

## Recetas para obtener una señalización específica y una transducción eficiente: Compartimentalización de la señalización

Dr. Martin M. Edreira

INGEBI-UBA-CONICET

Laboratorio de Biología y Genética Molecular de Trypanosomas  
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Adjunct Research Instructor

Department of Pharmacology and Chemical Biology

School of Medicine - University of Pittsburgh

medreira@yahoo.com

Recibido el 12/07/2011

Aceptado el 15/07/2011

### Resumen

En oposición al viejo dogma de la libre difusión del AMPc dentro de la célula, hoy en día resultados experimentales avalan la existencia de microdominios de AMPc, mantenidos por barreras físicas y difusión restringida del nucleótido. La compartimentalización de la señal es debida fundamentalmente a la familia de proteínas de anclaje AKAP. Originalmente descritas como proteínas de anclaje de PKA, las AKAPs tienen la capacidad de orquestar el ensamblado de complejos multiproteicos con otras proteínas involucradas en la vía de señalización del AMPc, como ser ACs, PDEs y Epac. La presencia de las PDE en estos microdominios de señalización es de fundamental importancia debido a que restringen la libre difusión del mensajero y limitan su disponibilidad. De esta manera, la compartimentalización regula la localización, duración y amplitud de la señal, requisitos esenciales para una eficiente transducción del estímulo.

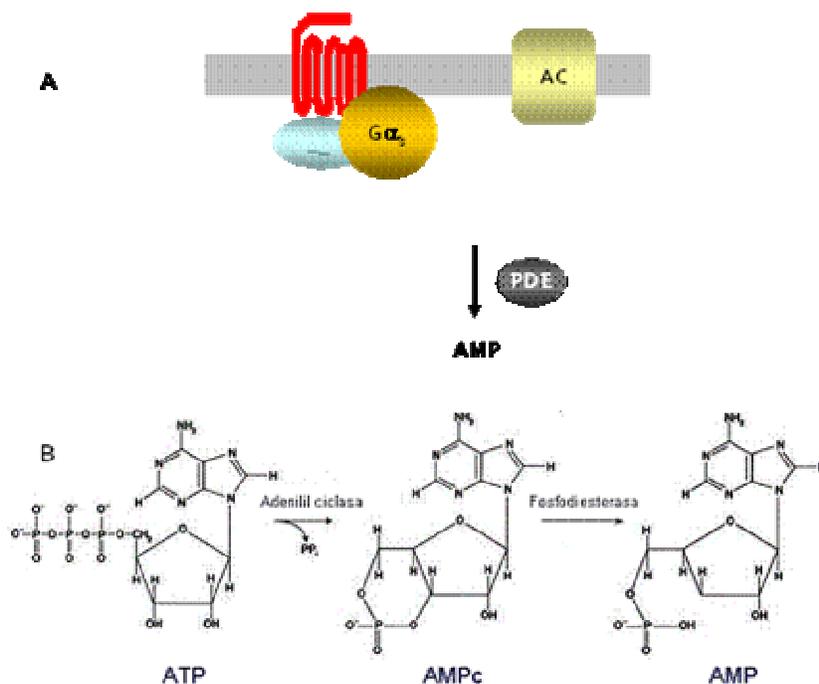
### Abstract

In opposition to the old dogma of the free diffusion of cAMP within the cell, today, experimental results support the existence of microdomains of cAMP, maintained by physical barriers and restricted diffusion of the nucleotide. Compartmentalization of the signal is mainly due to the family of anchor proteins AKAP. Originally described as proteins anchoring PKA, the AKAPs have the ability to orchestrate the assembly of multiprotein complexes with other proteins involved in the cAMP signaling pathway, such as ACs, PDEs and Epac. The presence of PDEs in these signaling microdomains is of fundamental importance because they restrict the free diffusion of the messenger and limit its availability. Thus, compartmentalization regulates the

location, duration and amplitude of the signal, essential requirements for an efficient transduction of the stimulus.

### El AMPc como segundo mensajero

A 50 años de su descubrimiento por Rall y Sutherland [1, 2], el detalle de los mecanismos que gobiernan la transducción de señales mediada por el AMPc (adenosina monofosfato-3',5' cíclico) se encuentra todavía en expansión. El AMPc ha sido implicado como mensajero secundario en una gran variedad de procesos biológicos entre ellos metabolismo, expresión génica, proliferación, diferenciación y apoptosis [3-5]. La unión a receptores de membrana asociados a proteínas G (GPCR) de ligandos tan diversos como hormonas, neurotransmisores y agentes odorantes [6, 7], promueve la activación de proteínas G que estimulan la producción de AMPc por parte de varias isoformas de adenilil ciclasas (AC) [8] (Figuras 1A y B). El aumento de estos niveles intracelulares de AMPc es negativamente regulado a través de su hidrólisis a 5'-AMP por fosfodiesterasas (PDE) [9], una familia de enzimas multigénicas que juegan un importante rol en la transducción de la señal, al limitar la disponibilidad del nucleótido cíclico (Figuras 1A y B).



**Figura 1.** Síntesis y Degradación de AMPc

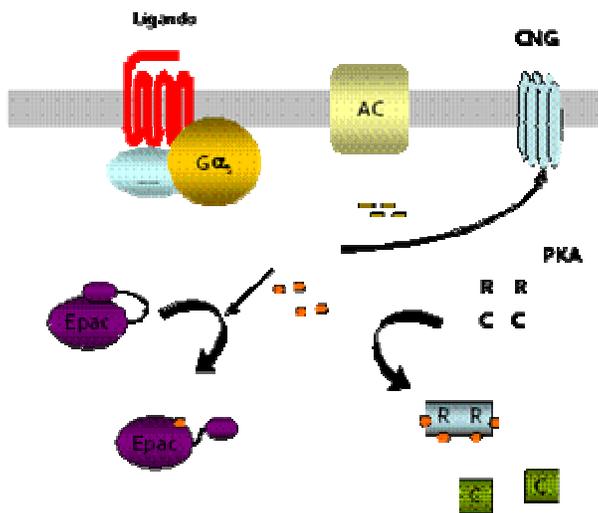
### Efectores del AMPc

La quinasa dependiente de AMPc (PKA) fue identificada a fines de la década del 60 [10] y representó durante mucho tiempo el único blanco conocido para AMPc en células de mamífero [11]. En su estado inactivo, PKA es una holoenzima tetramérica compuesta por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C), de las cuales se han logrado identificar  $C\beta, \alpha, RII\beta$  y varias subunidades C ( $C\alpha, RII\beta, RII\alpha$  y varias subunidades R (RI). La unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades regulatorias y C resulta en la liberación de las subunidades catalíticas, las cuales poseen varios blancos celulares [4] (figura 2). En los últimos 15 años se han identificado nuevos efectores del AMPc, como los canales catiónicos dependientes de AMPc (CNG) [12] y la proteína intercambiadora dependiente de AMPc (Epac) [13] (figura 2).

Identificados originalmente en fotoreceptores de retina y neuronas olfatorias, los canales catiónicos dependientes de nucleótido, son canales no selectivos compuestos por heterotetrámeros de dos o tres tipos de subunidades distintas (4 subunidades de tipo A y 3 de tipo B) que poseen sitios de unión a nucleótido [12].

Existen 2 isoformas de Epac, Epac1 y Epac2 [14], ambas poseen dominios de reconocimiento capaces de unir una molécula de AMPc, induciendo cambios conformacionales que llevan a la exposición del sitio catalítico, con el consecuente reconocimiento y activación de GTPasas de la familia de Ras, Rap1 y Rap2 [14, 15] (fig. 2).

Dependiendo del tipo celular, expresión de isoformas y localización, dos de los efectores del AMPc, PKA y Epac, pueden actuar de manera independiente, tener funciones opuestas o converger sinérgicamente en la regulación de una función celular específica [16].



**Figura 2.** Efectores del AMPc.

### **Compartimentalización de la señal mediada por AMPc**

Una gran diversidad de ligandos posee la capacidad de inducir la producción de un solo tipo de mensajero secundario, el cual a través de la activación de un limitado número de efectores logra una precisa regulación de funciones celulares específicas [3-5, 11]. Surge entonces la pregunta: ¿Cuál es el mecanismo a través del cual un único mensajero logra una señal intracelular específica que produce solo la respuesta celular apropiada? En oposición al concepto original de la libre difusión del AMPc dentro de la célula [17], que llevaría a la activación no selectiva de efectores, existen pruebas experimentales que indicarían que la difusión del AMPc se encuentra restringida [18, 19]. La compartimentalización espacial de proteínas que producen, son blanco y degradan AMPc, explicaría la gran especificidad y eficiencia de transducción. En esta compartimentalización son de fundamental importancia interacciones proteicas entre efectores y moléculas de anclaje, que serán la base de la formación de microdominios subcelulares que regularán la localización, duración y amplitud de la señal. Las principales proteínas de anclaje que organizan la compartimentalización de complejos multiprotéicos y coordinan una respuesta localizada y específica, son las proteínas de anclaje de quinasa A (AKAP) [20].

### **Localización de Isoformas de PKA**

Identificadas originalmente por co-purificación con la subunidad regulatoria de PKA [21], las AKAPs tienen la capacidad de localizar PKA en distintos compartimientos subcelulares (tabla 1) [20]. Ha sido demostrado que distintas isoformas de PKA (PKA-RI y PKA-RII) presentan funciones biológicas no redundantes, al poseer propiedades bioquímicas y localización subcelular diferencial [21]. En ensayos con cardiomiocitos, empleando la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET), fue comprobado que la localización subcelular de las isoformas de PKA se debe su interacción con diferentes isoformas de AKAPs, y que distintos "pools" de AMPc permiten modular la fosforilación de un subconjunto específico de blancos de PKA [22].

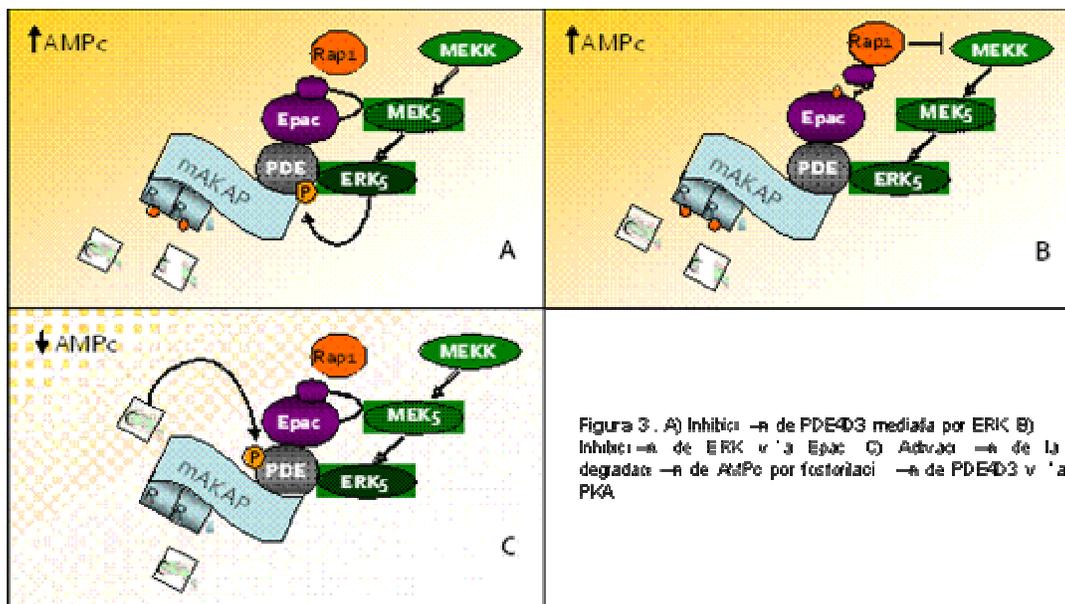
### **Formación de Microdominios**

En la actualidad, la familia de proteínas AKAP cuenta con 43 miembros, los cuales se encuentran invariablemente asociados a membranas o fracciones celulares particuladas (tabla 1). Su caracterización ha permitido establecer que no solo la sublocalización de las isoformas de PKA esta determinada por AKAPs, sino que éstas, además, tienen la capacidad de conformar una plataforma de ensamblaje para otros componentes protéicos involucrados en la señalización mediada por AMPc.

La primera línea de acción en la respuesta mediada por AMPc son los receptores de membrana acoplados a proteína G. En células HEK, se ha demostrado que AKAP5 y AKAP12 interaccionan con el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico [23], mientras que receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, por su parte, interaccionan con AKAP79 y PKA forman un complejo ternario involucrado en el reciclado y resensibilización del receptor [24].

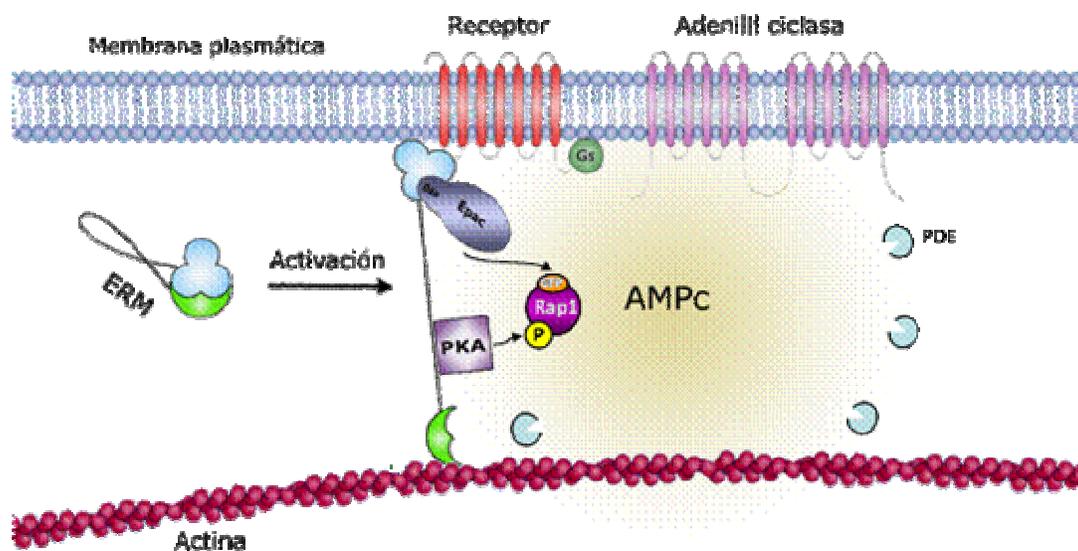
Asimismo, isoformas de la AC han sido identificadas formando parte de complejos con AKAPs, entre ellos AKAP79, mAkap y Yotiao [25]. En cerebro y corazón de rata, Yotiao interacciona específicamente con las isoformas 1, 2, 3 y 9 de la AC, observándose una regulación negativa de la isoforma 2 [26]. Por su parte, mAkap recluta a la AC5 [27] que a su vez interacciona a través de su N terminal con proteínas G heteroméricas [28]. Como se mencionara anteriormente, la degradación del AMPc se realiza exclusivamente a través de las PDEs. La localización subcelular de estas enzimas, en proximidad a las ACs encargadas de la síntesis del AMPc, es de vital importancia en la compartimentalización de la señal, ya que las PDE serán las encargadas de restringir la libre difusión del nucleótido. En concordancia con lo observado para las isoformas de PKA, se demostró que isoformas de PDE se localizan en distintos compartimientos y que esta localización diferencial es determinante para la compartimentalización de la señalización mediada por AMPc [29]. En ensayos de FRET se observó que la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos generan múltiples microdominios con elevadas concentraciones de AMPc que activan específicamente un subconjunto de moléculas de PKA ancladas a través AKAPs a túbulos T, y que la difusión del nucleótido fue efectivamente regulada por PDEs [30]. Sumado a esto, ha sido demostrada la participación de PDEs en complejos formados por PKA-AKAP. En cardiomiocitos, PDE4D3 interacciona con mAkap-PKAII [31]. Por su parte, AKAP450 colocaliza a PKA y PDE4D3 en el centrosoma de células de Sertoli [32]. Y en linfocitos T, donde AMPc esta involucrado en activación, PDE4A interacciona con AKAP149, AKAP95 y MTG; y PDE7A con MTG [33].

Microdominios con un mayor nivel de complejidad se observaron con el ensamblado de complejos multiproteicos como el formado en células HEK por AC8, PDE4, PKA y AKAP [34, 35]. Otro macrocomplejo ensamblado por AKAPs incluyó a mAkap, PKA, PDE4D3 y a un segundo efector del AMPc, Epac1. En este caso, se observó que la activación de ERK5, que forma parte del complejo por interacción con PDE4D3, puede fosforilar e inhibir a la PDE, llevando a un aumento en la concentración de AMPc (figura 3A). Al mismo tiempo, PDE4D3 recluta a Epac, que a través de Rap1, modula negativamente la activación de ERK5 (figura 3B). Además, se comprobó que la fosforilación dependiente de PKA lleva a la disminución de los niveles locales de AMPc, a través de la activación de PDE4D3 (figura 3C)[36].



Recientemente, los grupos de Altschuler [37] y Bos [38], demostraron que Epac1 interacciona a través de su N terminal con miembros de la familia de proteínas ezrin-radixin-moesin (ERM). Al igual que ocurriera con el complejo formado por mAKAP, radixin tiene la capacidad de colocalizar PKA y Epac en un mismo microdominio, y coordinar la activación de ambos efectores del AMPc. Se observó que la deslocalización de Epac de este microdominio resultó en la inhibición de la proliferación mediada por TSH en células de tiroides de rata [37] y la adhesión en células Jurkat [38]. Sumado a esto, fue demostrada la localización de AC activas en los clusters formados por PKA y Epac [37].

La proliferación mediada por TSH de células de tiroides es un modelo clásico de modulación por AMPc. En el mismo, PKA y Epac actúan sinérgicamente para mediar los efectos mitogénicos del AMPc. Ambas vías convergen en la GTPasa Rap1b, a través de la fosforilación mediada por PKA en la serina 179 de Rap1b y el intercambio GDP/GTP inducido por Epac. Activación y fosforilación resultaron ser requisitos excluyentes para obtener una respuesta mitogénica completa [39]. De esta forma, el efecto mitogénico mediado por el AMPc resulta ser un claro ejemplo donde el ensamblado de microdominios conteniendo todos los componentes de esta respuesta, podría explicar la eficiencia y especificidad en la transducción de la señal (figura 4).



**Figura 4.** Microdominio involucrado en la proliferación de células de tiroides de rata. Radixin, proteína puente entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, recluta a los dos efectores del AMPc, PKA y Epac, los cuales colocan con AC activas. El aumento de los niveles de AMPc por estimulación local por TSH lleva a la activación (vía Epac) y fosforilación (vía PKA) de Rap1b, eventos estrictamente requeridos para transducir una completa señal proliferativa. Adaptado de Hochbaum, D., et al., Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem*, 2011. 286(1): p. 859-66.

### Conclusión

El desarrollo de nuevas tecnologías que permiten el estudio de interacciones entre proteínas y su localización subcelular, ha permitido obtener pruebas experimentales como para establecer el concepto de la compartimentalización de la señal como mecanismo de transducción sobre el viejo dogma de la libre difusión del AMPc. Hoy en día, está claro que una señal intracelular específica y eficiente, que produzca una apropiada respuesta celular estará mediada por microdominios del AMPc que contengan la mayor cantidad de los componentes de la vía.

**Tabla 1.** Nomenclatura y localización subcelular de variantes de splicing, isoformas y ortólogos de AKAPs, y moléculas asociadas.

AKAP	Moléculas Asociadas		Localización
AKAP-Lbc Brx proto-Lbc Onco-Lbc AKAP13	PKD PKC $\eta$ Rho	14-3-3 LC3 $\alpha$ -Catulin	Citoesqueleto Actina Citoplasma
AKAP18 ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) AKAP15 AKAP7	CaV1.1/1.2 PLB PDE4D	AQP2 NaV1.2a 5'-AMP	Membrana Plasmática Citosólico y Nuclear
AKAP79 AKAP150 AKAP75 AKAP5	PKC GluR1 mGluR1/5 AC5/6 KCNQ2 Kir2.1 TRPV1 IQGAP1	$\beta$ 1-AR SAP97 PSD-95 PP2B CaV1.2 ASIC1a/2a NMDAR	Membrana Plasmática Densidades Postsinápticas
mAKAP AKAP100 AKAP6	PDE4D3 Nesprin-1 $\alpha$ Epac PDK1 Siah2	VHL RyR NCX MEK/ERK5 AC5 HIF-1 $\alpha$	Envoltura Nuclear Reticulo Sarcoplasmático
Gravin ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) AKAP250 AKAP12	PKC $\beta$ 2-AR CyclinD		Membrana miristoilada Citoesqueleto
D-AKAP1 AKAP84 S-AKAP84 AKAP121 AKAP140 AKAP149 AKAP1	PP1 PTPD1 Lamin B PDE7A	AMY-1 HIV-1 RT mRNA RSK1 PP2Ac	Mitocondria Reticulo Endoplasmático
CG-NAP Yotiao Hyperion AKAP350 AKAP450 AKAP120 AKAP9	PP1 NMDAR KCNQ1 IP3R PKC $\epsilon$	CK1 PDE4D3 PKN GCP2/3 CLIC PP2A	Centrosoma Golgi Membrana Plasmática
Rab32	Varp CD44 ICAM-1/2 RhoGDI	S100P Wwox	Miofilamentos
Myospryn	Desmin Dysbindin Dystrophin		Preilación N-terminal

Pericentrin	PKC	Tubulin	Centrosoma
MAP2 A,B,C,D	Tubulin F-actin Src	Grb2 Myosin VIIa Fyn CaV1.2	Microtubulos
AKAP220 AKAP11	PP1 GSK3 $\beta$	GABACR AQP2	Vesiculas
Ezrin AKAP78 EZR	CFTR EBP50 NHERF	FAK Merlin	Citoesqueleto Actina
AKAP95 AKAP8	Condensin PDE7A AMY-1p68 RNA	helicase MCM2	Matris Nuclear

Adaptado de Welch, E.J., B.W. Jones, and J.D. Scott, Networking with AKAPs. *Molecular Interventions*. 10(2): p. 86-97.

### Referencias

1. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES. *J. Biol. Chem.*, 1958. 232(2): p. 1065-1076.
2. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, FRACTIONATION AND CHARACTERIZATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE FORMED BY TISSUE PARTICLES. *J. Biol. Chem.*, 1958. 232(2): p. 1077-1092.
3. Sutherland, E.W., Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, 1972. 177(47): p. 401-8.
4. Tasken, K. and E.M. Aandahl, Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.*, 2004. 84(1): p. 137-167.
5. Borland, G., B.O. Smith, and S.J. Yarwood, EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *British Journal of Pharmacology*, 2009. 158(1): p. 70-86.
6. Robinson, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland, Cyclic AMP. *Annual Review of Biochemistry*, 1968. 37(1): p. 149-174.
7. Kato, A. and K. Touhara, Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. 66(23): p. 3743-3753.
8. Hanoune, J. and N. Defer, REGULATION AND ROLE OF ADENYLYL CYCLASE ISOFORMS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2001. 41(1): p. 145-174.
9. Keravis, T.L., C., Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases (PDE) and Peptide Motifs. *Current Pharmaceutical Design*. 16: p. 1114-1125.
10. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.*, 1968. 243(13): p. 3763-3765.

11. Francis, S.H. and J.D. Corbin, Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases: Intracellular Receptors for cAMP and cGMP Action. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1999. 36(4): p. 275-328.
12. Kaupp, U.B. and R. Seifert, Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol. Rev.*, 2002. 82(3): p. 769-824.
13. de Rooij, J., et al., Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 1998. 396(6710): p. 474-7.
14. Bos, J.L., Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006. 31(12): p. 680-686.
15. Brock, M., et al., Conformational analysis of Epac activation using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2007. 282(44): p. 32256-63.
16. Cheng, X., et al., Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008. 40(7): p. 651-662.
17. Levitzki, A., From epinephrine to cyclic AMP. *Science*, 1988. 241(4867): p. 800-806.
18. Zaccolo, M., P. Magalhães, and T. Pozzan, Compartmentalisation of cAMP and Ca<sup>2+</sup> signals. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002. 14(2): p. 160-166.
19. Karpen JW, R.T., Resolution of cAMP Signals in Three-Dimensional Microdomains Using Novel, Real-Time Sensors. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 2004. 47: p. 1-5.
20. Welch, E.J., B.W. Jones, and J.D. Scott, Networking with AKAPs. *Molecular Interventions*. 10(2): p. 86-97.
21. Theurkauf, W.E. and R.B. Vallee, Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 1982. 257(6): p. 3284-3290.
22. Di Benedetto, G., et al., Protein Kinase A Type I and Type II Define Distinct Intracellular Signaling Compartments. *Circ Res*, 2008. 103(8): p. 836-844.
23. Tao, J. and C. Malbon, G-protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins AKAP5 and AKAP12: differential signaling to MAPK and GPCR recycling. *Journal of Molecular Signaling*, 2008. 3(1): p. 19.
24. Gardner, L.A., et al., AKAP79-mediated Targeting of the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase to the  $\beta_1$ -Adrenergic Receptor Promotes Recycling and Functional Resensitization of the Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(44): p. 33537-33553.
25. Dessauer, C.W., Adenylyl Cyclase-A-kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in cAMP Signaling. *Molecular Pharmacology*, 2009. 76(5): p. 935-941.
26. Piggott, L.A., et al., The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(37): p. 13835-13840.
27. Kapiloff, M.S., et al., An Adenylyl Cyclase-mAKAP $\beta$  Signaling Complex Regulates cAMP Levels in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(35): p. 23540-23546.
28. Sadana, R., N. Dascal, and C.W. Dessauer, N Terminus of Type 5 Adenylyl Cyclase Scaffolds Gs Heterotrimer. *Molecular Pharmacology*, 2009. 76(6): p. 1256-1264.

29. Mongillo, M., et al., Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases. *Circulation Research*, 2004. 95(1): p. 67-75.
30. Zaccolo, M. and T. Pozzan, Discrete Microdomains with High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *Science*, 2002. 295(5560): p. 1711-1715.
31. Dodge, K.L., et al., mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J*, 2001. 20(8): p. 1921-1930.
32. Tasken, K.A., et al., Phosphodiesterase 4D and Protein Kinase A Type II Constitute a Signaling Unit in the Centrosomal Area. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(25): p. 21999-22002.
33. Asirvatham, A.L., et al., A-Kinase Anchoring Proteins Interact with Phosphodiesterases in T Lymphocyte Cell Lines. *The Journal of Immunology*, 2004. 173(8): p. 4806-4814.
34. Willoughby D, C.D., Use of single-cell imaging techniques to assess the regulation of cAMP dynamics. *Biochem Soc Trans.*, 2006. 34: p. 468-71.
35. Martin AC, C.D., Layers of organization of cAMP microdomains in a simple cell. *Biochem Soc Trans.* , 2006. 34: p. 480-483.
36. Dodge-Kafka, K.L., et al., The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*, 2005. 437(7058): p. 574-578.
37. Hochbaum, D., et al., Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem*, 2011. 286(1): p. 859-66.
38. Gloerich, M., et al., Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(22): p. 5421-31.
39. Hochbaum, D., et al., Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J Biol Chem*, 2008. 283(8): p. 4464-8.



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)