

Resumen por Mauricio Lema  
Nombre del profesor: Federico Fuenmayor  
Título del curso: Máster en Oncología Molecular CNIO - 2012-2014  
Fecha: 16.09.2012

## RUTA PI3K / PTEN / AKT

Nivel de complejidad: 4/5  
Calidad y claridad del expositor: 5/5  
Lecturas suplementarias necesarias: sospecho que sí (no las he hecho).

### **Principios generales de señalización celular**

Se enfatiza la importancia de los componentes intracelulares de las rutas de señalización: proteínas G, kinasas y fosfatasas, así como los módulos.

Las proteínas G sirven como switches moleculares. En su estado inactivo, las proteínas G tienen un GDP en su sitio activo. Proteínas activantes como las GEFs y GPCRs favorecen la incorporación de un GTP, activándolas. La hidrólisis de un Pi del GTP convirtiéndola nuevamente en inactiva apaga el switch. Las proteínas inhibitorias GAP/RGS pueden hacerlo.

Las kinasas y fosfatasas determinan la actividad, localización subcelular, interacción con otras rutas, y degradación de las proteínas de señalización.

Los módulos son dominios funcionales de las proteínas que por su estructura favorecen el ensamblaje de complejos macromoleculares permitiendo o interrumpiendo las interacciones secuenciales propias de las rutas o el reclutamiento de las enzimas en las localizaciones subcelulares apropiadas.

Se enfatiza la importancia de los dominios PH (Homólogos a la Pleckstrina) que tienen gran afinidad por el PIP3 en la membrana. Las proteínas como la Akt que tienen dominios PH tienden a unirse al PIP3.

Se enfatiza también la importancia de los dominios SH2 porque tienen afinidad por los grupos Tirosina Fosforilados (especialmente de la forma Y-X-X-M, con una metionina 3 residuos después de la fosfotirosina). Recordemos que Y es Tirosina.

Los dominios PTB tienen afinidad por las fosfotirosinas con secuencias hy-X-N-P-X-Y; las 14-3-3 se unen a las fosfoserinas de la forma RSXSXP; SH3 se a las PXXPX (Cajas de Prolina); las PDZ se unen a las E-S/T-D-V-COOH y las WW a las P-P-X-Y

Como ejemplo, se menciona la siguiente ruta: después de una activación de un RTK, la proteína adaptadora Grb2 se une al receptor fosforilado por su dominio SH2 y recluta el SOS (un GEF del Ras) por su módulo SH3, colocalizando todo el complejo en la membrana y cerca del RTK. El Ras activo hace lo que hace

Se denomina transmodulación las interacciones horizontales con otras rutas.

### **Papel central ruta PI3K/PTEN/Akt**

Es una vía de señalización muy importante porque es activada por muchos estímulos, y controla aspectos claves como el crecimiento, proliferación, supervivencia, motilidad y metabolismo. Está frecuentemente alterada en patología humana.

## **Mecanismos de acción y homeostasis del PIP3 en la células: estímulos implicados**

Los fosfatidil inositoles son segundos mensajeros lipídicos ubicados en la MEMBRANA CELULAR, y son de gran importancia en la biología. Surgen de la fosforilación de su inositol en la posición 4 y 5 por medio de kinasas, formando el inositol 4,5 difosfato o PIP2. El PIP2 se puede escindir en InsP3 y DAG (Diacilglicerol) por acción de la fosfolipasas C o PLC como es conocida. Más importante para nuestros intereses de esta clase, el PIP2 se puede convertir en Fosfatidil-inositol 3, 4, 5 trifosfato o PIP3 por la acción de PI3K que fosforila la posición 3 del inositol. Cada uno de estos segundos mensajeros desencadenan actividades celulares importantes por medio de la activación de sus respectivos “cassettes”.

La formación de PIP3 a partir del PIP2 por la PI3K es importante pues, las proteínas con dominios PH tienden a ser reclutadas por el PIP3 en la membrana celular (que es donde se ubica). Como habíamos mencionado la Akt (o PKB, como también se le conoce) tiene un dominio PH que interacciona con PI3, activándose.

Tan importante como la formación del PIP3 es su des-formación que es realizada por dos fosfatasas denominadas PTEN y SHIP que remueven los grupos fosfatos de la posición 3' y 5', respectivamente.

La importancia de la PI3K estriba en que diversas señales que estimulan sus RTKs la utilizan para AMPLIFICAR su ruta de señalización intracelular, como: BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), EGF, Ephrinas, FGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NT-3 (Neurotrophin-3), NT-4/5, PDGF, VEGF. Además, hay una estrecha interacción de la PI3K con el Ras pues muchas de los estímulos que activan PI3K también activan el Ras, y el Ras estimula la actividad de la PI3K como veremos más adelante.

## **PI3K: Subunidades catalíticas y reguladoras, isoformas, mecanismos de activación**

Veamos con más detalle la PI3K tipo IA (ver imagen 23 del documento). Esencialmente, se trata de un heterodímero con un componente kinasa (denominado p110 con letras alpha, beta o delta) y otro regulador (denominado p85 alfa o beta). El p110 tiene un dominio de unión al p85, y el p85 tienen dos dominios SH2 que tienen afinidad por las Tirosinas fosforiladas de los RTK. Además de la unión directa al RTK, el p85 puede unirse a través de proteínas adaptadoras que se unen, a su vez, al RTK, como la IRS-1 (de importancia reguladora como se verá más adelante).

La PI3K inactiva tiene su p110 plegada sobre sí y unida a la p85 por interacciones intercatenarias (por ejemplo el ácido glutámico E545 de la cadena 110 es esencial para el pliegue de la PI3K, como veremos más adelante).

La activación de la ruta sucede cuando se fosforilan las Tirosinas del receptor que se unen a la PI3K por los dominios SH2 de la subunidad reguladora p85 cerca de la membrana celular. La actividad kinasa de la subunidad p110 transforma PIP2 en PIP3. La activación independiente del Ras (y otras proteínas adaptadoras como la GbetaGamma) aumenta estabilidad de la conformación activa de la p110.

## **PTEN y su modulación**

La proteína PTEN se encarga de la hidrólisis del PIP3 a PIP2, y está compuesta por varios dominios que incluyen una ubiquitina ligasa, una fosfatasa y un dominio C-terminal que reconoce PDZ, GSK3

y CK2. En su forma fosforilada inactiva, el PTEN oculta su sitio activo (fosfatasa) por la formación de un “pestillo”, que se remueve cuando se activa (defosforilado).

### **Propagación de la señal intracelular del PIP3**

El PIP3 participa en diversas rutas importantes para el crecimiento, proliferación, supervivencia, motilidad y metabolismo, y lo hace – en gran medida – por la activación del Akt y la PDK1. Veamos cómo sucede: la Akt es una kinasa con un dominio PH que reconoce PIP3. En su configuración inactiva, la Akt está plegada sobre sí misma. Al unirse al PIP3 se estira y es activada por la fosforilación de la Tirosina 308 por la PDK1 y su Serina 473 por la mTORC2.

### **Vías de señalización moduladas por Akt: mTORC1, Foxo, Mdm2, GSK3, Bad – retroalimentación y transmodulación**

La fosfo-Akt se encarga de la fosforilación de decenas de targets importantes para el metabolismo (FOXO, IRS1, GSK3 y las enzimas glucolíticas, etc), traducción (mTOR, TSC1/2, FOXO, PRAS40, S6K), proliferación (FOXO, p21, p27), supervivencia (BAD, Procaspasa 9, CREB, p21, p27, MDM2, GSK3) y angiogénesis (eNOS) y motilidad. Al final, tiene efectos metabólicos importantes en diabetes y enfermedad cardiovascular, y mitogénicos importantes en cáncer; entre otros procesos celulares.

#### *Efectos metabólicos*

La Akt (PKB) incrementa la síntesis de glicógeno (GSK3), proteínas, la entrada de glucosa y la síntesis lipídica.

#### *Efectos cardiovasculares*

El receptor de insulina activa la ruta PI3K/Akt estimulando la producción del NO cardioprotector. Cuando hay resistencia a la insulina se desencadena una cascada lesiva que se ilustra en la imagen 42 (que no entendí, ni me interesa en este momento).

#### *Modulación del Mdm2 / p53*

La fosfo - Mdm2 activada por la Akt se transloca al núcleo inhibiendo la p53 al aumentar su destrucción proteosómica vía ubiquitina. Al disminuir la Mdm2 citosólica se disminuye el recambio de la fosfo – GRK2, esencial para la migración celular (junt con la fosforilación de la HDAC6).

#### *Modulación del FOXO*

El factor de transcripción FOXO estimula la transcripción de proteínas inhibitorias de la proliferación celular (p27) y proapoptóticas (Bim). La fosforilación del FOXO por la Akt y su subsecuente unión a la 14-3-3 lo inactiva.

#### *Akt y apoptosis*

La fosfo Akt fosforila varias proteínas involucradas en la apoptosis como la Mdm2 (que inhibe la p53, como ya vimos) y la NFkappaB. Varias de sus fosforilaciones son inhibitorias como las de BAD, BIM, FOXO, GSK3 (ésta última inhibe Myc y Ciclina D según diapositiva 61 de 78).

#### *Akt y mTOR*

La mTOR es una proteína que es parte esencial de los complejos multiproteínas mTORC1 y mTORC2. El mTORC1 es esencial para el crecimiento celular y la síntesis de proteínas que fosforilan la S6K y la 4E-BP1 que a su vez fosforilan los factores de transcripción S6 (positivo) e inhiben el eIF4E, respectivamente. El mTOR es inhibido por el TSC1/2, que a su vez inhibe Rheb (que a su vez inhibe el mTOR). La fosfo Akt fosforila el TSC1/2, activando el mTOR en la mTORC1.

La interacción de la mTOR con el PI3K/Akt es compleja: el complejo mTORC2 fosforila la Akt, activándolo. La fosforilación del PRAS40 inhibe su inhibición sobre el mTOR, activando la traducción. Más importante

aún, la retroalimentación negativa de la ruta se realiza por la S6K que inactiva la proteína adaptadora IRS-1 que sirve de puente entre la gp85 de la PI3K y el RTK fosforilado.

#### *Transmodulación de Akt vía mTOR*

Diversos estímulos afectan a la mTOR por intermedio del TSC1/2 y Rheb. Es así como la Hipoxia y estrés energético activan la TSC1/2; en tanto que las señales de crecimiento como ERK, Akt, IKK $\beta$  lo inhiben estimulando el crecimiento celular mediado por Ras, PI3K y Citocinas como TNF $\alpha$ , respectivamente. Se postula que los niveles de aminoácidos estimulan en Rheb promoviendo la síntesis proteica y el crecimiento celular por acción de la mTORC1

### **Alteraciones de la ruta PI3K/PEN/Akt en contextos tumorales**

Varias anomalías han sido descritas en la ruta PI3K/PEN/Akt asociadas a tumores. Ellas incluyen pérdida de la función del PTEN (por mutación con LOF (pérdida de función), deleción, o silenciamiento epigenético), ganancia de función o amplificación de las subunidades kinasas del PI3K, mutaciones con GOF (ganancia de función) de las subunidades regulatorias de la PI3K, mutaciones y amplificaciones de las diferentes isoformas de Akt y PDK1. Todas están implicadas en cáncer de mama.

Un ejemplo de una mutación importante de la PI3K es la que involucra el residuo E545 de la subunidad p110. Cuando la carga negativa de este residuo se pierde por mutación la PI3K se abre exponiendo el sitio activo e inicia actividad constitutiva (ie, no regulada).

### **Estrategias de inhibición de la ruta PI3K/PEN/Akt**

Se puede obtener inhibición de toda esta ruta dirigiendo medicamentos contra el receptor (MOAs, TKIs), inhibiendo la PI3K, AKT, TORC1 y TORC2 utilizando competidores de ATP en sus sitios activos. Todos conocemos los inhibidores de RTKs. Los inhibidores de PI3K son todavía siglas (léase, no han servido - aún), los inhibidores de Akt son siglas con excepción de la Perifosina (que no sirve mucho), y los inhibidores de mTOR son rapamicina y sus análogos que los usamos en la clínica.

La inhibición de la mTOR interfiere con el asa de retroalimentación negativa por la S6K causando ACTIVACIÓN paradójica de la PI3K/AKT “upstream”. Se ha postulado que el uso de Metformina que incrementa el “estrés energético” puede disminuir la actividad de la mTORC1 por la acción inhibitoria de la AMPK y la AICAR, constituyéndose en una vía terapéutica potencial. Se postulan otras estrategias como inhibidores duales mTOR, PI3K; entre otros. Se entra en especulaciones difíciles de resumir.

### **Comentarios finales de quien resume**

En varios momentos, el expositor nos menciona que la complejidad es mucho mayor de lo que nos ilustra en la clase. Por ejemplo, toda la retahíla sobre la PI3K es sólo sobre la PI3K tipo I, pero hay tipo II y tipo III, Aún dentro de las tipo I, hay tipos Ia y otras. En otra parte de la clase nos muestra cómo dentro de un mismo tumor en un mismo individuo hay diferentes mutaciones en diferentes sitios tumorales (Gerlinger NEJM 2012; 366:883-92). En otra parte menciona la importancia de los nuevos tipos de RNA – incluso de uno nuevo denominado ceRNA (competing endogenous RNA) que estimulan la transcripción de proteínas al “quelar” siRNAs. Para finalizar este concepto que nos invita a la humildad, en varias oportunidades menciona que la transmodulación con otras vías genera redes de interacción entre las rutas que pueden ser imposibles de comprender o manipular.