Alteraciones genéticas asociadas a retinosis pigmentaria en proteínas del ciclo visual (II)

Descripción de las proteínas más relevantes

Eva Ramon[*]
Luis del Valle[*]
Laia Bosch[*]
Guadalupe Götzens[**]
César Urtubia[**]
Pere Garriga[*]

[*]Departament d'Enginyeria Química
[**]Departament d'Òptica i Optometria
Escola d'Òptica i Optometria de Terrassa
Universitat Politècnica de Catalunya

Palabras clave: Arrestina. Fosfodiesterasa. Canal dependiente de GMPc. PRKCG

En un trabajo anterior se presentó una visión global de las numerosas mutaciones que producidas tanto en las proteínas directamente implicadas en el ciclo visual, como en las enzimas que contribuyen a la recuperación del retinal o que actúan como factores de transcripción o bien como proteínas estructurales, tienen como efecto común una de las muchas manifestaciones del grupo de enfermedades degenerativas de la retina conocidas como retinosis pigmentaria.

Correspondencia
Eva Ramon
Departament d'Enginyeria Química
Escola d'Òptica i Optometria de Terrassa
Universitat Politècnica de Catalunya
Violinista Vellsolà 37
08222 Terrassa
pere.garriga@upc.es

En este segundo trabajo se describirán las mutaciones y los efectos que producen en las proteínas implicadas estrictamente en la cascada visual o procesos bioquímicos de la fototransducción. Estas proteínas son: La *opsina* o porción proteica de la rodopsina, que fue descrita con detalle en el primer artículo de la serie (Ramon et al. 2002); las subunidades α y β de la *fosfodiesterasa PDE6*; la *arrestina*; la *proteína túnel* o *canal dependiente de GMPc*; *la PRKCG, proteína perteneciente a la familia de proteínas quinasa C.*

Arrestina

Las proteínas que forman parte de la familia de las arrestinas son responsables de la regulación de los receptores acoplados a proteína G y se localizan en diferentes tejidos

del organismo, por ejemplo: la β-arrestina que es reguladora del receptor β_2-adrenérgico. A la arrestina asociada al mecanismo visual se la denomina S-antígeno, es la segunda proteína soluble con más presencia en el segmento externo de los bastones y tiene un peso molecular de 48Kda. Se la ha localizado también en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Nicolas et al, 2000) y consta de 404 aminoácidos.

Cada molécula está formada por dos dominios, denominados N y C cada uno de los cuales estructurado por un conjunto de 7 hojas-β agrupadas en grupos de 3 y 4. El dominio N presenta una helice-α mientras que el dominio C presenta dos hélices 3_{10} cortas. Éstas dos cortas hélices se sitúan en la interfase de los dos dominios (fig 1).

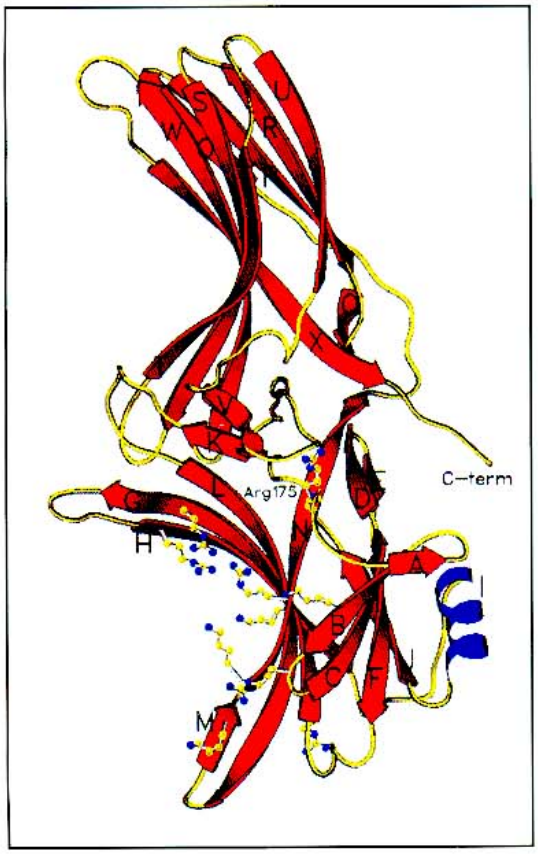

Fig. 1. Arrestina visual que está constituida principalmente por la estructura secundaria β-sheet (en rojo) y presenta una helix-α (en azul). Según la disposición de la figura el extremo carboxilo (C-termina)l se encuentra en la parte superior mientras que el extremo amino (N-terminal) se encuentra en la parte inferior. Los aminoácidos marcados con el modelo ball and stick (Lys 2, Lys 15, Arg 18, Arg 56, Arg 66, Arg 80, Lys 150, Lys 163, Lys 166, Arg 171, Arg 175) posiblemente son los que están relacionados en la unión con el extremo C-terminal fosforilado de la rodopsina activada (Hirsch, 1999).

La arrestina se encuentra en forma monomérica (una sóla molécula) y dimérica (complejo de dos moléculas). La responsable de regular a la rodopsina uniéndose a su extremo carboxilo terminal (C-terminal) cuando está fosforilado es la forma monomérica (Hirsch et al, 1999). Una vez activada se asociará a los bucles 1, 2 y 3 intracitoplasmáticos.

A partir de determinados experimentos se ha observado que hay aminoácidos que ejercen una importante función en la proteína. Éstos son arginina 171, arginina 175 y arginina 176 en el caso de la arrestina bovina, (cargados positivamente) en la que se ha visto que tienen importancia en la interacción con los fosfatos de la rodopsina (cargados negativamente). Estos aminoácidos forman una cavidad que permitirá a la proteína unirse al extremo C-terminal de la rodopsina, que estará fosforilado (fig 2). Cuando la arrestina se encuentra inactiva esta cavidad es ocupada por su propio extremo C-terminal actuando de autoregulador.

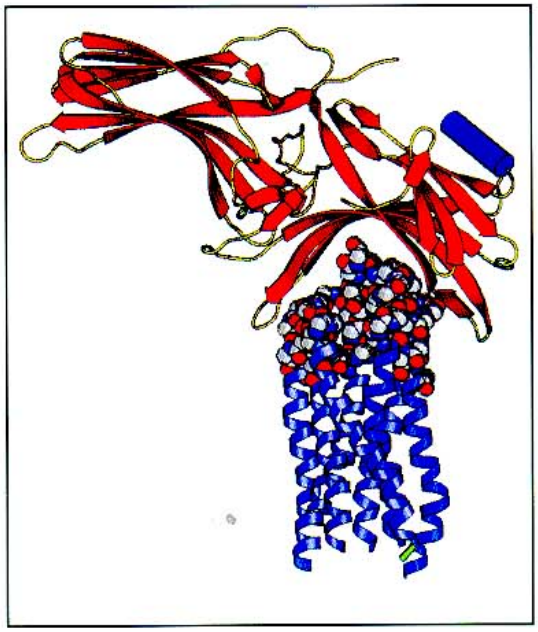

Fig. 2. Posible coordinación entre la arrestina (molécula en rojo) y la metarrodopsina II (modelo teórico en azul). La unión se realiza en la parte intracelular tal y como se puede observar (Hirsch 1999)

Las mutaciones en la arrestina conllevarían el funcionamiento ininterrumpido de la cascada fototransductora provocando degeneración de la retina por agotamiento metabólico, ya que la rodopsina estaría constantemente activa. Las mutaciones que pueden afectar a la arrestina y que pueden desencadenar la retinitis

pigmentosa son poco conocidas. Se ha descrito una deleción de una adenina en la posición 1147 del gen que desencadena la retinosis pigmentaria autosómica recesiva y la enfermedad de Oguchi simultáneamente (Nakagawa et al, 1998). El triplete constituido por esta base, AAC, provoca un salto en la pauta de lectura que afecta el extremo C-terminal, importante en la autorregulación de la arrestina (www.retina-international.org 1999).

Mutaciones en las subunidades α y β de la fosfodiesterasa-6 (PDE6)

La fosfodiesterasa (PDE) es un enzima responsable de hidrolizar enlaces éster en los que se encuentra involucrado un fosfato. La PDE 6 es la PDE que se encuentra en la retina y su función es la de catalizar la reacción cGMP a GMP provocando el cierre de los canales de Ca^{2+}/Na^{+} dependientes de este nucleótido presentes en la membrana de los segmentos externos de los bastones (ROS). Como consecuencia, se produce una hiperpolarización de la membrana externa en los fotorreceptores, que conlleva una disminución o un cese (si el estímulo luminoso es máximo) del neurotransmisor que recibe la siguiente neurona de la vía visual (Molday, 1998).

La PDE6 consta de dos subunidades α y β, que son indispensables para el funcionamiento del enzima y dos subunidades γ que actúan de inhibidoras de la actividad (Deterre et al, 1988). La subunidad α consta de 859 aminoácidos, la β de 853 y las dos γ de 150 cada una. El peso molecular es de alrededor de 90 KDa las subunidades α y β, y de alrededor 10 KDa cada una de las dos subunidades γ (Artemyev et al, 1996).

Se han encontrado tres mutaciones en PDEα (Huang et al, 1995). Los pacientes con este tipo de mutaciones en su PDE manifiestan ARRP. Estas mutaciones son Ser-344-Arg, Trp-561-Ter y Tyr-583-Terminal. Las mutaciones encontradas se basan en cambios puntuales de nucleótidos, que forma una proteína truncada, deleciones e inserciones, que provocan pérdidas en la pauta de lectura, las cuales alteran la función catalítica de la proteína. Concretamente en el caso de la mutación Ser-144-Arg, se sabe que la serina es un aminoácido altamente conservado en esta posición (Huang et al, 1995), es decir que se encuentra en la misma posición en PDEα de diferentes especies, y en consecuencia realiza una función muy importante, por lo tanto cualquier cambio en este punto es drástico para la proteína. Por otra parte es necesario mencionar que el cambio que se realiza es de un aminoácido sin carga por uno que se encuentra cargado positivamente provocando la formación de una proteína más inestable.

Respecto a la subunidad β, ha sido mayor el número de mutaciones encontradas en enfermos de RP. Las mutaciones que desencadenan la ADRP son Glu-166-Lys donde se produce un cambio de carga, Tyr-212-His y Leu-228-His, inserción de 22 pares de bases en el intron 5 que provocan la creación de un lugar de "splicing" del ARN mensajero. Juntamente con la Leu228His se manifiesta el cambio de base en el intrón 4 provocando un lugar de "splicing" (*glosario) de ARN mensajero (Gao et al, 1996). Son raras las mutaciones dominantes en esta subunidad (www.retina-internacional.org, 1999)

Las mutaciones que desencadenan la ARRP son aún más numerosas. En la posición 74 se pueden observar cambios tales como Arg-74-Cys y la inserción de una citidina que provoca un salto en la pauta de lectura. Otras mutaciones que provocan cambios de aminoácidos son: Tyr-219-His, Leu-228-His, ésta última también causante de ADRP (Tiller et al, 1994), Arg-552-Gln y Asp-600-Asn que provoca la eliminación de una carga positiva y negativa respectivamente; Leu-527-Pro que debido a las características de la prolina provoca un giro en esta parte de la proteína; His-557-Tyr, Gly-576-Asp en la que se introduce una carga negativa y una cadena lateral más voluminosa aumentando la inestabilidad creada; Leu-699-Arg, que añade carga positiva, Ile-535-Asn (Saga et al, 1998) y Leu-854-Val. También pueden encontrarse mutaciones tipo Cys-270-Ter dando a lugar una proteína truncada al igual que las mutaciones Gln-298-Ter (McLaughlin et al, 1995), Arg-531-Ter y Lys-706-Ter. Algunas mutaciones que no afectan de manera directa a los aminoácidos, serían las presentes en el codón 240 el cual se encuentra duplicado y presenta la inserción de siete pares de bases provocando la consecuente pérdida de la pauta de lectura (Bayes et al, 1995), así como las mutaciones puntuales en los intrones 2 y 18 que crean un lugar de "splicing"; también la deleción de una base en las posiciones 1488 y 1585 correspondientes a la Pro-496 e His-620 respectivamente. Todas éstas provocan cambios en la pauta de lectura, dando lugar una proteína truncada.

Respecto a la subunidad β no se han encontrado hasta el momento mutaciones que desencadenen RP pero se ha observado que

interacciona con RPGR (Proteína Reguladora de la actividad GTPásica), de la que se han observado mutaciones relacionadas con la RP (Linari et al, 1999).

Canal dependiente de GMPc

La función del canal dependiente de guanosín-mono-fosfato cíclico (GMPc) es la de transportar al interior de la célula fotorreceptora Na^{+}/Ca^{+2} mediante el consumo de GMPc. Cuando la rodopsina es iluminada activa a la transducina que a su vez interacciona con la PDE responsable de la reacción en la que el GMPc es degradado a GMP. Por lo tanto, después de esta cadena de activación y inactivación de proteínas disminuye la concentración intracelular de GMPc y como consecuencia la de Na^{+}/Ca^{2+} (ver esquema de la cascada visual en el artículo anterior). El proceso acabará con la hiperpolarización de la membrana plasmática del fotorreceptor transmitiéndose de este modo la señal nerviosa. Se trata de una proteína heteroligomérica presente exclusivamente en la membrana plasmática (Cook, 1989) y constituida por tres subunidades denominadas α, β y γ. De α y β se sabe que presentan un extremo N y C terminal, seis fragmentos transmembrana que debido a su estructura forman un poro (fig. 3). El peso molecular de α es de 63KDa mientras que la subunidad β forma parte de un complejo proteico de 240 Kda (Chen et al, 1994). Respecto la subunidad , tiene un peso molecular en torno los 32 KDa y consta de 299 aminoácidos (Ardell et al, 1995).

En cuanto a las mutaciones presentes en el canal que pueden desarrollar RP se han encontrado en la subunidad α (Dryja et al, 1995). Éstas son las Glu-76-Ter, Lys-139-Ter, Ser-336-Phe y la deleción de una base en la Arg-654 provocando pérdidas en la pauta de lectura. En estos cuatro casos se manifiesta la ARRP. Los autores del trabajo proponen que estas mutaciones dan a lugar proteínas truncadas sin fragmentos transmembrana o bien sin un poro formado, eliminando la función de la proteína. También asocian estas mutaciones, en concreto la deleción en Arg654 y Ser336Phe, a la degeneración de los bastones debido a la acumulación de estos receptores en el interior impidiendo el funcionamiento normal de otras vías metabólicas de la célula. El por qué quedan retenidas aún está por saber. En cualquier caso se provoca la inactivación del receptor que

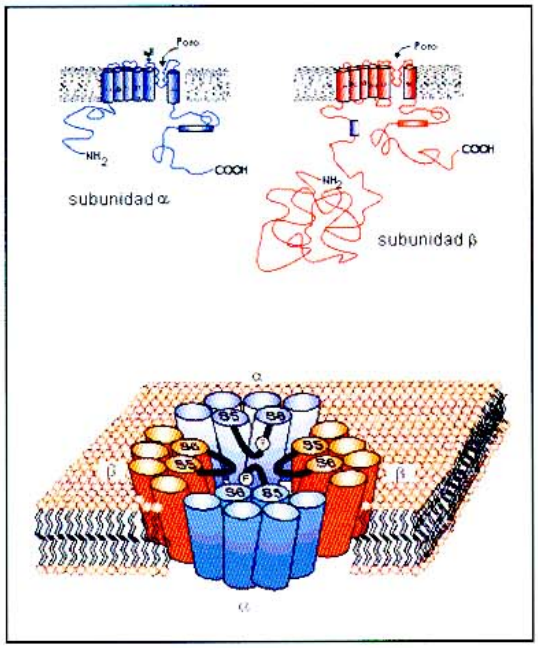

Fig. 3. Esquema de la proteína túnel o canal de Ca^{2+}/Na^{+} dependiente de GMPc. Se puede observar la distribución de las subunidades α y β que permite la formación del poro interno que permitirá el transporte de iones a través de la membrana. En esta figura no se representa la subunidad γ (Molday, 1998).

sería un similar al comportamiento derivado de la activación de la rodopsina (en la que disminuye la presencia de cGMP en el citoplasma). Pero aún falta por determinar el mecanismo molecular de esta degeneración).

Respecto a las subunidades β y γ aún no se ha localizado ninguna mutación que desencadene la RP.

PRKCG

La PRKCG es un proteína codificada por un gen de 18 exones, ampliamente transcrito en la retina y perteneciente a la familia de genes que codifican para proteínas de la familia de la proteína quinasa C y el cual se ha clasificado como miembro de los genes RP11 (el mayor *locus* de adRP).

Se ha detectado (Al-Maghtheh et al, 1998) un cambio de base que provoca la mutación Arg-659-Ser que afecta a uno de los dominios catalíticos de la proteína, concretamente el 4. Este cambio de aminoácidos provoca la eliminación de la carga positiva de la arginina, que es un residuo muy conservado en diferentes especies. La proteína resultante es poco estable y puede afectar a su función que si bien no se conoce con exactitud parece estar

relacionada en la inactivación de la rodopsina. El fenotipo de los enfermos de RP es de tipo "bimodal", es decir, que se han detectado personas que manifiestan los primeros estadios de la enfermedad y otros que no se distinguen respecto el individuo sano.

Terapias

Se desconocen terapias efectivas que erradiquen la enfermedad. Los tratamientos que se utilizan son básicamente la ingestión de vitamina A (controlando la dosis para evitar su toxicidad). Se hicieron estudios a partir de retinas trasplantadas de cadáveres (Kaplan et al, 1997) en el que se obtuvieron resultados positivos sobre la inmunodeficiencia, ya que era uno de los problemas más importantes en este tipo de operaciones. Posteriormente se efectuaron experimentos sobre mutaciones recesivas basados en terapia génica en los que se quería introducir genes antiapoptóticos (para impedir la muerte celular) (Bennet et al, 1998), entre otros. En el caso de las RP dominantes, se han realizado experimentos con ribozimas sobre animales transgénicos, pequeñas moléculas de RNA que tienen capacidad para digerir ARN en unas secuencias específicas (La Vail et al, 2000), en los que han obtenido resultados satisfactorios. Actualmente se están estudiando las repercusiones e inconvenientes que se pueden derivar de estos tratamientos.

Conclusiones

En este trabajo se ha intentado resumir de forma concreta las mutaciones presentes en las proteínas que actúan en las reacciones para transformar la energía luminosa en energía electroquímica. Es importante destacar la ausencia de la transducina en esta lista, siendo uno de los puntos importantes en la transducción de la señal. Existen sin embargo otras retinopatías debidas a mutaciones en esta proteína, como el caso de la variante "Nougaret" de la ceguera nocturna estacionaria congénita (Dryja et al, 1996), en la que la mutación se presenta en la subunidad α.

Tal y como se ha comentado anteriormente la RP es una enfermedad muy heterogénea que puede manifestarse a partir de diferentes mutaciones en la misma proteína y también en diversas proteínas. Hay una gran diversidad de mutaciones que pueden originar RP (Farrar et al, 2002). Esto permite discernir sobre las vías principales en las que la enfermedad puede llegar a desarrollarse pero a su vez complica aún más las posibles terapias.

Glosario

1. Los aminoácidos se presentan siguiendo el código de 3 letras que sigue a continuación:

- Alanina: Ala
- Arginina: Arg
- Asparragina: Asn
- Aspartato: Asp
- Cisteína: Cys
- Fenilalanima : Phe
- Glicina: Gly
- Glutámico: Glu
- Glutamina: Gln
- Histidina: His
- Isoleucina: Ile
- Leucina: Leu
- Lisina: Lys
- Metionina:Met
- Prolina : Pro
- Serina : Ser
- Tirosina: Tyr
- Treonina : Thr
- Triptofano: Trp
- Valina: Val

Para nombrar una mutación puntual se seguirá la nomenclatura aminoácido original-nº que ocupa en la estructura primaria-aminoácido cambiado. Por ejemplo:

Ser144Arg

2. En el texto también se mencionan determinados conceptos genéticos o bioquímicos que se definirán a continuación:

- Aminoácido conservativo: Aminoácido presente en la misma posición en diferentes proteínas homólogas. Esta posición no hace referencia al número del aminoácido que ocupa en la proteína sino a la posición en el espacio.
- Intrón: Es la parte del ARN que no se traduce a proteína.
- Exón: Es la parte del ARN que traduce a proteína.
- "Splicing": Es el proceso que se realiza en la maduración del pre-MRNA para transformarse a RNA maduro, que es el que será traducido a proteína. El pre-RNAmensajero (pre-RNAm) está constituido por exones y intrones. Durante el proceso de maduración a RNAm maduro se cortan los intrones para poder unirse los exones entre sí. Este proceso de "Splicing" vulgarmente se llamaría proceso de "corte y pega".
- Fenotipo: Manifestación física de los caracteres codificados a partir de un gen.

- Transcripción: Proceso de síntesis de un fragmento de RNA a partir de una secuencia de DNA (gen) para producir una proteína.

- Traducción: Proceso de síntesis de una proteína a partir de una cadena de RNA.

Bibliografía

- Al-Maghtheh M, Vithana EN, Inglehearn CF, Moore T, Bird AC, Battacharya SS. Segregation of a PRKCG mutation in two RP11 families. Am J Hum Genet 1998;62:1248-1252.

- Ardell MD, Makhija AK, Oliveira L, Miniou P, Viegas-Pequignot E, Pittler SJ. cDNA, gene structure, and chromosomal localization of human GAR1 (CNCG3L), a homolog of the third subunit of bovine photoreceptor cGMP-gated channel. Genomics 1995;28(1):32-38.

- Artemyev NO, Surendran R, Lee JC, Hamm HE. Subunit Structure of Rod cGMP Phosphodiesterase. J Biol Chem 1996;271(41):25382-25388.

- Bayes M, Giordano M, Balcells S, Grinberg D, et al. Homozygous tandem duplication within the gene encoding beta-subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. Hum Mutat 1995;5:228-234.

- Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, Klatt L, Li Y, Maguire AM. Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. Gene Ther 1998;5(9):1156-1164.

- Chen TY, Illing M, Molday LL, Hsu YT, Yau KW, Molday RS. Subunit 2 (or β) of retinal rod GMPc-gated cation channel is a component of the 240 Kda channel-associate protein and mediates Ca^{2+}-Calmudolin modulation. Proc Natl Acad Sci (USA) 1994;91(24):11757-11761.

- Cook NJ, Molday LL, Reid D, Kaupp UB, Molday RS. The cGMP-gated channel of bovine rod photorreceptor is localized exclusively in the plasma membrane. J Biol Chem 1989;264(12):6996-6999.

- Deterre P, Bigay J, Forquet F, Robert M, Chabre M. CGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits. Proc Natl Acad Sci (USA) 1988;85(8):2424-2428.

- Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B. Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of Congenital Stationary Night Blindness. Nat Genet 1996;13:358-360.

- Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee L, Berson EL. Mutations in the gene encoding the á subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci (USA) 1995;92 (22)10177-10181.

- Farrar GJ, Kennan PF, Humphries P. On the genetics of Retinitis Pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. EMBO J 2002;21:5:857-864.

- Gao YQ, Dancinger M, Zhao DY, Blaney J, Piriev NI, Shih J, et al. Screening of the PDEB gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Exp Eye Res 1996;62(2):149-154.

- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. The 2.8 Crystal structure of visual Arrestin: A Model for Arrestin's Regulation. Cell 1999;97(2):257-269.

- Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L. Autosomal Recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. Nat Genet 1995;4:468-471.

- Kaplan HJ, Tongalp H, Tezel MD, Adam S, et al. Human photoreceptor Transplantation in Retinitis Pigmentosa. Arch Ophtlhalmol 1997;115:1168-1172.

- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: Long-term survival and late-stage therapy. Proc Natl Acad. Sci (USA) 2000;97(21):11488-11493.

- Linari M, Ueffing M, Manson F, Wright A, Meitinger T. The Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. Proc Natl Acad Sci (USA) 1999(96):1315-1320.

- Nakagawa M, Wada Y, Tamai M. Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmic 1998;116(4):498-501.

- Nicolas C, Ghedira I, Steimer R, Teufel B, et al. Identification of visual arrestin (S-antigen) in retinal pigmented epithelial cells. Curr Eye Res 2000;21(3):677-683.

- McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP. Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci (USA) 1995;92:3249-3253.

- Molday RS. Photoreceptor Membrane proteins, Phototransduction, and Retinal Degenerative Disease. IOVS 1998;39(13)2493-2513.

- Ramon E, Gómez J, Del Valle LJ, Urtubia C, Götzens G, Garriga P. Estructura tridimensional de la rodopsina. Ver y Oír 2002;19(166)403-409.

- Saga M, Mashima Y, Akeo K, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. A novel homozygous Ile535Asn mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in two brothers of a Japanese family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Curr Eye Res 1998;17(3)332-335.

- Tiller GE, Polumbo PA, Heinzman C, Kojis TL, Bateman JB. The gene for de β-subunit of rod cGMP phosphodiesterase (PDEB) is tighly linked to the huntington locus on human chromosome 4p16. Invest Ophthalmol Vis Sci 35(Suppl)1994:1265.

- www.lighthouse.org/resources_lv_compare.htm.

- www.retina-international.org/sci-news/cngalmut.htm.

- www.retina-international.org/sci-news/pdemut.htm.

- www.retina-international.org/sci-news/sagmut.htm.