cuestiones más relevantes que se refieren a los procesos de la organización de los sistemas de regulación celular y sus aplicaciones biomédicas. Esto no debe sorprendernos si consideramos que el Profesor Ortiz Melón ha desarrollado una intensa actividad investigadora en el campo de la Biología Molecular la Genética y la Microbiología, que ha desembocado recientemente en la creación del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Centro Mixto constituido por la Universidad de Cantabria, el CSIC y el Gobierno de Cantabria y a cuya creación el Profesor Ortiz Melón ha contribuido junto con algunos discípulos, proporcionando buena parte de los cimientos científicos sobre los que se asienta.

El tema elegido por el nuevo académico sobre la señalización celular y el papel de proteína quinasas y fosfatasas, presenta grandísimo interés, ya que constituye uno de los retos principales de la Biología Molecular del siglo XXI, en confluencia con la Biotecnología y la Bioinformática. El análisis de las proteínas implicadas en la señalización y de sus interacciones inmediatas, es de la mayor importancia para la correcta comprensión de cómo las células están organizadas y cómo responden a hormonas, factores de crecimiento, citoquinas o agentes genotóxicos. Está claro, que la proteómica, es decir el estudio a gran escala de las proteínas, es el próximo paso en el conocimiento de los problemas biológicos, dado que las proteínas son los productos que ejecutan el programa genético. Al mismo tiempo la posibilidad de definir dianas celulares en las rutas de señalización, proporciona la posibilidad de su regulación, mediante pequeñas moléculas permeables que inhiben la actividad de proteína quinasas y fosfatasas, y que constituyen, una de las principales fuentes de nuevos medicamentos, tanto para combatir infecciones bacterianas y víricas, como para combatir enfermedades de elevada incidencia tales como cáncer, diabetes o artritis reumatoide.

Volviendo al tema de la regulación celular, conocemos la mayoría si no todas, las proteínas quinasas codificadas por el genoma humano, y para el grupo de tirosina quinasas, podemos identificar la mayoría de sus dianas y proteínas con las que interactúan. Nuevas aproximaciones experimentales, como la espectrometría de masas tienen la capacidad de proporcionar un inventario de sitios de fosforilación. Si las quinasas, sus proteínas asociadas y sus sustratos, pueden ser bien definidos, el resto sería relacionar las quinasas conocidas con sus sustratos, para lo cual son esenciales los nuevos métodos de la biocomputación. Un objetivo aún más ambicioso, sería determinar los papeles biológicos de un gran número de sitios fosforilados, y su influencia, en la dinámica de las redes de señalización e interacción. Recientemente, se atribuye un interés creciente a las técnicas de imagen, para definir el contexto espacial y temporal de los sucesos de fosforilación e incluso para aprender, como estos difieren en células diferentes, o en diferentes localizaciones dentro de la misma célula.

Las consecuencias biológicas de la fosforilación multisitio, y del uso combinado de diferentes modificaciones postraduccionales, son todavía mal entendidas, pero pueden conducir de un modo importante a la complejidad biológica. Esta diversidad podría llegar a rivalizar o a exceder, la contribución de otros procesos, tales como el *splicing* diferencial o la expresión genética, y es probable, que llegue a constituir un punto de referencia en la organización dinámica de la célula.

Una cuestión fundamental en biología, es conocer la naturaleza dinámica de la organización celular y su comportamiento. Las secuencias genómicas nos proporcionan información del potencial de un organismo, en tanto que el análisis transcripcional puede revelar el conjunto de genes expresados en una célula. Sin embargo, los productos proteicos resultantes, se encuentran en un estado de flujo continuo con su actividad, localización subcelular, interacciones moleculares y estabilidad modificadas constantemente en respuesta a señales externas o señales internas.

El estudio de la fosforilación de proteínas como ha descrito el Doctor Ortiz Melón ha proporcionado muchos de los temas centrales que

intervienen en la regulación de las células normales y ha revelado también como las rutas de señalización pueden ser alteradas en la enfermedad. Desde el punto de vista histórico, los trabajos de Fisher y Krebs sobre fosforilación de proteínas, cuando se combinan con el descubrimiento de proteínas G y el análisis de los receptores acoplados a proteínas G, han dejado establecido, el diseño de las rutas de transducción de señal, y la fosforilación de proteínas como un mecanismo clave para la rápida modulación de la función proteica.

El mecanismo por el que la fosforilación de proteínas controla la actividad de las propias proteínas tiene profundas implicaciones para el conocimiento del control celular. Primero la fosforilación de una tirosina reguladora puede inducir un cambio conformacional en un sustrato, cambio que estimula la actividad enzimática, como en el caso de la fosforilasa b que lleva a cabo una transición alostérica para pasar a fosforilasa a tras la fosforilación en un residuo de serina.

Las tirosina quinasas con frecuencia se autofosforilan en el segmento de activación de su dominio quinasa induciendo la conversión a un estado más activo. Sin embargo, una consecuencia de la fosforilación, es crear sitios de unión para dominios SH2, que son componentes de un conjunto diverso de proteínas citoplásmicas que median la señalización intracelular por tirosina quinasas normales y oncogénicas. Estas interacciones proteína-proteína dependientes de fosfotirosina sirven para que proteínas reguladoras para los receptores fosforilados y proteínas *docking*, activen así rutas de señalización.

Estas observaciones son también relevantes para el conocimiento de la señalización por serina/treonina quinasas. Así, Shaw y colaboradores han mostrado que unas proteínas tipo 14-3-3, se unen selectivamente a motivos serina/treonina fosforilados por quinasas como PKB/Akt y PKA conduciendo a alteraciones en la conformación y localización subcelular o en interacciones proteína-proteína. Se ha encontrado pues una gran familia de dominios de interacción que reconocen selectivamente quinasas fosforiladas en serina/treonina.

Los mecanismos por los que la fosforilación modifica la función proteica son también muy útiles para comprender los efectos de otras modificaciones postraduccionales como la acetilación, metilación, ubiquitinación de residuos de lisina, metilación de arginina o hidroxilación de prolina.

Estas modificaciones también desempeñan papeles importantes en campos diferentes de la biología molecular. Así, la cola N-terminal de una sola histona (H3), puede tener sitios múltiples de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, que pueden actuar de manera sinérgica o mutuamente exclusiva, para controlar la organización de la cromatina y la expresión genética. De hecho los efectos de modificación en un sitio pueden variar drásticamente, dependiendo de la presencia o ausencia de modificación en otro. Esta capacidad de modificación postraducciona para actuar en combinación aumenta en gran manera el rango de sus actividades biológicas. En el reino de la fosforilación de proteínas estamos llegando a un punto alcanzado hace algunos años por aquellos que llevaron a acabo la secuenciación del genoma. Una asignatura pendiente en la investigación biomédica de nuestro país es la necesidad de transferir la investigación básica al sector empresarial y proteger las invenciones mediante patentes.

No voy a insistir en el interés del tema porque después del discurso que acabamos de escuchar, más comentarios por mi parte serían un esfuerzo vano.

## **Facetas de la personalidad del nuevo académico**

No es fácil para mí describir en pocas palabras las cualidades que definen la personalidad de José Miguel Ortiz Melón. Como la personalidad de un ser humano ha de juzgarse tanto por lo que hace como por lo que es, quiero en esta ocasión, dejarme llevar por los impulsos del corazón e intentar perfilar los rasgos más significativos.

Mi relación con el Profesor Ortiz Melón se ha mantenido a través de los años y ha sido entrañable desde la época de su tesis Doctoral en la que trabajamos juntos día a día. Más tarde, en la distancia, ha perdurado

siempre una viva amistad, así como un mutuo aprecio y afecto. Es bondadoso, amable, amigo leal y auténtico, que destaca por su gran lucidez y laboriosidad y por su nobleza. Destaca también por ser emprendedor, autodisciplinado, y exigente consigo mismo, lo cual expresa que la eficacia en el trabajo va unida a grandes dosis de resolución y perseverancia, y, como buen científico, posee un extraordinario poder de observación. Es imaginativo, inquieto e incansable, y posee espíritu de participación y gran capacidad de compartir con los demás. Son características de su personalidad el autodomínio, el juicio equilibrado y la reflexión ponderada. Es también cortés, amable y moderado en su decir. A nivel personal he admirado en José Miguel su seriedad, su iniciativa, su aplomo y su capacidad para saber lo que tiene que hacer en cada momento, eso que se llama “seguridad en sí mismo”.

Recuerdo que en el pasado, fueron varias las veces que José Miguel me proporcionó gran ayuda ante alguna situación conflictiva que yo no veía como resolverla. Siempre he considerado a José Miguel como un hombre enormemente responsable que no repara en esfuerzos en la superación de dificultades. A pesar de que puede parecer un hombre serio tiene un gran sentido del humor. Posee un natural atractivo y ha mantenido siempre un aspecto más joven que lo que le correspondía por edad. Muy apegado a la vida familiar a la que dedica todo el tiempo que le dejan sus ocupaciones, es sensible y afectuoso. El Doctor Ortiz Melón es amante de la música, de la literatura y practica el ciclismo. Desde hace algunos años forma parte de un pequeño grupo de montañeros y ha explorado en su compañía buena parte de la orografía española.

El Doctor Ortiz Melón nació en Santander, bonita ciudad del norte de España donde el mar dialoga con la montaña. Su padre Don José Ortiz González, también farmacéutico, ejerció la profesión en su oficina de farmacia y ejerció también cargos en la administración siendo Delegado Provincial del Instituto Nacional de Estadística, y su madre Doña Elena Melón Diestro de familia de profesores universitarios, siempre le apoyaron a seguir su inclinación a pesar de que hubieran deseado su dedicación a la oficina de farmacia familiar. Yo conocí a los dos, personas extraordinarias, pero aunque ya no están entre nosotros quiero desde aquí dedicarles un recuerdo.

No quisiera terminar mis palabras ,sin una cariñosa referencia a su esposa María Luz Lorenzo Prieto, y sus tres hijos Miguel, Gonzalo y Pablo. Mariluz, para los amigos, también farmacéutica, es una espléndida mujer, inteligente, atractiva, optimista y afectuosa y ha acompañado a José Miguel en su largo itinerario prestándole su ayuda, no solo como compañera y madre de sus hijos, sino también en las tareas científicas del laboratorio. Yo he disfrutado de su compañía muchas veces.

Adentrándome en el pasado, recuerdo varios viajes que hicimos juntas, a un Congreso de Granada y a Bristol, cuando José Miguel y ella eran novios y él trabajaba en aquella Universidad. Su segundo hijo Gonzalo, no ha podido asistir a este acto por encontrarse en el extranjero al frente de una importante empresa constructora y el hijo pequeño Pablo, Letrado del Gobierno de Cantabria, está presente en este acto en representación de sus hermanos. A todos ellos mi más calurosa y sincera felicitación que quiero hacer extensiva a sus discípulos, un grupo, que el nuevo académico considera como su segunda familia: la universitaria.

### **Señora Presidenta, Académicos, Amigos**

Estas palabras de contestación al discurso del nuevo Académico han pretendido mostrar diversos aspectos del profesor JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN, como profesor, como hombre de ciencia y como persona. El nuevo Académico, no es un extraño en esta Casa, ya que desde 1975 pertenece a la Academia como Académico Correspondiente. Sin embargo, bueno es confirmar , que desde entonces, se ha acrecentado su categoría como científico, cuya dimensión intelectual, está en consonancia con la amplitud, complejidad y el intenso servicio social de las Ciencias Farmacéuticas. Por todo ello, es indudable, que la Real Academia Nacional de Farmacia recibe con gran satisfacción al nuevo Académico de Número en la seguridad de que su amplia preparación científica, experiencia acreditada e independencia de criterio, serán de gran utilidad para esta Institución.

Querido José Miguel, con el deseo de que este acto sea el principio, más bien la continuación, de importantes y fructíferas colaboraciones, en nombre de todos los Académicos de la REAL ACADEMIA NACIONAL de FARMACIA a quienes ahora represento, y en el mío propio, me es muy

grato adelantarme a darte la bienvenida, expresarte mi gran admiración y profundo afecto y felicitarle por tu impresionante trayectoria científica, plenamente dedicada a la búsqueda de la verdad, en el intrincado mundo de la comunicación celular y sus repercusiones en la lucha contra la enfermedad. Tu ingreso representa que hoy adquieres un mayor compromiso con nuestra Real Corporación y deseo de todo corazón que tu permanencia entre nosotros sea aún más provechosa y feliz para tu propia satisfacción y el prestigio de nuestra Academia.

He dicho.