



Transducina: La proteína G del proceso de excitación visual

José Bubis¹.

¹Biólogo Jbubis@usb.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El proceso visual comienza con la conversión de paquetes de energía electromagnética llamados fotones o cuantos de luz a una señal que puede ser analizada por el cerebro. Esta conversión es llevada a cabo por las células fotorreceptoras del ojo, un conjunto de células especializadas que se localizan en la retina. En el ojo de la mayoría de los vertebrados existen dos tipos de células fotorreceptoras; los bastoncillos y los conos. Como se ilustra en la figura 1, los bastoncillos son células cilíndricas y tienen mayor tamaño, mientras que las células cónicas más pequeñas, son los conos. Los bastoncillos median la visión en luz tenue formando imágenes en blanco y negro, y son tan sensibles que pierden la capacidad de transmitir señales en condiciones de luz diurna. Los conos, por su parte, operan efectivamente a niveles luminosos elevados y permiten la percepción del color.

EL PROCESO VISUAL Y SU CASCADA DE SEÑALIZACIÓN

El proceso visual comienza con la conversión de paquetes de energía electromagnética llamados fotones o cuantos de luz, a una señal que puede ser analizada por el cerebro. Esta conversión es llevada a cabo por las células fotorreceptoras del ojo, un conjunto de células especializadas que se localizan en la retina.

En el ojo de la mayoría de los vertebrados existen dos tipos de células fotorreceptoras: los bastoncillos y los conos. Como se ilustra en la figura 1, los bastoncillos son células cilíndricas y

tienen mayor tamaño, mientras que las células cónicas, más pequeñas, son los conos. Los bastoncillos median la visión en luz tenue formando imágenes en blanco y negro, y son tan sensibles que pierden la capacidad de transmitir señales en condiciones de luz diurna. Los conos, por su parte, operan eficientemente a niveles luminosos elevados y permiten la percepción del color.

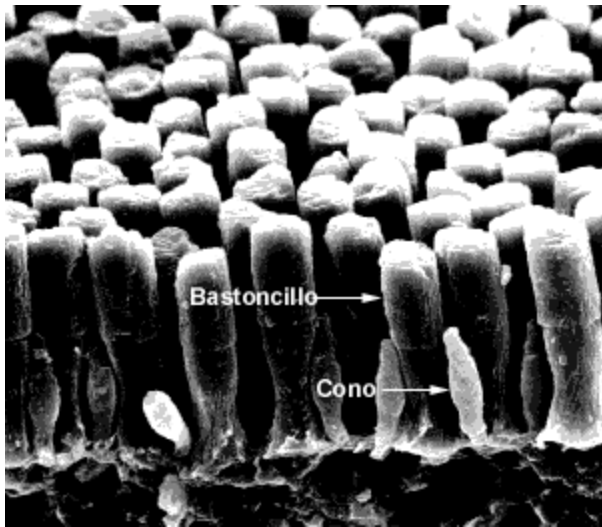


Figura 1. Las células fotorreceptoras del ojo. Los bastoncillos y los conos de la retina de una salamandra se muestran aumentados en una fotografía tomada mediante el uso de un microscopio electrónico. Las células cilíndricas son los bastoncillos y las células cónicas, más pequeñas, son los conos. Tomado de Schnapf y Baylor (1987)

Los bastoncillos y los conos difieren tanto morfológicamente como en su función, pero mantienen ciertas semejanzas (Fig. 2). La parte superior de las células, el segmento externo, contiene los pigmentos que detectan y absorben la luz, así como toda la maquinaria molecular encargada de la transmisión de la señal y del inicio del impulso nervioso. La parte inferior, el segmento interno, contiene los organelos y el núcleo, y está especializado en la generación de la energía que requiere la célula para su funcionamiento, y en la renovación de las moléculas necesarias en el segmento externo. Además, el segmento interno incluye una terminación sináptica que provee la base para la comunicación con las otras células de la retina.



Figura 2. Los bastoncillos y los conos difieren tanto en forma como en función pero mantienen ciertas similitudes. La parte superior de las células, el segmento externo, contiene los pigmentos que absorben la luz; la parte inferior, el segmento interno, contiene los organelos y el núcleo. La terminación sináptica conecta las células fotorreceptoras a otras células de la retina. Tomado de Schnapf y Baylor (1987).

Si una retina aislada es agitada ligeramente, los segmentos externos de las células fotorreceptoras se desprenden y la maquinaria de excitación visual puede ser estudiada en una forma altamente purificada. Debido a su mayor número, muchos estudios en el campo de la visión se han concentrado en los bastoncillos. Los segmentos externos de los bastoncillos son tubos angostos llenos de aproximadamente 2.000 discos apilados. Los estrechos discos contienen grandes cantidades de las proteínas que absorben la luz e inician la respuesta de excitación. La membrana externa, por otro lado, sirve para convertir la señal química en una señal eléctrica.

Embebido en la membrana lipídica de los discos de los segmentos externos de los bastoncillos se encuentra el pigmento visual denominado rodopsina, el cual representa el 80% del total de las proteínas celulares, y al menos el 95% de las proteínas de las membranas del segmento externo (Fig.3). La rodopsina contiene dos componentes, una porción proteica llamada opsina, y el cromóforo 11-*cis*-retinal, que es un derivado de la vitamina A. Ambos componentes se encuentran unidos covalentemente a través de una base de Schiff protonada entre el grupo ϵ -amino de la Lys296 de la opsina y el grupo aldehído del retinal.

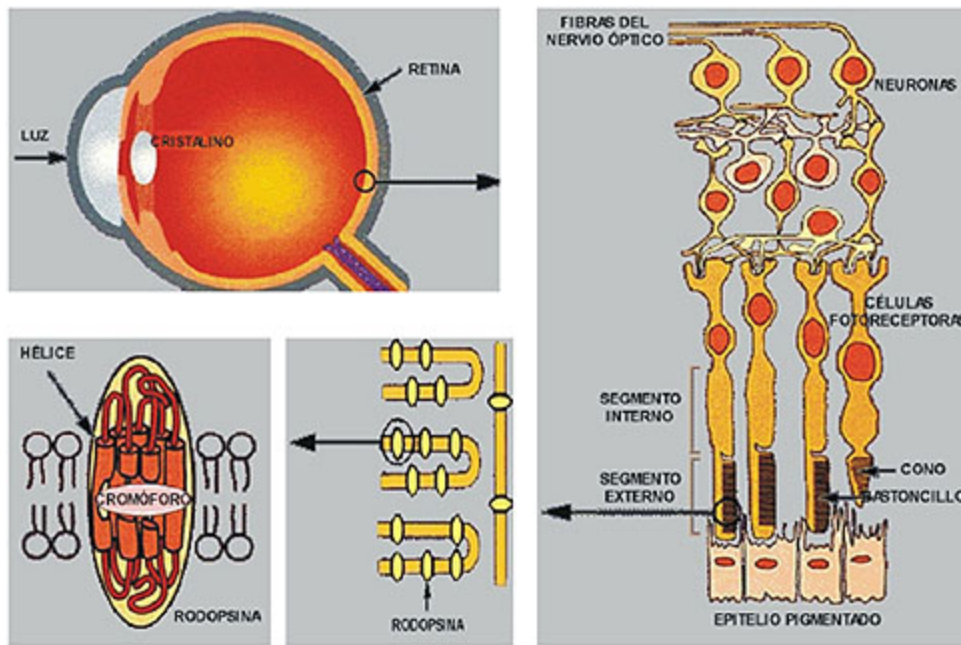


Figura 3. Esquema representativo de la ubicación de la rodopsina en la membrana de los segmentos externos de los bastoncillos de la retina. Tomado de Schertler (1998).

La elucidación de la secuencia de aminoácidos de la rodopsina condujo a la propuesta de un modelo topográfico, que se basa en la presencia de siete regiones de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos separados por regiones conectoras de residuos predominantemente hidrofílicos. La presencia de estas siete regiones sugirió que la rodopsina contiene siete hélices a que atraviesan la bicapa lipídica, e identificó a la rodopsina como uno de los miembros de la superfamilia de receptores tipo serpentina, que funcionan acoplados a proteínas enlazadoras de nucleótidos de guanina o proteínas G.

Las proteínas G son heterotrímeros compuestos de subunidades α , β y γ . Existen muchos productos génicos codificando para estas subunidades (hasta la fecha se han descubierto 20 α , 6 β y 12 γ); sin embargo, sólo cuatro clases principales de proteínas G han sido definidas: GS, GI/Go, Gq, y G12/G13. Las proteínas G juegan un papel regulador importante en un gran número de mecanismos de transmisión de señales, acoplando proteínas receptoras transmembranales de siete hélices (GPCRs), a proteínas efectoras específicas. Miles de receptores GPCRs se conocen, y muchos más están siendo descubiertos todo el tiempo. Estos receptores serpentina están involucrados en el reconocimiento de señales tan diversas como la luz, el Ca^{2+} , los olores, ciertas moléculas pequeñas que incluyen aminoácidos, nucleótidos y péptidos, y algunas proteínas; controlando así la actividad de enzimas, canales iónicos, y el transporte de vesículas, vía catálisis del intercambio de GDP por GTP sobre sus correspondientes proteínas G. Dentro del plan arquitectónico común de los GPCRs, los lazos intracelulares que conectan las hélices a transmembranales, constituyen el dominio de enlazamiento de las proteínas G. Aunque aún no ha sido determinada la estructura de alta resolución de ningún receptor acoplado a proteína G, las estructuras de difracción electrónica de baja resolución de las rodopsinas de bovino y de rana, publicadas en la década pasada, muestran la posición y orientación de estas siete hélices a en la rodopsina (Fig. 4). Experimentos bioquímicos y de mutagénesis, con una variedad de GPCRs, sugieren que la activación del receptor causa cambios en las orientaciones relativas de las hélices

transmembranales 3 y 6, como producto del enlazamiento de su ligando. Estos cambios afectan la conformación de los lazos intracelulares que interactúan con las correspondientes proteínas G, poniendo al descubierto los sitios de enlazamiento de dichas proteínas, previamente enmascarados.

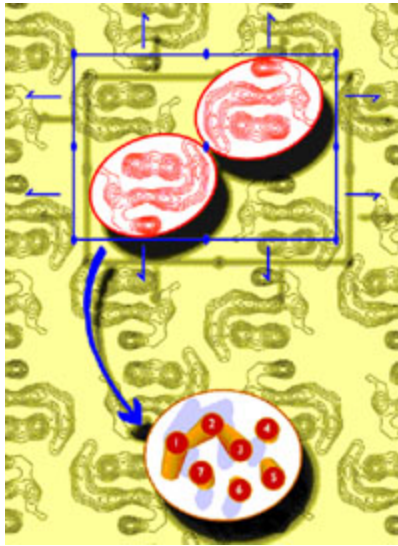


Figura 4. Densidades de proyección en dos dimensiones de la estructura de la rodopsina. Abajo se muestra esquemáticamente el arreglo tentativo de las siete hélices a transmembranales de la proteína. Tomado de Schertler (1998).

Volviendo al proceso de excitación visual, el primer evento en este mecanismo es la absorción de un fotón por el cromóforo 11-*cis*-retinal de la rodopsina, lo que produce su isomerización a la forma todo-*trans*. Este evento ocurre mediante una serie de transformaciones fotoquímicas de la rodopsina que conllevan a la aparición de diversos fotointermediarios, los cuales poseen absorción óptica máxima característica. Finalmente, el último fotointermediario es hidrolizado a opsina y todo-*trans* retinal. La cascada visual está mediada por la metarodopsina II que es el fotointermediario responsable de transmitir la señal luminosa a las otras proteínas de la ruta de señalización visual, y es por ello que es considerada la rodopsina fotoexcitada o fotoactivada (R^*).

El siguiente paso en la excitación visual es la activación de la transducina por R^* . La transducina es una proteína periférica de la membrana que pertenece a la familia de las proteínas G heterotriméricas, y como tal posee tres cadenas polipeptídicas conocidas como las subunidades α (T_α), β (T_β), y γ (T_γ). Por sus características estructurales ha sido clasificada como una proteína G tipo G_i/G_o. A oscuras, la transducina se encuentra en su forma inactiva, enlazada a GDP. Por efectos de la luz, R^* interacciona fuertemente con la transducina ligada a GDP. R^* promueve el intercambio de GDP por GTP sobre la unidad T_α , formándose primero un intermediario en el cual R^* está unido a la transducina con su bolsillo de enlazamiento de nucleótidos vacío, y luego un complejo de la R^* con la transducina ligada a GTP. T_α -GTP constituye la forma activada de la transducina (T_α^*). T_α^* -GTP disminuye su afinidad tanto por T_β y T_γ , como por R^* , y estos cambios en afinidades son críticos para el proceso de excitación. La liberación de la rodopsina fotoestimulada de su complejo con la transducina permite que R^* actúe catalíticamente e interaccione con otras transducinas, activándolas. Cerca de 500 moléculas de T_α^* -GTP pueden

ser formadas por acción de una simple molécula de R^* . La activación de la transducina es la primera etapa de amplificación en este proceso (Fig. 5).

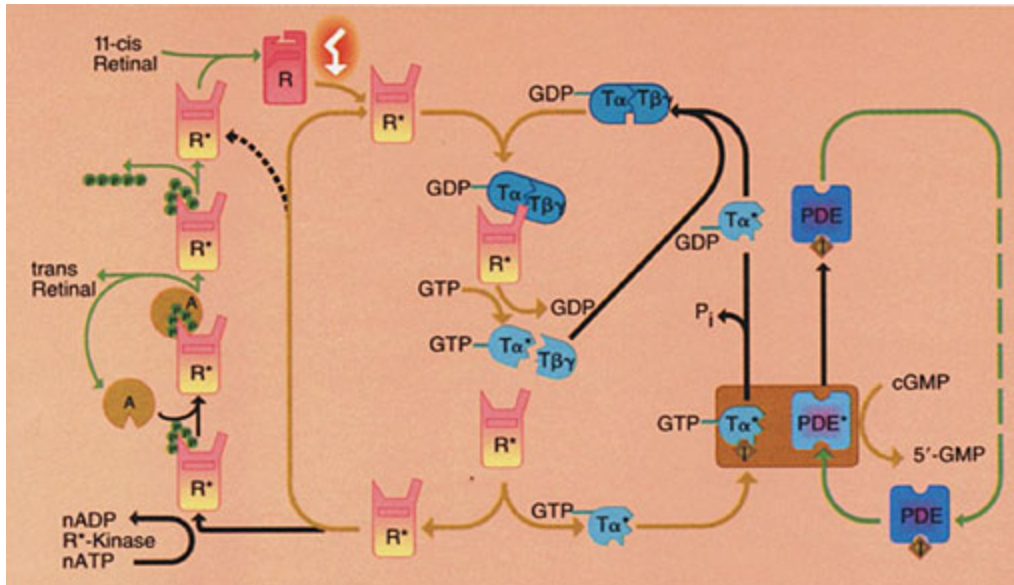


Figura 5. Resumen diagramático de la cascada enzimática de excitación visual.

Se muestran los principales ciclos bioquímicos involucrados en el proceso de fototransducción. R = rodopsina, T = transducina, PDE = fosfodiesterasa de GMP cíclico, I = subunidades inhibitorias de la PDE, R^* -kinase = rodopsina quinasa, A = arrestina, y P = fosfato inorgánico. Los asteriscos ilustran los estados activados de las proteínas. Tomado de Hargrave (1993).

La disociación de la transducina en sus subunidades permite a $T\alpha^*$ -GTP transportar la señal de excitación a la siguiente enzima en la cascada, la fosfodiesterasa de GMP cíclico (PDE). $T\alpha^*$ -GTP activa a la PDE, al liberarla de la inhibición impuesta por sus subunidades g o I reguladoras (Fig. 5). La PDE activada (PDE^*) cataliza la hidrólisis de GMP cíclico (cGMP) a 5'-GMP. Miles de moléculas de cGMP pueden ser hidrolizadas rápidamente a partir de una molécula de PDE^* , y en consecuencia, este evento se considera el segundo paso de amplificación de la cascada visual.

¿Cuál es el efecto de la hidrólisis de cGMP por la PDE^* ? En la oscuridad, la concentración total de cGMP es alta. Bajo estas condiciones, el cGMP mantiene abiertos los canales catiónicos presentes en la membrana plasmática de los bastoncillos, permitiendo la "corriente oscura" producto del transporte de iones de Na^+ y Ca^{2+} que despolarizan la célula. La hidrólisis de cGMP por efecto de la fotoactivación de la PDE causa el cierre de los canales, reduciendo así la corriente circulante. Es por ello que la membrana plasmática sufre una hiperpolarización en respuesta a una señal luminosa. Estos cambios de voltaje son comunicados a las células contiguas, localizadas en la retina, por transmisión química a través de las terminaciones sinápticas de las células fotorreceptoras.

Hay varios eventos que regulan esta cascada. Por un lado, la actividad GTPasa inherente a $T\alpha^*$ convierte a $T\alpha^*$ -GTP en $T\alpha^*$ -GDP, lo que produce la desactivación de la PDE^* , y promueve la reconstitución de la forma holoenzimática de la transducina para que el ciclo se repita. Proteínas tales como la RGS 9 (o proteína reguladora 9 de la señalización de las proteínas G), así como la

subunidad inhibitoria α o β de la PDE, actúan como proteínas GAPs que funcionan estimulando dicha actividad GTPasa. Sin embargo, el ciclo regenerador de la transducina puede ser interrumpido por la acción de una fosfoproteína llamada fosducina. La fosducina, en su estado desfosforilado, es capaz de enlazarse selectivamente a β y formar un complejo muy estable. Al bloquear el enlazamiento de α a β , y evitar la reconstitución de la transducina heterotrimérica, la fosducina permite que α -GTP actúe por mayor tiempo, y no sea reciclada tan rápidamente. Este evento está controlado por procesos de fosforilación y desfosforilación mediados por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y una proteína fosfatasa aún no determinada. La hidrólisis del GTP enlazado a α es necesaria pero no suficiente para restituir el sistema a su estado de oscuridad. El decaimiento espontáneo de R^* , correlacionado con la liberación del cromóforo, es muy lento. Como también se muestra en la figura 5, existe un proceso más rápido de inactivación, el cual es dependiente de ATP. Este proceso se basa en la fosforilación de R^* por una proteína quinasa específica, la rodopsina quinasa (R^* -Kinase), seguida por el enlazamiento de una proteína soluble, la arrestina (A), la cual reconoce a la R^* fosforilada en una serie de residuos de Ser y Thr presentes en su extremo COOH-terminal. La arrestina detiene la acción de R^* al bloquear competitivamente el enlazamiento de la transducina a la rodopsina fotoactivada. El estado oscuro de la rodopsina ligada a 11-*cis*-retinal es regenerado por una serie de reacciones que involucran la hidrólisis de la unión tipo base de Schiff, la disociación del todo-*trans* retinal, la disociación de la arrestina, la desfosforilación de la rodopsina fosforilada por una proteína fosfatasa tipo 2A específica de los bastoncillos, y finalmente el re-enlazamiento del 11-*cis*-retinal.

El Ca^{2+} también ejerce efectos muy importantes en la cascada de señalización visual. Los niveles citosólicos de calcio disminuyen en presencia de luz, no solamente porque cesa su entrada a través de los canales sensibles a cGMP, sino también porque su eflujo se mantiene constante a través de una proteína intercambiadora de Na^+/Ca^{2+} localizada en la membrana plasmática de los bastoncillos. Cuando la concentración de calcio disminuye por debajo de 10 nM, se estimula una proteína guanilato ciclase, localizada también en la membrana, la cual sintetiza cGMP a partir de GTP. Esto conlleva a la recuperación de los niveles de cGMP presentes en el estado de oscuridad. Además, existen otras proteínas moduladoras de la cascada de excitación, las cuales funcionan de una manera dependiente de la concentración de calcio. Por un lado la calmodulina regula directamente los canales catiónicos de compuerta dependientes de cGMP. Otra proteína llamada recoverina, regula la acción de la rodopsina quinasa de una manera dosis-dependiente de calcio. Finalmente, también existen varias proteínas activadoras de la guanilato ciclase, llamadas proteínas GCAPs, las cuales modulan la acción de esta enzima de una forma dependiente de la concentración del ion divalente.

ESTRUCTURA DE LA TRANSDUCINA

Un mejor entendimiento de los cambios conformacionales inducidos por GTP, así como de los mecanismos catalíticos de la actividad GTPasa de las subunidades α y β de las proteínas G, ha sido obtenido de las estructuras tridimensionales publicadas durante la última década. Las estructuras cristalinas de un fragmento de 325 aminoácidos de α ligado a GTP γ S, GDP, o GDP-ALF 4^- han sido reportadas. Estas estructuras mostraron que α se encuentra conformada por dos dominios, un dominio GTPasa (o dominio G), involucrado en el enlazamiento e hidrólisis del GTP,

y que es estructuralmente idéntico al de las proteínas RAS, al de otras GTPasas pequeñas y al de los factores de elongación; y un dominio α -helicoidal que es único para las proteínas G heterotriméricas (Fig. 6). El nucleótido de guanina se enlaza fuertemente en una hendidura localizada entre estos dos dominios. El plegamiento de estas tres estructuras cristalinas demostró cambios dependientes del nucleótido que distinguen la forma inactiva, el estado de transición, y la forma activa de la proteína. Lo interesante es que estos cambios no son globales, sino que se encuentran restringidos a tres regiones adyacentes localizadas en una de las caras de la proteína, las cuales corresponden solamente al 14 % de los aminoácidos. Estas regiones fueron denominadas regiones interruptoras o "switches" I, II, y III.

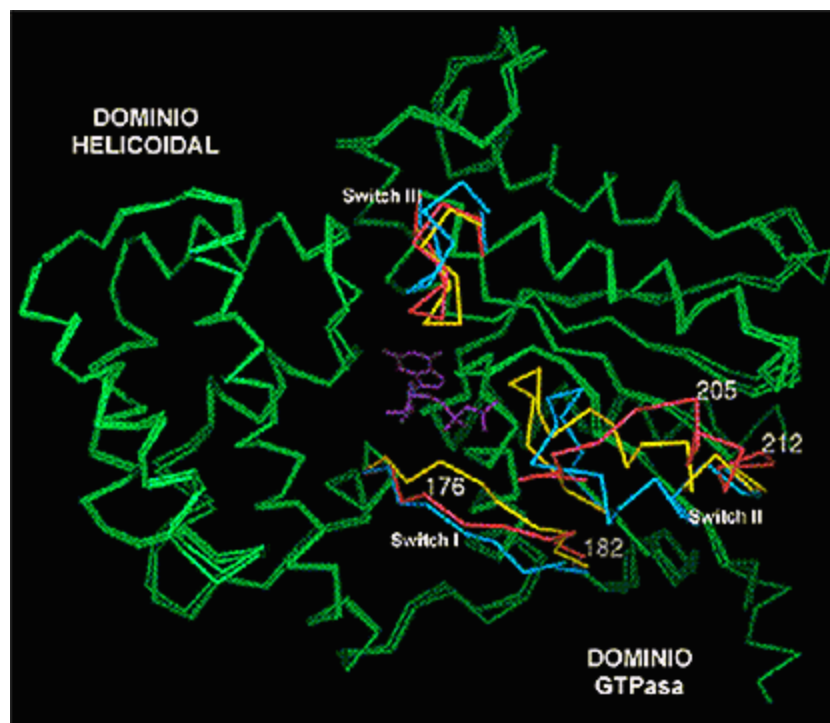


Figura 6. Diferencias estructurales entre la forma inactiva, la forma activa, y el estado de transición de Ta. Ta está compuesta de dos dominios, el dominio GTPasa y el dominio α -helicoidal. El nucleótido (púrpura) calza en un bolsillo de enlazamiento que se localiza entre estos dos dominios. La figura representa la superposición de las estructuras cristalinas de Ta-GDP, Ta-GTPgS, y Ta-GDP-AlF₄⁻ (Noel *et al.*, 1993; Lambright *et al.*, 1994; y Sondek *et al.*, 1994), empleando el modelo de bolas y varillas, el cual únicamente muestra los carbonos α del esqueleto polipeptídico. Las principales diferencias entre las estructuras de Ta-GDP (azul), Ta-GTPgS (amarillo), y Ta-GDP-AlF₄⁻ (rojo carmesí) están localizadas en las regiones interruptoras o switches I, II, y III. El resto de la cadena de Ta (verde) casi no diverge entre las tres formas. Tomado de Hamm (1997).

Más recientemente, en 1996, la estructura cristalina de rayos X del complejo Tb g también fue reportada. Tb tiene una estructura enriquecida en hebras β que se pliega en forma de hélice propulsora de siete miembros, como consecuencia de sus siete repeticiones WD-40. Tg muestra un plegamiento extendido, con extensivas interacciones con Tb por intermedio de contactos que ocurren en toda la base de Tb, así como también a través de una estructura tipo espiral enrollado que ocurre en las regiones N-terminales de ambas subunidades (Fig. 7).

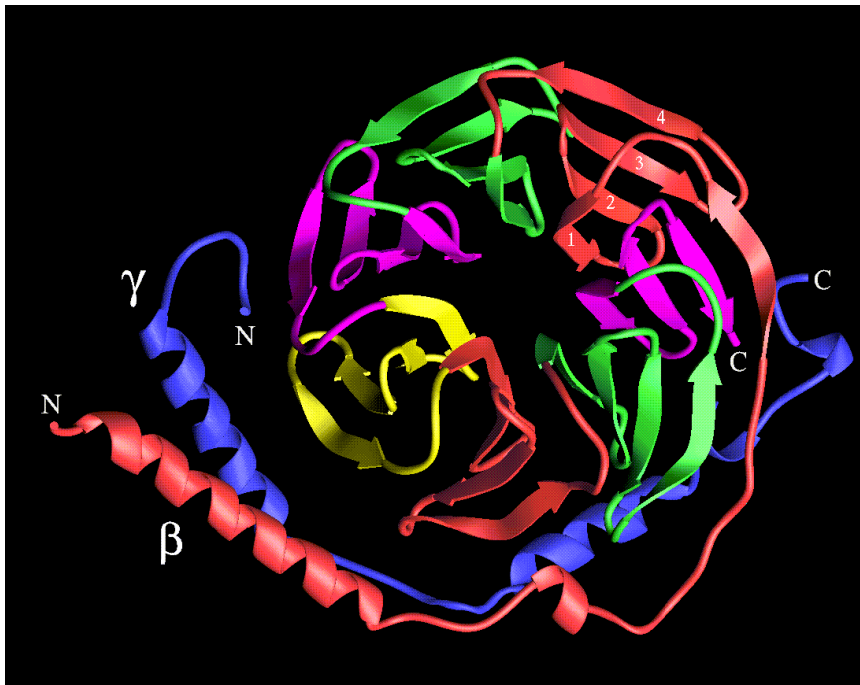


Figura 7. Representación, mediante cintas, de la estructura cristalina del complejo Tbg. Se muestra una visión desde el túnel central, ilustrándose con diversos colores las siete hojas constituyentes de la hélice propulsora b de Tb (Sondek *et al.*, 1996). Tg. está coloreada de azul. Tomado de Hamm (1997).

En ese mismo año se publicó la estructura cristalográfica de la transducina heterotrimérica (Fig. 8), y una comparación de las estructuras de Ta y Tb g libres con la de la holoenzima, estableció las interacciones entre las subunidades, los cambios conformacionales que ocurren en cada subunidad para formar la interfase heterotrimérica, y reveló el mecanismo de liberación y activación inducido por GTP. Además, las estructuras tridimensionales revelaron que tanto la región N-terminal de Ta como la región C-terminal de Tg, las cuales poseen lípidos enlazados post-traduccionamente, están muy cercanas espacialmente en el heterotrímero, localizándose sobre una cara común de la proteína. Esto sugiere que esta cara está orientada hacia la superficie de la membrana, y que dichos lípidos funcionan como sitios de unión de la transducina a la membrana.

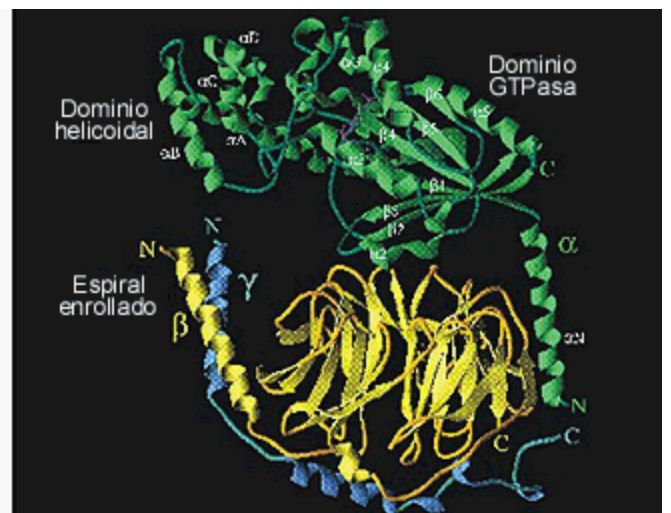
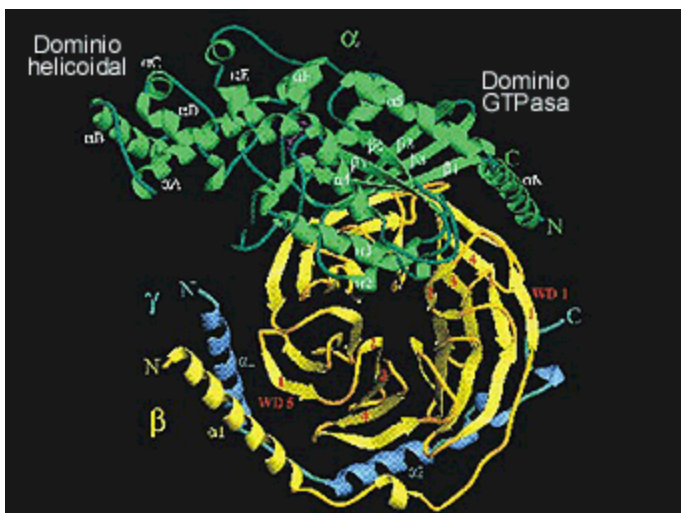


Figura 8. Estructura del complejo heterotrimérico de la transducina. Estructura cristalina de la transducina con Ta mostrada en verde, Tb en amarillo, Tg en azul, y el GDP en púrpura (Lambright *et al.*, 1996.. Panel izquierdo: Representación, mediante cintas, del heterotrímero visto desde el eje de la hélice propulsora b de Tb γ . Panel derecho: Representación, mediante cintas, del heterotrímero rotado 70° alrededor del eje horizontal, en referencia a la vista del panel izquierdo. Tomado de Hamm (1997).

Aunque una gran cantidad de información ha sido determinada a partir de estas estructuras cristalinas, siempre se hace necesario obtener evidencias químicas directas y consistentes para así fortalecer los resultados estructurales encontrados por cristalografía. En nuestro laboratorio hemos empleado herramientas de química de proteínas, para identificar residuos en la transducina que son funcionalmente importantes.

SITIOS DE INTERACCIÓN EN EL COMPLEJO TB γ

La formación de entrecruzamientos covalentes inter o intramoleculares entre residuos de aminoácidos específicos en proteínas es una herramienta muy valiosa en el área de la química de proteínas. Su uso principal ha sido en el estudio de interacciones proteína-proteína. Por un lado se puede inducir entrecruzamientos de longitud cero, en los cuales las cadenas polipeptídicas se unen por grupos funcionales que ya existen en las proteínas, y por lo tanto no requieren del empleo de grupos espaciadores. En este caso, el agente entrecruzador sirve como catalizador de la mencionada reacción. Sin embargo, también existe una gran variedad de reactivos bifuncionales. En estos compuestos, los dos grupos reactivos están separados por una cadena espaciadora que posee una longitud fija específica, la cual permite determinar la distancia a la que se encuentran los dos residuos que están siendo entrecruzados. Experimentos con reactivos entrecruzadores han ayudado a definir más claramente los residuos que están interactuando entre las subunidades b y γ de la transducina.

Al incubar transducina o el complejo Tb γ con fenantrolina cúprica (CuPh), un reactivo que cataliza la formación de enlaces bisulfuros entre grupos sulfhídricos convenientemente situados, se observó la formación de una nueva banda polipeptídica de 43 kDa. La banda solamente se formó bajo condiciones no reductoras, y no fue observada cuando la muestra fue electroforizada en presencia de b -mercaptoetanol. Además, la formación de la especie de 43 kDa se evitó cuando las mezclas de incubación fueron tratadas con N-etilmaleimida y EDTA previo a la adición de CuPh. La banda de 43 kDa apareció de forma proporcional con la desaparición de la subunidad b, y estudios cinéticos mostraron su completa formación en aproximadamente 30-45 min. Además, el análisis por electroforesis bidimensional (no reductora-reductora) mostró la presencia de Tb y Tg en la banda de 43 kDa. Estos resultados muestran que la formación de la especie de 43 kDa involucra enlaces bisulfuros entre las subunidades b y γ de la transducina.

A fin de identificar los residuos de aminoácidos participantes en el enlace bisulfuro, una muestra de transducina fue incubada con CuPh en escala preparativa, terminándose la reacción con la adición de N-etilmaleimida y EDTA. Como control, una muestra de transducina fue incubada con N-etilmaleimida y EDTA previo a la incubación con CuPh. Posteriormente, ambas muestras fueron reducidas con ditiotreitól como agente reductor, desnaturalizadas, tratadas con [3 H] ácido iodoacético (IAA), digeridas con tripsina, y los productos resultantes separados por cromatografía

líquida de alta resolución (HPLC). Dos picos radioactivos aparecieron en los perfiles cromatográficos de la muestra tratada con CuPh, los cuales estaban ausentes en la muestra control. Estos picos fueron recromatografiados a fin de limpiarlos a homogeneidad y fueron sujetos a secuenciación de fase gaseosa. Los residuos involucrados en el enlace bisulfuro inducido por CuPh fueron identificados como Cys25 en Tb y Cys36 y/o Cys37 en Tg . Estos experimentos nos llevaron a concluir que estas cisteínas constituyen un punto de contacto entre las subunidades b y g de la transducina tanto en el heterotrímero como en el complejo Tb g .

Tomando como base la estructura cristalina reportada tanto para Tb g , como para la transducina, las distancias entre los carbonos α de la Cys25 de Tb y la Cys36 de Tg , o de la Cys25 de Tb y la Cys37 de Tg son 10.19 Å y 11.78 Å, respectivamente. Estas distancias sugieren que dichos residuos están localizados convenientemente para sufrir el entrecruzamiento observado por efecto del tratamiento con CuPh. La figura 9 ilustra como el puente bisulfuro inducido por CuPh es consistente con dicha estructura cristalina, y demuestra que estas cisteínas tienen la orientación apropiada y están próximas entre sí, lo que conlleva a la formación del mencionado enlace bisulfuro.

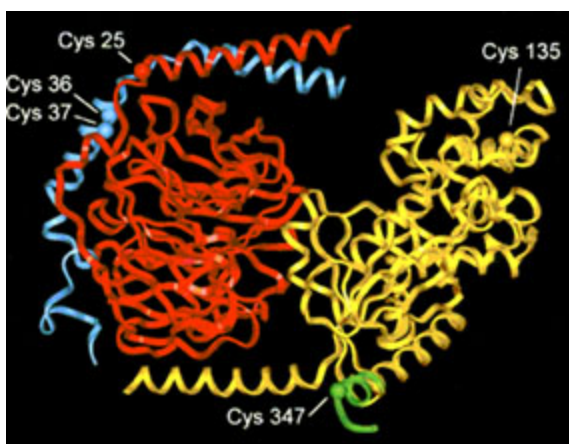


Figura 9. Modelo construido al anclar la conformación por RMN del undecapéptido C-terminal de Ta a la estructura de rayos X de la transducina. La figura muestra la conformación enlazada a R^* del péptido C-terminal de Ta resuelto por RMN (verde) (Kisselev *et al.*, 1999), anclado a la estructura cristalina de la transducina, enlazada a GDP, resuelta por difracción de rayos X (Lambright *et al.*, 1996), con Ta en amarillo, Tb en rojo, y Tg en azul. La localización hipotética de la membrana, que representa la superficie del heterotrímero que interactúa con R^* , puede observarse abajo (línea blanca). En la figura se identifica la localización de los residuos de cisteínas modificados por IAA, así como los sitios involucrados en el entrecruzamiento inducido por CuPh.

MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS CISTEÍNAS DE LA TRANSDUCINA

El marcaje químico de aminoácidos es una aproximación muy útil para realizar estudios de la relación entre la estructura y la función en proteínas. Aunque varios tipos de residuos pueden ser derivatizados químicamente, los residuos de cisteína se distinguen por su alta y específica reactividad.

El papel de los grupos sulfhídricos de la transducina fue examinado por modificación química con cinco diferentes reactivos: 4-vinilo piridina (VP); ácido 4-acetamido-4'-maleimidiló-estilbeno-2,2'-disulfónico (AMDA); 2,5-dimetoxiestilbeno-4'-maleimida (DM); ácido 2-nitro 5-tiocianobenzoico (NTCBA), y IAA, los cuales poseen diferentes tamaños y propiedades iónicas. AMDA, NTCBA, y IAA son compuestos hidrofílicos, mientras que DM y VP son hidrofóbicos. Además, AMDA y DM son más voluminosos que VP, IAA, y NTCBA.

La incubación de transducina con estos compuestos conllevó a una inactivación casi inmediata de la actividad enlazadora de nucleótidos de guanina de la transducina. En todos los casos, agentes reductores como β -mercaptoetanol o ditiotretol, protegieron de forma dosis-dependiente a la transducina ante la modificación, demostrándose así la especificidad de la reacción. Además, cuando la rodopsina fue incubada con estos reactivos, no se observó ningún efecto sobre su capacidad de catalizar el intercambio de nucleótidos de la transducina por efecto de la luz, comprobándose que el efecto observado estaba produciéndose sobre la transducina y no sobre la rodopsina.

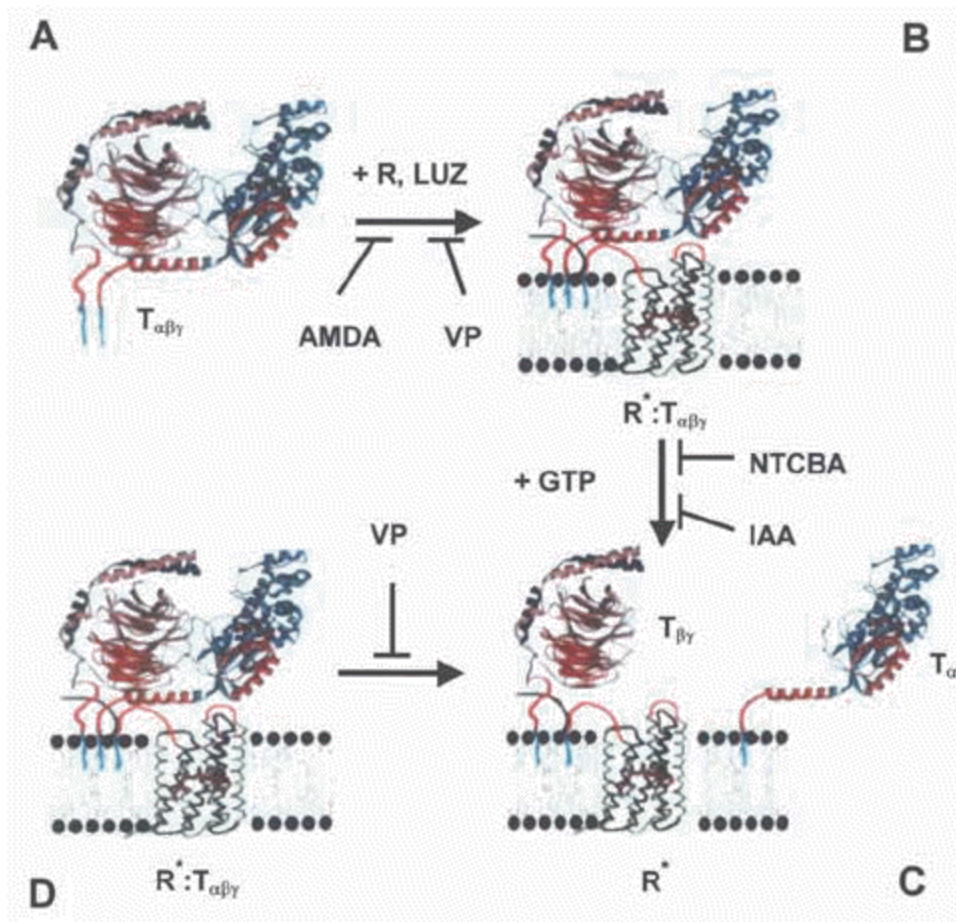


Figura 10. Efectos de los reactivos modificadores de grupos sulfhídricos sobre las actividades enlazadoras de rodopsina y nucleótidos de guanina de la transducina. La figura resume los puntos específicos donde AMDA, VP, NTCBA y IAA afectan las interacciones funcionales de la transducina. Panel A: Estructura de la transducina (Tabg) enlazada a GDP (Lambright et al., 1996). Panel B: Interacciones de la transducina con la rodopsina fotoactivada (R*) y con la bicapa lipídica de la membrana (Hamm, 1998). La posición y orientación de las siete hélices α de la rodopsina se basa en su estructura de difracción electrónica de baja resolución (Unger et al., 1997; Baldwin et al., 1997). Los grupos acilos sobre rodopsina, Ta y Tg se muestran interactuando con la

membrana. La modificación de transducina con AMDA, o con VP, inhibe específicamente su interacción con R^* . Panel C: R^* cataliza el intercambio de GDP por GTP sobre Ta, lo que causa la disociación de Ta-GTP del complejo Tbg. La transducina tratada con NTCBA, o con IAA, puede enlazarse físicamente a R^* . Sin embargo, la reacción de intercambio de nucleótidos es abolida, y la proteína modificada permanece asociada a R^* aún en presencia de GTP. VP inactivó el enlazamiento de nucleótidos de guanina, y la subsecuente disociación de la transducina, aún cuando el complejo entre R^* y la transducina ($R^*:\text{Tabg}$) fue formado previo a la reacción de modificación (Panel D @ C). Por el contrario, R^* fue capaz de proteger contra la inactivación de la transducina, cuando AMDA, NTCBA, o IAA fueron utilizados en complejos $R^*:\text{Tabg}$ preformados.

Como se muestra en la figura 10, con el uso de reactivos modificadores de grupos sulfhídricos, hemos podido fijar varias formas conformacionales de la transducina que ocurren en diferentes etapas de su ciclo de activación, suministrando así condiciones para estudiar dos de los pasos iniciales del proceso visual: el enlazamiento de la transducina a la rodopsina, dependiente de la luz, y la reacción de intercambio de nucleótidos de guanina de la transducina. Brevemente, experimentos de sedimentación seguidos por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y Western blots mostraron que:

1. La modificación de transducina con AMDA, o con VP, abolió el enlazamiento de la transducina a la rodopsina fotoexcitada.
2. El marcaje de transducina con NTCBA, o con IAA, permitió esta interacción, pero afectó la actividad enlazadora de nucleótidos de guanina de la proteína, dependiente de la luz.
3. El tratamiento de la transducina con DM produjo la precipitación de la proteína, probablemente por efecto de la alta hidrofobicidad del reactivo.

Ensayos similares de modificación de complejos transducina: R^* mostraron que la actividad enlazadora de nucleótidos de guanina se mantuvo bajo los tratamientos con AMDA, NTCBA, y IAA, pero no así bajo los tratamientos con VP o DM. Esto sugirió que la rodopsina fotoactivada fue capaz de proteger contra la inhibición producida por AMDA, NTCBA, y IAA sobre la función de la transducina, pero no en contra de la inactivación causada por VP o DM.

Separaciones por HPLC de las digestiones tríplicas de transducina modificada con AMDA mostraron un péptido principal marcado con dicho reactivo. En contraste, VP modificó al menos cuatro diferentes péptidos en transducina. Dado que el marcaje diferencial de los grupos tioles de la transducina altera las actividades enlazadoras de rodopsina y nucleótidos de guanina de dicha proteína, estos resultados sugieren la existencia de diferentes cisteínas funcionales sobre la transducina que están localizadas próximas al sitio de interacción con la proteína fotorreceptora, cerca del sitio de enlazamiento del nucleótido de guanina, o en regiones involucradas en los cambios conformacionales que ocurren durante la activación de la transducina.

La modificación de transducina con IAA fue estudiada más a fondo empleando [^3H] IAA. La estequiometría de la alquilación fue determinada por filtración a través de papeles de nitrocelulosa, obteniéndose un valor de alrededor de 1 mol de IAA incorporado por mol de holoenzima. A fin de identificar la cisteína modificada, la transducina fue incubada con [^3H] IAA en una escala preparativa, y fue luego digerida con tripsina. Cuando los péptidos resultantes se

resolvieron por HPLC, se identificó un pico principal marcado radiactivamente. Este péptido fue sujeto a secuenciación de fase gaseosa y correspondió a los residuos 342-350 de la subunidad α de la transducina, o sea, al péptido tríptico COOH-terminal de α . La radioactividad fue liberada en el ciclo 6 de la secuenciación, lo que identificó al residuo derivatizado con IAA como la Cys347 de α . Tomando como base los resultados de protección por R^* previamente obtenidos, la Cys347 de α debe entonces estar localizada en la proximidad del sitio de contacto entre la transducina y la rodopsina. En coincidencia con los resultados obtenidos, un número considerable de evidencias de otros laboratorios ha implicado al COOH-terminal de α , que es la región en la cual está localizada esta cisteína, con la interacción de la transducina con la rodopsina. Sin embargo, otras regiones más allá de la cola C-terminal de α también están involucradas, y β g también parece interactuar físicamente con la rodopsina.

La subunidad α aislada, en estado nativo, también fue tratada con [3H] IAA en una escala preparativa. Cuando la subunidad marcada con IAA fue digerida con tripsina y separada cromatográficamente por HPLC, dos picos radioactivos principales fueron obtenidos. Uno de los picos correspondió al péptido tríptico COOH-terminal de α , identificando a la Cys347 como una de las cisteínas derivatizadas por IAA en α . El segundo péptido tríptico correspondió a los residuos 129-138, identificando a la Cys135 en el ciclo 7 de secuenciación, como el otro sitio modificado por IAA en α . Claramente, el ambiente alrededor del residuo 135 debe estar ligeramente alterado en α , al compararse con transducina, ya que esta cisteína no es alquilada en el heterotrímero. Posiblemente el dímero β g previene estéricamente la derivatización de la Cys135 en la transducina nativa.

Como se mencionó arriba, muestras de transducina modificadas con IAA, o NTCBA, fueron capaces de interactuar fuertemente con la rodopsina fotoexcitada. Sin embargo, esta asociación no se rompió en presencia de GTP. Esto podría ser explicado de dos posibles maneras: 1) que el GDP no pueda salir del bolsillo de enlazamiento del nucleótido de guanina, o 2) que el GTP no pueda entrar a dicho bolsillo durante la reacción de intercambio del nucleótido. A fin de conseguir la explicación a nuestras observaciones experimentales, se llevaron a cabo ensayos para medir la liberación de GDP a partir de transducina previamente cargada con [α - ^{32}P] GDP. Aunque la transducina modificada con IAA falló en la toma del nucleótido de guanina trifosfatado, la transducina carboximetilada fue capaz de liberar GDP cuando se incubó con rodopsina fotoexcitada (Fig. 11). Por ello, usando transducina marcada con IAA, hemos sido capaces de estabilizar un complejo intermediario entre la transducina y la rodopsina que debe tener la conformación de la transducina con el bolsillo del nucleótido vacío. En contraste, la liberación de GDP de la transducina modificada con NTCBA fue completamente nula, lo que insinúa que la transducina modificada con NTCBA pareciera estar estructuralmente bloqueada en su estado inactivo, enlazado a GDP, aún en presencia de rodopsina fotoexcitada (Fig. 11). Con el uso de estos reactivos, hemos podido entonces estabilizar dos formas conformacionales de la transducina que ocurren en diferentes etapas de su ciclo de activación, y que están directamente involucradas en la reacción de intercambio de nucleótidos de guanina de la transducina.

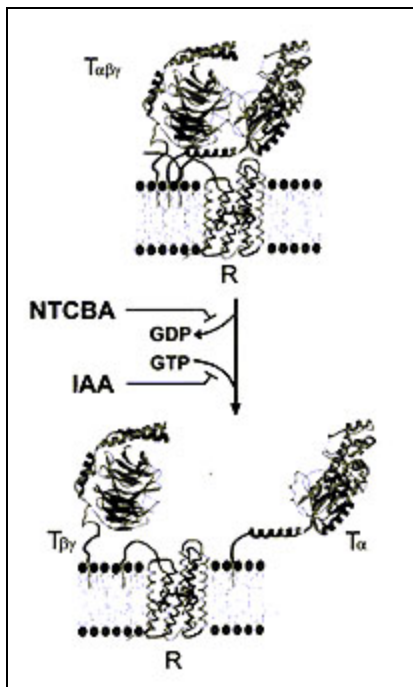


Figura 11. Efecto de la modificación de transducina con NTCBA, o con IAA, sobre su interacción con los nucleótidos de guanina. Aunque la transducina modificada con NTCBA, o con IAA, puede interaccionar con la rodopsina en presencia de luz, su capacidad de enlazar nucleótidos de guanina trifosfatados está completamente inhibida. Como se ilustra en la figura, la proteína modificada con NTCBA es incapaz de liberar GDP de su bolsillo de enlazamiento de nucleótidos. Por el contrario, la transducina carboximetilada con IAA puede liberar GDP de dicho bolsillo, pero no es capaz de tomar GTP de vuelta.

Las estructuras de rayos X de las diferentes formas de Ta no muestran el plegamiento de la región C-terminal, donde la Cys347 está localizada, debido a que esta región está desordenada y no está visible en las estructuras resueltas. Sin embargo, la estructura tridimensional del undecapéptido C-terminal de Ta fue determinada por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), mientras el mismo estaba enlazado a la rodopsina iluminada. Al superponer la estructura de RMN de este péptido con la estructura cristalina de rayos X de Ta b g enlazada a GDP, a través de cuatro residuos compartidos en ambas estructuras (residuos 340-343), se construyó el modelo que se muestra en la figura 9. En dicha figura puede notarse la localización de la Cys347 (verde), que es el residuo modificado por IAA tanto en la holoenzima como en la subunidad a aislada, y de la Cys135 (amarillo), el otro residuo modificado por IAA en Ta . La figura también muestra la obvia orientación y proximidad de la Cys347 hacia la localización hipotética de la membrana (línea blanca), indicando que se encuentra situada en la superficie de la transducina que interactúa con la rodopsina.

REQUERIMIENTOS DE LÍPIDOS EN LA FUNCIÓN DE LA RODOPSINA

Como la rodopsina es una proteína integral de las membranas de los segmentos externos de los bastoncillos, el ambiente provisto por la matriz lipídica de la membrana de los discos debe influenciar directamente las propiedades funcionales de la rodopsina. La escogencia del tipo y concentración de detergente, para lograr la solubilización exitosa de proteínas integrales de

membrana en forma funcional, es un proceso que todavía está sujeto a prueba y error. Además, la manera en la cual los surfactantes afectan la cantidad y el tipo de lípidos nativos que se mantienen asociados o son extraídos concomitantemente con las proteínas de membrana durante el proceso de solubilización, requiere mayor investigación. Los segmentos externos de los bastoncillos proveen un modelo de membrana interesante para estos estudios, puesto que el medio hidrofóbico de escogencia puede influenciar la estabilidad de los intermediarios reactivos de la rodopsina, que se producen por efecto de la luz, así como las reacciones de la rodopsina, dependientes de la luz. Debido a ello se analizó el efecto presentado por diferentes detergentes utilizados durante la extracción y purificación de la rodopsina, así como la adición de lípidos, sobre la fotoactivación de la transducina.

Muestras de rodopsina, aisladas utilizando cuatro procedimientos de extracción diferentes, fueron usadas para investigar la activación dependiente de la luz de la actividad GTPasa de la transducina. Segmentos externos de los bastoncillos purificados en oscuridad, fueron solubilizados con 1% 3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), 1 % n-dodecilo- β -D-maltósido (DM), o 1 % digitonina. Luego de una ultracentrifugación a 100.000 x g, los sobrenadantes fueron sembrados sobre una columna de inmunoafinidad 1D4-Sepharosa. Esta resina contenía un anticuerpo monoclonal (1D4) enlazado covalentemente a la matriz, el cual está dirigido en contra de rodopsina y reconoce específicamente los últimos 8 aminoácidos situados en el COOH-terminal de la proteína. La rodopsina pegada a la resina de afinidad fue lavada tres veces con 1 % CHAPS, 1 % digitonina, o 0.2 % DM. Rodopsina fue eluída incubando la matriz de afinidad con un péptido competidor consistente de los últimos 18 aminoácidos de la proteína. Este paso se llevó a cabo en 1% digitonina o en 0.2 % DM. De esta manera se prepararon 4 muestras diferentes: Rodopsina 1, la cual fue solubilizada en 1 % CHAPS y eluída en presencia de 1 % digitonina; Rodopsina 2, la cual fue solubilizada y eluída en presencia de 1 % digitonina; Rodopsina 3, la cual fue solubilizada en 1 % CHAPS y eluída en presencia de 0.2 % DM; y Rodopsina 4, la cual fue solubilizada en 1 % DM y eluída en presencia de 0.2 % DM. Estos cuatro procedimientos rindieron rodopsina con su espectro de absorción característico, y un cociente espectral A280 nm/A500 nm de 1.76-1.9, lo cual indicó que el pigmento aislado estaba puro en todos los casos. Esto fue verificado por análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, que mostró la presencia de una única banda polipeptídica migrando a un peso molecular aparente de 36.000-38.000.

Cuando las muestras de rodopsina fueron examinadas por su habilidad de estimular la actividad GTPasa de la transducina, dependiente de la luz, se observaron los siguientes resultados: Rodopsina 1 no fue capaz de estimular la actividad GTPasa de la transducina; Rodopsina 2 estimuló pobremente la actividad GTPasa de la proteína (1 mol de GTP hidrolizado/min/mol de rodopsina); y las Rodopsinas 3 y 4 activaron la capacidad GTPasa de la transducina a 5 mol de Pi liberado/min/mol de rodopsina. Sin embargo, la adición de fosfatidil colina de huevo a las cuatro muestras de rodopsina produjo un incremento substancial en la actividad hidrolítica de GTP de la transducina, dependiente de la luz. Para una concentración fija de 0.075 % de fosfatidil colina de huevo, la velocidad inicial de hidrólisis de GTP de la transducina, estimulada por la luz, incrementó a 1 mol de Pi liberado/min/mol de rodopsina para la muestra 1, a 2 mol de Pi liberado/min/mol de rodopsina para la muestra 2, y a 30 mol de Pi liberado/min/mol de rodopisna para las muestras 3 y 4.

Estos resultados sugieren que la fotoactivación efectiva de la transducina por la rodopsina requiere de fosfolípidos, los cuales parecen ser eliminados diferencialmente dependiendo del detergente empleado durante la solubilización de las membranas de los segmentos externos de los bastoncillos y el aislamiento del pigmento. Estos detergentes, así como la presencia o ausencia de lípidos, también podrían estar influenciando la estabilidad de los fotointermediarios de la rodopsina que se producen por efecto de la luz. En este sentido, podría ser posible que la producción de la forma de rodopsina fotoexcitada o metarodopsina II sea más lenta en digitonina que en DM, y quizás un fotointermediario más temprano en el ciclo de fotoactivación de la proteína fotorreceptora, sea atrapado cuando digitonina está presente en la muestra. Además, la permanencia de ciertos fosfolípidos asociados con la rodopsina podría estar influenciando la velocidad de la transición entre los fotointermediarios anteriores y la metarodopsina II, afectando consecuentemente la estimulación de la transducina dependiente de la luz.

CONCLUSIÓN

El proceso visual es un excelente modelo para los sistemas acoplados a proteínas G. Semejanzas extraordinarias se han observado entre las proteínas que llevan a cabo la cascada de reacciones en la ruta de señalización inducida por la luz, y muchas otras rutas de transmisión de señales. Hasta los momentos, miles de receptores acoplados a proteínas G han sido identificados, y todos comparten una arquitectura común conteniendo siete segmentos que atraviesan la membrana celular. Las proteínas G también constituyen una superfamilia que incluye al menos 20 distintas isoformas de subunidades a , 6 distintas isoformas de subunidades b , y 12 distintas isoformas de subunidades g , permitiendo muchas combinaciones posibles. A pesar de esta increíble heterogeneidad, todas estas proteínas comparten un mecanismo de acción común. Sin embargo, la mayoría de los otros sistemas acoplados a proteínas G son difíciles de estudiar desde un punto de vista bioquímico, debido a la baja disponibilidad de las proteínas involucradas. La alta concentración de rodopsina y transducina en los segmentos externos de los bastoncillos retinales, unido a la fácil purificación de ambas proteínas a homogeneidad, hace que el sistema rodopsina-transducina sea utilizado como un prototipo para el resto de los sistemas que funcionan con receptores y proteínas G. Este parecido entre las diferentes rutas que funcionan acopladas a proteínas G, hace que los resultados obtenidos aquí sean significativos puesto que en cierta manera sirven de marco de referencia de gran valor en el entendimiento funcional y estructural de los miembros del resto de estas dos superfamilias de proteínas involucradas en la señalización celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldwin, J., Schertler, G., y Unger, V. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 144-164.
- Bockaert, J., y Pin, J. P. (1999) *EMBO J.* 18, 1723-1729.
- Bubis, J. (1995) *Biol. Res.* 28, 291-299.
- Bubis, J. (1998) *Biol. Res.* 31, 59-71.
- Bubis, J., y Khorana, H. G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 12995-12999.
- Bubis, J., Ortiz, J. O., Möller, C., y Millán, E. J. (1994) *J. Protein Chem.* 13, 473-474.

- Bubis, J., Ortiz, J. O., Möller, C., y Millán, E. J. (1995). En: *Methods in Protein Structure Analysis* (Atassi, M. Z., y Appella, E., Eds.), pp. 227-250, Plenum Press, New York.
- Hamm, H. E. (1997) [http://pubweb.acns.nwu.edu/~ heh540/crystal.html](http://pubweb.acns.nwu.edu/~heh540/crystal.html)
- Hamm, H. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 669-672.
- Hargrave, P. A., y McDowell, J. H. (1992) *FASEB J.* **6**, 2323-2331.
- Hargrave, P. A. (1993). En: *Photoreceptor Cells*, Academic Press, Inc., San Diego.
- Kisselev, O. G., Meyer, C. K., Heck, M., Ernst, O. P., y Hofmann, K. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4898-4903.
- Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., y Sigler, P. B. (1994) *Nature* **369**, 621-628.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., y Sigler, P. B. (1996) *Nature* **379**, 311-319.
- Neer, E. J. (1995) *Cell* **80**, 249-257.
- Noel, J. P., Hamm, H. E., y Sigler, P. B. (1993) *Nature* **366**, 654-663.
- Schertler, G. F. X. (1998) http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/brochure/research/Schertler_G/Schertler_G.html
- Schnapf, J. L., y Baylor, D. A. (1987). En: *How Dinosaurs Ran and Other Scientific Insights*, pp. 18-25, Scientific American.
- Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., y Sigler, P. B. (1994) *Nature* **372**, 276-279.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., y Sigler, P. B. (1996) *Nature* **379**, 369-374.
- Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M., y Schertler, G. F. X. (1997) *Nature* **389**, 203-206.