Mecanismo de activación de la rodopsina

Unión y activación de la proteína-G transducina

Luis del Valle[1]
Eva Ramon[1]
Laia Bosch[1]
Guadalupe Götzens[2]
César Urtubia[2]
Pere Garriga[1]

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

La rodopsina es la proteína fotorreceptora de la retina[1-4] que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR)[5,6]. Ésta es una de las familias de proteínas transductoras de señal más amplia y de gran importancia en diversos procesos fisiológicos celulares. El estudio de los GPCR es cada vez más relevante en el campo farmacológico y tiene una significativa proyección biotecnológica en la industria farmaceútica. Se estima que alrededor del 40% de las dianas farmacológicas potenciales son GPCR, la mayoría de ellos con importantes implicaciones en la investigación biomédica y biotecnológica (fig. 1). Un ejemplo reciente es la subfamilia de receptores olfativos que comprende más de mil receptores en el ratón.

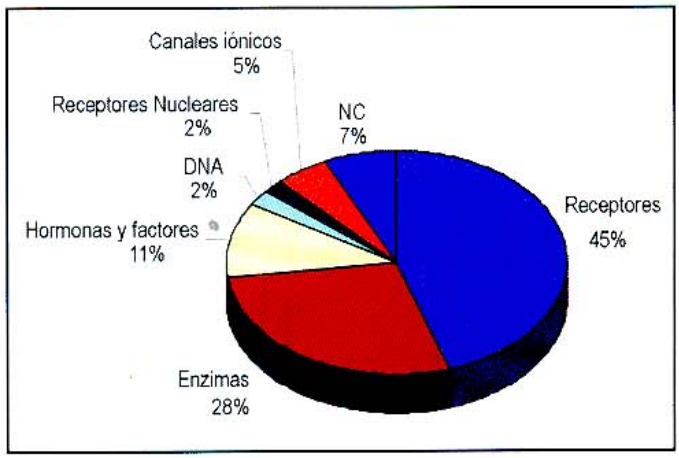

Fig. 1. Clasificación bioquímica de las dianas terapéuticas

La mayoría de hormonas polipeptídicas, todos los neurotransmisores monoaminas, las prostaglandinas, los iones como el Ca^{2+}, y aún estímulos sensoriales como la luz, los olores y los sabores tienen sus receptores en la membrana celular del mismo tipo. Estos

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

receptores constituyen una superfamilia, con características estructurales y funcionales comunes. Éstos están compuestos por una cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana, y los mecanismos de transducción de la señal son comunes a todos ellos, implicando la unión y activación de una proteína-G. Es por ello que reciben el nombre de GPCR (*G-protein-coupled receptors*) (fig. 2).

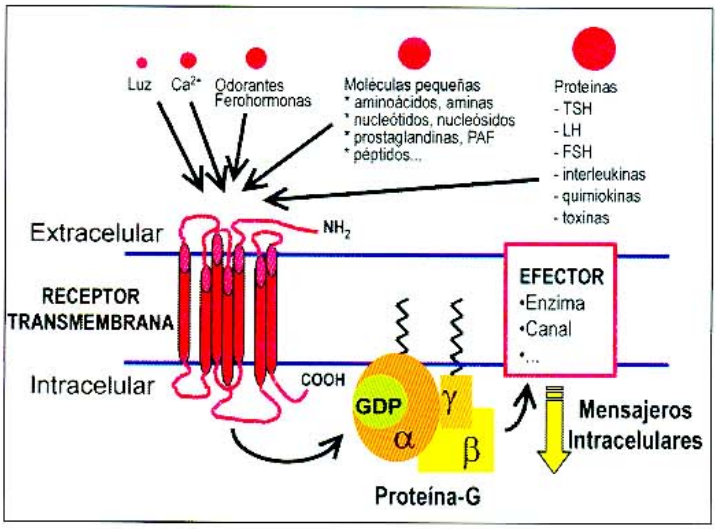

Fig. 2. Todos los GPCR, incluida la rodopsina, comparten la primera etapa del proceso de activación, es decir la unión y activación de una proteína G heterotrimérica, que en el caso de la rodopsina es la transducina (ver texto).

Clasificación de los GPCR

La amplia distribución de GPCR en los eucariontes e incluso en archaebacteria ha generado una base de datos enorme -y en crecimiento- para estas proteínas con el motivo de 7-hélices transmembrana (fig. 3). Por ejemplo, sólo de los genomas de los mamíferos se ha establecido más de 4300 GPCR[7].

Recientemente, se ha podido resolver la estructura cristalina de la rodopsina a 2.8 Å[8,9], y a partir de aquí se ha conseguido obtener una amplia información estructural acerca de este GPCR, por ejemplo en lo referente a disposición e interconectividad de las hélices. También se ha podido obtener información detallada del papel de moléculas de agua en el interior de la proteína[10]. En un trabajo previo se ha realizado un detallado análisis de las características estructurales de la rodopsina a la luz de estos estudios cristalográficos recientes[11]. La utilización de técnicas de ingeniería genética para obtener rodopsinas mutadas recombinantes es de gran interés en los estudios estructurales y funcionales de la rodopsina[12].

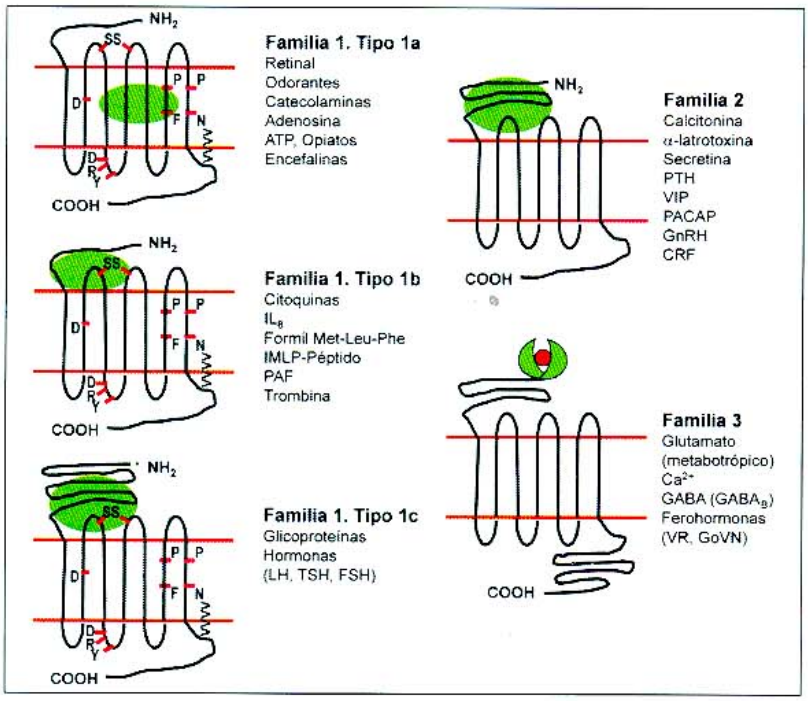

Fig. 3. Las distintas subfamilias de la familia de los GPCR. Éstas se caracterizan por tener distintos sitios de unión del ligando. La rodopsina visual pertenece a la familia 1a que se caracteriza por tener el sitio de unión del ligando, el 11-cis-retinal en el caso de la rodopsina, en la región transmembranal.

Activación de la rodopsina

La luz cuando incide sobre la retina llega primero a las capas más externas de ésta, pero no es hasta llegar a la capa más alejada, la de las células fotorreceptoras, cuando inicia las reacciones de tipo bioquímico que comprenden el proceso de fototransducción visual(fig. 4). Cuando la rodopsina se encuentra en la oscuridad (*ground-state*, estado inactivo), su cromóforo es capaz de absorber un fotón de luz, siendo la velocidad y eficiencia cuántica para esta función excepcionales. El doble enlace *cis* del $C_{11} - C_{12}$

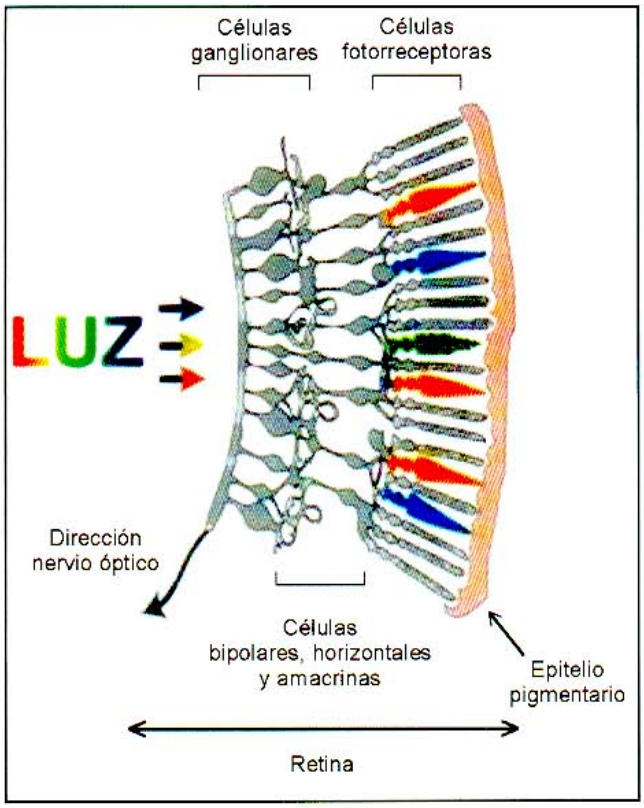

Fig. 4. Dirección de entrada de la luz en la retina. Las células fotorreceptoras (conos y bastones) se encuentran en la parte más alejada de la retina de esta entrada de luz.

del retinal es fotoisomerizado a su conformación *trans* con la consiguiente desprotonación del enlace de Base de Schiff (fig. 5A). Así, la rodopsina fotolizada cambia a su estado activo MetarrodopsinaII (MetaII) y ambos estados pueden distinguirse en el laboratorio ya que son espectralmente distintos (fig. 5B). Antes de llegar a la conformación de MetaII la rodopsina pasa a través de una serie de fotointermediarios (fig. 6) que sólo son estables a muy baja temperatura, y a temperatura ambiente el paso de rodopsina a MetaII es prácticamente instantáneo[13]. La rodopsina activada se acopla a la proteína-G heterotrimérica (transducina) con el consiguiente intercambio de GTP por GDP. Esto dispara una cascada de reacciones enzimáticas que producen la hiperpolarización de la membrana de las células fotorreceptoras, generando eventualmente un impulso nervioso que se transmite al cerebro.

El estudio de la interacción entre la rodopsina y la transducina en el proceso de activación es de vital importancia para comprender las bases moleculares de la visión. Para comprender las bases estructurales de este mecanismo de activación sería necesario disponer de la estructura cristalina del complejo MetaII-transducina. Esto de momento no ha podido conseguirse, debido a la gran dificultad de obtener cristales de la forma activada de la rodopsina, la conformación MetaII que se obtiene después de iluminar. Una alternativa en este caso sería obtener la estructura cristalina de una rodopsina mutada que sea constitutivamente activa, es decir que tenga una mutación que

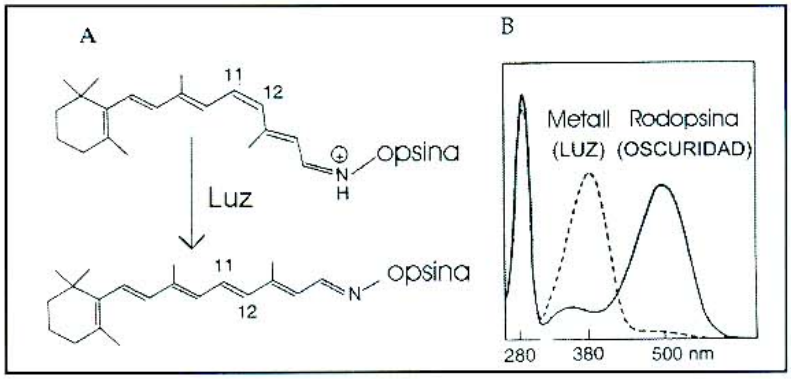

Fig. 5. A. Isomerización del retinal al absorber luz, y la consiguiente desprotonación de la base de Schiff. B. Espectros UV-visible de la conformación inactiva en la oscuridad y de la conformación activa MetaII después de la iluminación.

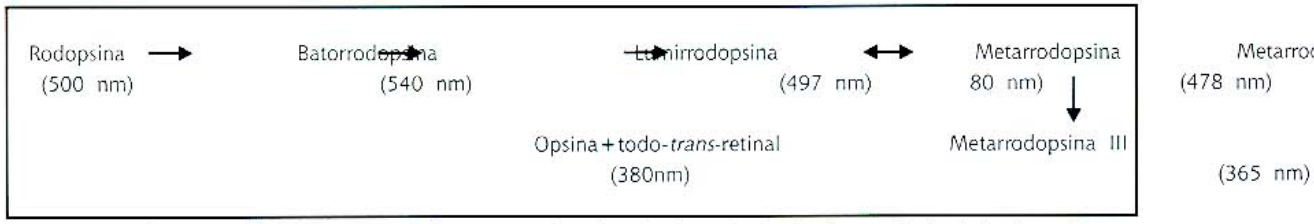

Fig.6. Distintos fotointermediarios a través de los que pasa la rodopsina después de absorber un fotón de luz hasta llegar a la forma activa MetarrodopsinaII y posteriormente pasar a opsina y todo-trans-retinal libres a través del intermediario MetarrodopsinaIII o bien directamente.

haga que sea activa en ausencia de luz y de retinal (aunque esto tampoco por el momento ha podido obtenerse). La transducina por su parte, en cambio, si ha podido ser cristalizada y se ha descrito el tanto en el estado activado como en el inactivado mediante cristalografía de rayos X[14,15]. La figura 7 muestra los modelos de la transducina, concretamente el de la subunidad α de esta proteína heterotrimérica con el nucleótidode gunaosina unido (GTP o GDP según sea su estado). La figura 7B muestra un detalle de la zona catalítica de la subunidad α de la transducina en el que puede observar mejor la unión del nucleótido.

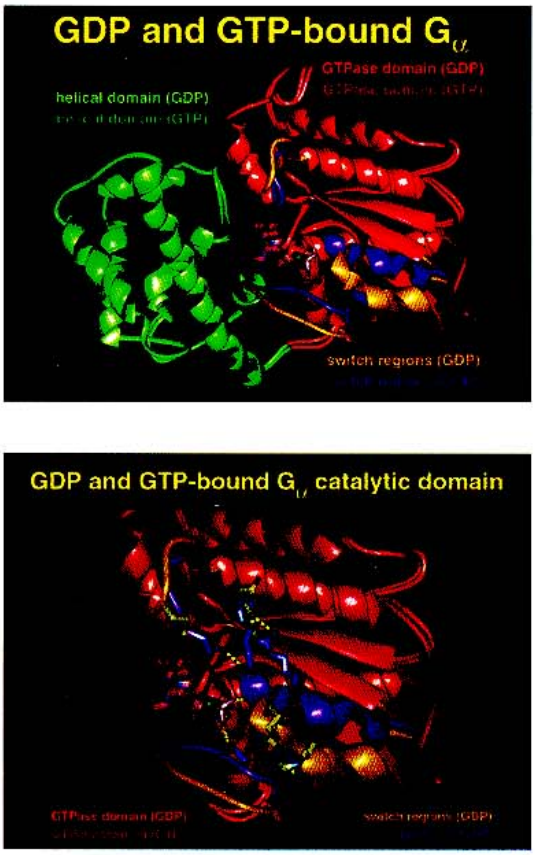

Fig. 7. Modelos de la estructura tridimensional de la subunidad α de la transducina, que es la que interacciona con la rodopsina. En la figura B se muestra un detalle del dominio catalítico de esta proteína donde se produce la hidrólisis del GTP a GDP a través de la actividad GTPásica intrínseca de esta proteína.

Tal y como se ha dicho anteriormente uno de los retos es conocer los detalles moleculares de la interacción entre la rodopsina y la transducina y diversos grupos de investigadores están trabajando para obtener más datos en este sentido. En cualquier caso se han propuesto diversos modelos de la interacción de ambas proteínas como el mostrado en la figura 8. En esta interacción el extremo C-terminal de la rodopsina debe producir un cambio conformacional, como resultado de la fotoactivación, con la finalidad de permitir la exposición de las zonas del dominio citoplasmático claves en esta interacción. En la actualidad se sabe que estas zonas son los bucles citoplasmáticos II y III así como la octava hélice en el dominio citoplasmático por lo que respecta a la rodopsina. En la transducina se ha visto que diversos residuos del extremo C-terminal de la subunidad α son críticos para esta interacción. Se postula una interacción de algunos de estos residuos con los aminoácidos Glu-134 y Arg-135 del extremo citoplasmático de la hélice II de la rodopsina. Asimismo cada vez parece mas evidente que el complejo de las subunidades β y γ juega un papel regulador de la interacción entre la subunidad α de la transducina y la rodopsina.

En estos modelos propuestos la subunidad alfa de la transducina, y en particular algunos de sus aminoácidos específicos como la Leu-349 y Cys-347[16,17] parecen jugar un importante papel en la interacción rodopsina-transducina.

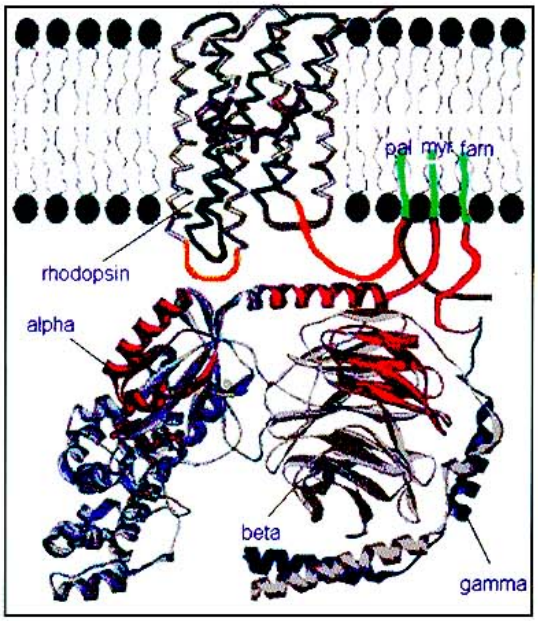

Fig. 8. Modelo de la interacción de la rodopsina y la transducina (compuesta por las tres subunidades α, β y γ). Notese que la subunidad implicada en el reconocimiento físico de la rodopsina es la subunidad α, particularmente su extremo C-terminal que se encuentra miristoilado. Otras modificaciones postranslacionales como la farnesilación o la palmitoilación en el extremo C-terminal de la rodopsina son importantes para facilitar la interacción de ambas proteínas al proporcionar el necesario anclaje a la bicapa lipídica.

Perspectivas en el estudio de los GPCR a partir del modelo de la rodopsina

La dificultad en la obtención de cristales de estos receptores de membrana ha hecho que no se conociera su estructura atómica y esto se ha traducido en que el avance en el diseño y obtención de ligandos específicos con actividad farmacológica sea lento. La reciente obtención de la primera estructura cristalina de un miembro de la superfamilia, en este caso de la proteína fotorreceptora de la retina rodopsina a 2.8 Å de resolución, ha abierto nuevas expectativas en los estudios de estructura-función en esta familia de receptores. El conocimiento de la estructura de la cavidad o bolsillo de unión del ligando, así como del mecanismo detallado del proceso de interacción con la proteína G, y su consiguiente activación en el proceso de transducción de señal, es de vital importancia para el desarrollo de moléculas con actividad farmacológica[18]. En particular este conocimiento es básico para poder entender el mecanismo molecular de las enfermedades degenerativas de la retina, y en particular de la retinosis pigmentaria.

Bibliografía

1. Hargrave PA. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:3-9.
2. Pepe IM. Prog Retin Eye Res 2001;20:733-759.
3. Menon ST, Han M, Sakmar TP. Phys Rev 2001;81:1659-1688.
4. Sakmar TP, Menon ST, Marin EP, Awad ES. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2002;31:443-484.
5. Wess J. FASEB J 1997;11:346-354.
6. Ji TH, Grossmann M, Ji I. J Biol Chem 1998;273:17299-17302.
7. Bockaert J, Pin JP. EMBO J 1999;18:1723-1729.
8. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Science 2000;289:739-745.
9. Teller DC, Okada T, Behnke CA, Palczewski K, Stenkamp RE. Biochemistry 2001;40:7761-7772.
10. Okada T, Fujiyoshi Y, Silow M, Navarro J, Landau EM, Shichida Y. Proc Natl Acad Sci (USA) 2002;99:5982-5987.
11. Ramon E, Gómez J, del Valle LJ, Urtubia C, Götzens G, Garriga P. (2002) Ver y Oír 2002;19(166):403-310.
12. Andres A, Kosoy A, Garriga P, Manyosa J. Eur J Biochem 2001;268: 5696-5704.
13. Okada T, Ernst OP, Palczewski K, Hofmann KP. Trends Biochem Sci 2001;26:318-324.
14. Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Nature 1996;379:369-374.
15. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. Nature 1996;379:311-319.
16. Arimoto R, Kisselev OG, Makara GM, Marshall GR. Biophys J 2001;81:3285-3293.
17. Aris L, Gilchrist A, Rens-Domiano S, Meyer C, Schatz PJ, Dratz EA, Hamm HE. J Biol Chem 2001;275:37679-37685.
18. Meng EC, Bourne HR. Trends Pharmacol Sci 2001;22:587-593.