

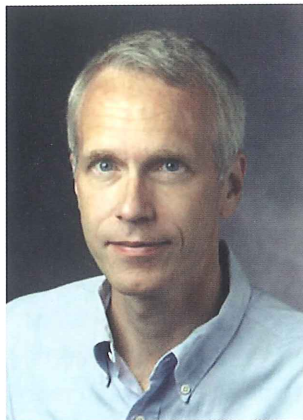
Premio Nobel de Química 2012

RECEPTORES Y EL LENGUAJE DE COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS

Federico Mayor Menéndez



Robert J. Lefkowitz



Brian Kobilka

El premio Nobel de Química 2012 ha reconocido los fundamentales estudios de los investigadores estadounidenses Robert J. Lefkowitz y Brian Kobilka en la identificación y mecanismos de acción de los “receptores acoplados a proteínas G” (conocidos en el ámbito científico como GPCR, por las siglas correspondientes a “G protein-coupled receptors” en idioma inglés), de amplísimo impacto fisiopatológico y farmacológico. Desde un punto de vista personal, el Nobel de este año ha supuesto una gran satisfacción, por su relación con mi área de investigación y porque conozco muy directamente a los dos premiados, desde que fui discípulo del profesor Lefkowitz durante mi estancia en Duke University (Carolina del Norte) en los años 1985-1986, periodo en el que Brian Kobilka también formaba parte de su laboratorio.

■ **Comunicación celular, receptores y capacidad de respuesta a cambios en el entorno**

La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G constituye un elemento central en las redes de señalización celular, por las que se transfiere información bio-

lógica del entorno, y cuyo conocimiento es esencial para entender el funcionamiento de los seres vivos y en particular de los organismos multicelulares. Así, los organismos unicelulares necesitan distinguir los nutrientes que se encuentran en su cercanía, y regular sus procesos metabólicos de acuerdo con esas disponibilidades. En el caso de las células de los organismos multicelulares, es preciso que integren la información procedente de las células vecinas y del conjunto del organismo, para tomar decisiones tales como reproducirse, especializarse, moverse a otro sitio o morir, para coordinar la organización en tejidos, el metabolismo, la migración de las células o la propia percepción sensorial.

El advenimiento de organismos multicelulares durante el proceso evolutivo precisó del desarrollo de nuevos sistemas de control de la actividad celular, para asegurarse de que la puesta en marcha de respuestas celulares se coordinase de tal manera que todas las células implicadas en un proceso biológico reaccionasen al unísono durante el desarrollo embrionario o ante respuestas fisiológicas. La solución evolutiva a estas necesidades de “socialización” celular fue el desarrollo de un “lenguaje” muy elaborado de comunicación, capaz no solo de captar las señales externas (particularmente a través de los sistemas de percepción sensorial como la vista o el olfato), sino de integrar la información procedente de las células vecinas y del conjunto del organismo, mediante el establecimiento de rutas complejas de señalización que coordinasen y ejecutasen las respuestas celulares ante cambios ambientales, metabólicos o patogénicos del organismo. A nivel molecular, los sistemas de señalización celular y de control de la expresión génica controlan el flujo de información desde el DNA al RNA, y de este a proteínas (en los procesos de transcripción y traducción, respectivamente) y, en niveles de integración superior, regulan dinámicamente el interactoma (las múltiples redes de interacciones que establecen las proteínas y que sustentan las funciones celulares) y la función fisiológica integrada en el organismo global, resultado de la coordinación de todas esas funciones celulares, lo que se ha llamado “fisioloma” (figura 1).

La extraordinaria tarea de estos procesos de coordinación de la actividad celular resulta evidente si se considera que un ser humano adulto consta de aproximadamente 80-100 millones de millones de células, de unos 300 tipos celulares distintos, agrupadas en distintos tejidos y órganos, formando entre sí una intrincada red de conexiones funcionales.

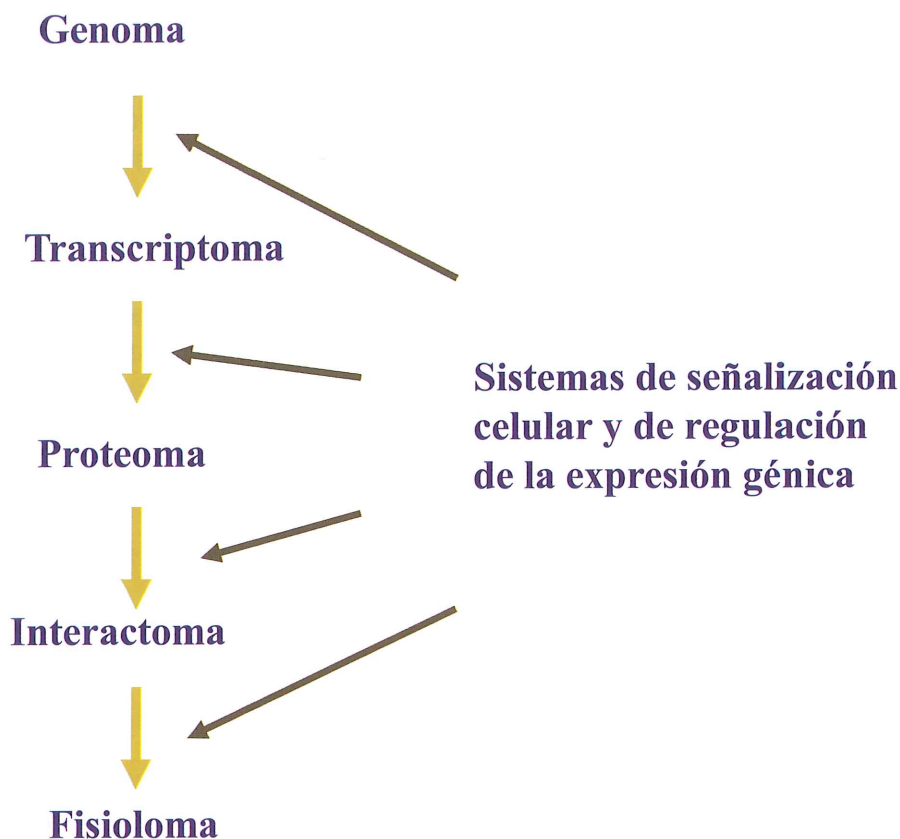


Figura 1. La transmisión de la información genética y las interacciones entre proteínas y entre células en las que se basa el funcionamiento de los organismos están directamente controladas por los sistemas de señalización celular.

■ Los GPCR como la familia de receptores más extendida y versátil

Los sistemas de señalización son extraordinariamente complejos, asemejándose a complicadas redes o circuitos con múltiples elementos de intersección y control. En general, estos sistemas se basan en la existencia de moléculas (denominadas mensajeros, hormonas, neurotransmisores, o mediadores químicos locales, según su origen celular, forma de liberación, y función) que llevan “órdenes” solo a aquellas células que poseen receptores específicos para reconocer a esa molécula.

Los receptores tienen la capacidad de actuar como detectores de señales y de transformar ese acto de reconocimiento molecular en una señal intracelular (denominada “segundo mensajero”). Los segundos mensajeros, ya desde dentro de la célula, modifican la actividad, localización o interacciones entre proteínas celulares (controlando así el metabolismo, o la función del citoesqueleto, por ejemplo) y también regulan la expresión génica, promoviendo una respuesta celular específica e integrada (figura 2). Por tanto, los sistemas de señalización celular están normalmente organizados en etapas secuenciales de detección, transformación, amplificación y diseminación de la señal, que son un poderoso instrumento para el control de las principales funciones celulares. Es importante recordar que estos sistemas, para ser eficaces, tienen que funcionar de forma transitoria y controlada de tal forma que solo persista la señal mientras lo haga el mensajero. Por tanto, tienen que existir además procesos de terminación, adaptación e integración que aseguren en todo momento su activación y desactivación controlada.

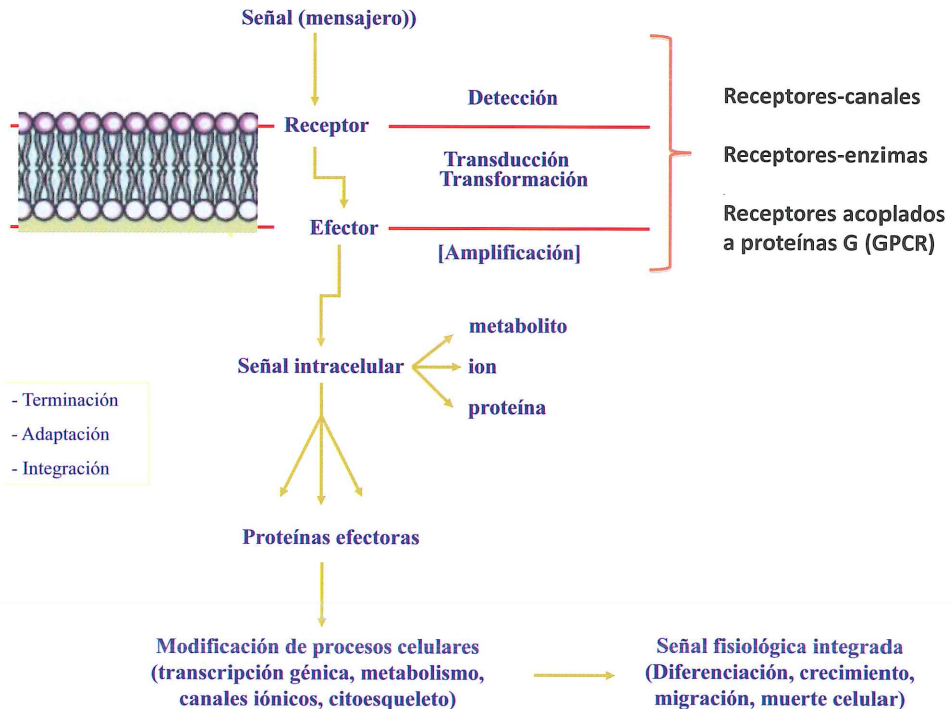


Figura 2. Organización de las cascadas de señalización controladas por receptores situados en la membrana plasmática.

La mayoría de los mensajeros se unen a receptores situados en la membrana plasmática de las células diana. Se distinguen tres grandes clases de receptores, definidos por su “estrategia” para transformar la señal extracelular en una intracelular (figura 2):

- a) Receptores acoplados a canales iónicos. Son proteínas de membrana que dejan pasar iones a través de ellas solo si está presente el mensajero en la parte extracelular. Estos receptores actúan como “compuertas” que se abren transitoriamente dejando pasar calcio, sodio o cloruro (dependiendo del receptor) a favor de su gradiente electroquímico. Este tipo de receptores (constituidos por varias subunidades de proteínas transmembrana) son especialmente abundantes en células excitables caracterizadas por una gran rapidez de respuesta, como las neuronas o las células musculares.
- b) Receptores con actividad enzimática propia. Son en general proteínas con una región transmembrana que presentan un sitio de unión del mensajero situado en el exterior de la célula y una zona con actividad enzimática (sitio catalítico) en el interior. La unión del mensajero provoca cambios en el receptor que resultan en la estimulación de su actividad catalítica. Muy frecuentemente esa actividad es de tipo quinasa, es decir, provoca la fosforilación en un residuo de tirosina, de serina o de treonina de la propia proteína receptora y de otras proteínas celulares, modificando transitoriamente su función. Muchos mensajeros de tipo peptídico, como la insulina, y muchos factores que controlan el crecimiento de las células, utilizan este tipo de receptores.
- c) Receptores acoplados a proteínas G. En este último tipo de transducción participan 3 proteínas de membrana distintas: el receptor (que es en este caso una proteína de 7 dominios transmembrana), las denominadas proteínas G (situadas en la periferia interna de la membrana plasmática) y otra proteína efectora o amplificadora. Entre estas proteínas efectoras se encuentran la adenilil-ciclasa (que produce el segundo mensajero denominado AMP cíclico a partir del ATP celular), fosfolipasas (que “liberan” segundos mensajeros “almacenados” en forma de lípidos en la membrana), o canales para diversos iones. Este sistema de señalización ha tenido un gran “éxito evolutivo”, ya que es la familia de receptores más extensa, más ubicua y más versátil. Los humanos tenemos casi mil receptores de esta familia en nuestro genoma capaces de reconocer específicamente a un repertorio extremadamente variado de estímulos, desde fotones en la retina a múltiples aromas en el epitelio olfativo, pasando por receptores para aminas biógenas, aminoácidos, derivados lipídicos, péptidos y proteínas en

múltiples tejidos, que controlan múltiples aspectos de la función celular y de la homeostasis del organismo.

Las proteínas G son interruptores moleculares que se activan transitoriamente. Estas proteínas pueden encontrarse en dos conformaciones espaciales diferentes: una forma inactiva, cuando unen al nucleótido GDP, y otra forma activada capaz de unirse con otras proteínas celulares denominadas efectoras, cuando unen al GTP. Pero esta activación es intrínsecamente transitoria, ya que estas proteínas son GTPasas, es decir, destruyen al cabo de un breve tiempo el GTP transformándolo de nuevo en GDP, y vuelven así a su estado basal. Tanto el encendido (intercambio de GDP por GTP) como el apagado (hidrólisis de GTP) de este interruptor molecular se puede modular por su interacción con otras proteínas. Hoy sabemos que cuando los GPCR reconocen a su mensajero (por ejemplo, el receptor de adrenalina a la adrenalina), cambian su conformación y pueden entonces interactuar con una proteína G de tipo heterotrimérico unida a GDP, lo que a su vez promueve el intercambio de GTP por GDP. La proteína G en su estado activo interactúa con efectores (como la adenilil-ciclasa) modificando parámetros intracelulares que diseminan la señal extracelular. Las subunidades G beta-gamma que se liberan simultáneamente pueden también actuar sobre diversos efectores celulares (figura 3). Posteriormente, la proteína G hidroliza GTP a GDP (en un proceso que puede ser activado por familias de proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa, denominadas GAP o RGS) y el sistema vuelve a su conformación basal. Solo si sigue habiendo mensajero en el exterior de la célula se repetirá el ciclo de activación y desactivación.

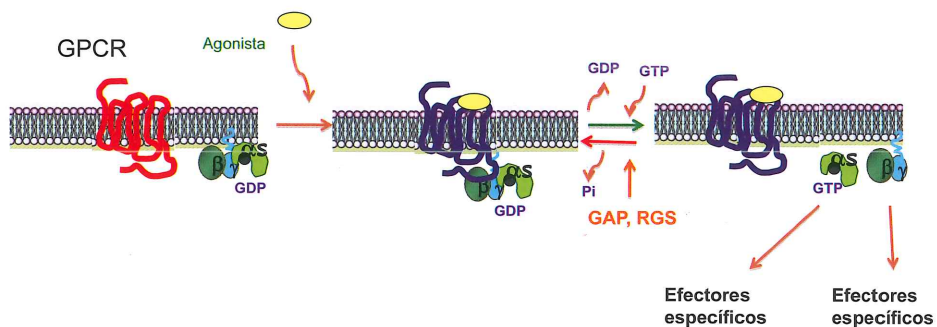


Figura 3. Señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G. La llegada del agonista promueve la interacción del receptor con la proteína G y el intercambio de GDP por GTP, lo que a su vez conduce a la disociación de las subunidades de la proteína G heterotrimérica, que pueden entonces interactuar con efectores específicos y controlar una gran variedad de procesos celulares básicos, la percepción sensorial y diversos aspectos de la homeostasis del organismo. La activación de las proteínas G es transitoria, ya que su capacidad GTPasa vuelve el sistema a su situación basal.

Los GPCR son también muy relevantes por sus implicaciones fisiopatológicas y en farmacología. En muchas enfermedades se encuentran alterados los niveles de mensajeros y/o las rutas de señalización que controlan GPCR. Por ejemplo, en patologías cardiovasculares existen aumentos en los niveles de mensajeros como catecolaminas, angiotensina o endotelina, que alteran a su vez el normal funcionamiento y crecimiento de tipos celulares cardiovasculares, y pueden conducir a hipertrofia cardíaca y a fallo cardíaco. La gran capacidad de control de las funciones celulares de los GPCR puede aprovecharse para modificarla de la forma más eficaz y específica posible. Así, pueden seleccionarse o diseñarse compuestos químicos capaces de unirse con gran afinidad a los mismos receptores que nuestros mensajeros internos, consiguiendo así mimetizar (agonistas) o impedir (antagonistas) su acción. Por ejemplo, agonistas de receptores beta2-adrenérgicos son eficaces broncodilatadores y se utilizan para tratar el asma; antagonistas beta1-adrenérgicos se utilizan para el tratamiento de la hipertensión; antagonistas del receptor H2 de la histamina inhiben la excesiva secreción gástrica; agonistas de receptores de opiáceos, como la morfina, se utilizan como analgésicos, etc.

■ El concepto de receptor y su evolución

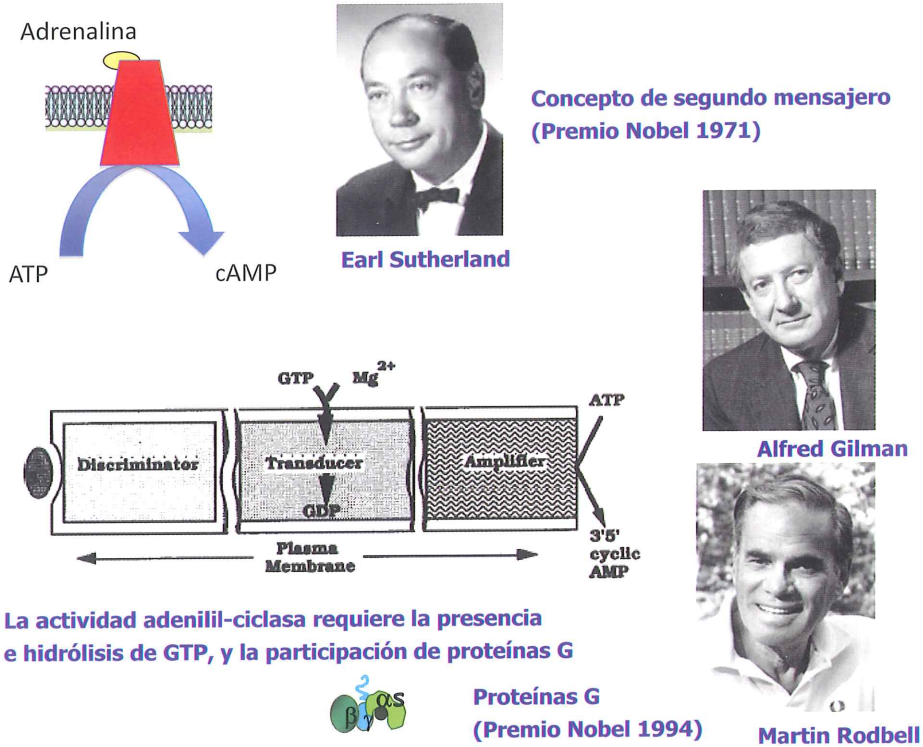
El concepto de receptores como elementos sensores del entorno se remonta a Paul Ehrlich en el año 1903, cuando se avanzó la idea de que las sustancias biológicamente activas podrían unirse a sitios específicos en las superficies de las células. Posteriormente, en la primera década del siglo XX, J.N. Langley y su estudiante Henry Dale fueron los primeros en proponer explícitamente la idea de una sustancia receptora en las células capaz de responder a estímulos, basados en experimentos clásicos de fisiología y farmacología. Sin embargo, la naturaleza físico-química de estos receptores era desconocida. En la década de 1940, el farmacólogo Raymond Ahlquist, examinando las diferentes reacciones de órganos a la adrenalina y sustancias químicas relacionadas, introdujo el concepto de la existencia de subtipos de receptores adrenérgicos, unos cuyo efecto principal es la contracción de células de músculo liso vascular (receptores alfa-adrenérgicos) y otros que estimulan la contracción cardíaca (beta-adrenérgicos).

Posteriormente, científicos como James Black (Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 1988) desarrollaron sustancias capaces de interferir con la acción de la adrenalina y la noradrenalina en el corazón, los denominados fármacos beta-bloquean-

tes, que tuvieron una extraordinaria repercusión en el tratamiento de la enfermedad coronaria y la hipertensión.

A pesar de estos importantes progresos, a principios de los años 1960 existía todavía un conocimiento muy escaso de las características moleculares de los receptores y de los mecanismos de transmisión de la señal. En esta década se produjo un avance conceptual crítico, la teoría del segundo mensajero sugerida por Earl Sutherland (que obtuvo el Premio Nobel en el año 1971). Sutherland estudiaba los mecanismos por los que la adrenalina regula la degradación de glucógeno a glucosa en el hígado. Más adelante descubrió que para promover este efecto la adrenalina no entra en la célula, sino que estimulaba la síntesis, en el otro lado de la membrana, de AMP cíclico (AMPc), tras la activación de una enzima la adenilil-ciclase. El AMPc actúa entonces como “segundo mensajero” transmitiendo la señal a proteínas intracelulares mediante la activación de una proteína quinasa dependiente de este nucleótido cíclico. En el marco de la teoría de la regulación alostérica que habían propuesto Monod, Changeux y Jacob, una hipótesis muy atractiva era que la adenilil-ciclase fuese una enzima alostérica de membrana con dos sitios diferentes, uno receptor en el exterior y otro catalítico en el interior de la célula (figura 4). Sin embargo, los científicos estadounidenses Martin Rodbell y Alfred Gilman demostraron en la década de los 70 y principios de los 80 del siglo pasado que la realidad era más compleja, y que la actividad adenilil-ciclase requería la presencia e hidrólisis de GTP, y que existían unas proteínas transductoras, denominadas proteínas G, que actuaban como intermediarios entre el reconocimiento de la adrenalina por su receptor y la estimulación de la actividad adenilil-ciclase. Estos científicos compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 1994.

En este contexto es en el que el trabajo de Robert Lefkowitz dio un impulso decisivo al entendimiento de la naturaleza y mecanismo de acción de los receptores de adrenalina. Lefkowitz, nacido en el año 1943 en el barrio de Bronx en Nueva York, se había formado como cardiólogo en la Universidad de Columbia y había realizado, tras un periodo de actividad clínica, una estancia postdoctoral en los Institutos Nacionales de la Salud trabajando en la identificación de las acciones de la hormona ACTH utilizando ensayos de radioligandos. Sin embargo, cuando se estableció en la Universidad de Duke como investigador independiente en el año 1973, centró sus esfuerzos en los receptores beta-adrenérgicos, quizá por su formación como cardiólogo y unido al hecho de que su padre había fallecido recientemente a causa de una patología cardíaca. Durante los siguientes años, el laboratorio de Lefkowitz desarrolló una serie de técnicas que fueron esenciales para demostrar la existencia de los receptores como entidades moleculares diferenciadas, su cuantificación, y posterior purificación. La utiliza-



La actividad adenilil-ciclase requiere la presencia e hidrólisis de GTP, y la participación de proteínas G

Figura 4. Paradigma de la activación de la adenilil-ciclase por adrenalina. Contribuciones de Sutherland y de Rodbell y Gilman.

ción de ligandos del receptor beta-adrenérgico marcados radioactivamente permitió la detección y cuantificación del receptor en las membranas celulares. Posteriormente, los ensayos de unión de ligando en diferentes condiciones experimentales permitieron identificar interacciones alostéricas complejas entre los receptores y las proteínas G. Así, la afinidad de los ligandos por el receptor beta-adrenérgico podía modularse por la presencia de GTP, mientras que la presencia de un agonista aumentaba la interacción entre el receptor y la proteína G. Estos experimentos llevaron a Lefkowitz a proponer el denominado “modelo del complejo ternario”, en el que el receptor activado unido a la proteína G constituía el elemento estimulador de la actividad adenilil-ciclase.

Con alguna excepción, como es el caso de la rodopsina en la retina, los receptores de membrana se encuentran generalmente en muy pequeñas concentraciones, lo que dificulta mucho su aislamiento y purificación. Gracias a la utilización de detergentes

como la digitonina, Marc Caron y Lefkowitz consiguieron solubilizar un receptor funcional en el año 1976. A continuación Caron desarrolló métodos de cromatografía de afinidad basados en el antagonista beta-adrenérgico alprenolol, que permitieron la purificación de los receptores a principios de los años 80. La disponibilidad del receptor purificado permitió a Lefkowitz hacer un experimento conceptualmente crítico: la reconstitución funcional de receptores purificados, proteínas G purificadas y la actividad catalítica de la adenilil-ciclasa, demostrando definitivamente que el mecanismo de transmisión de la señal de adrenalina incluía tres entidades moleculares diferentes (figura 5).

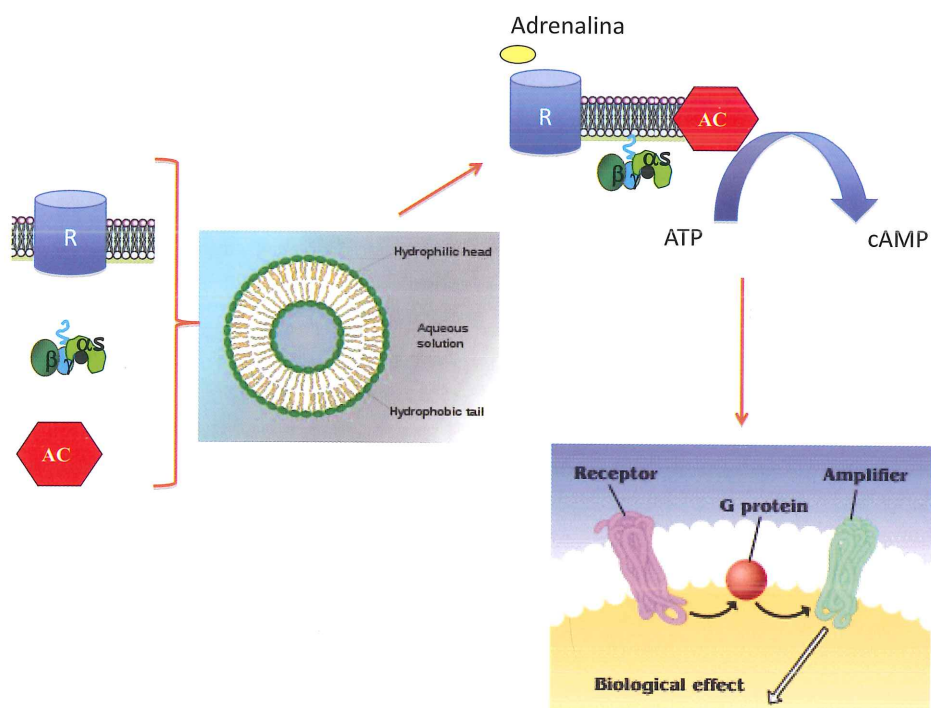


Figura 5. Contribuciones esenciales del laboratorio de Lefkowitz a los mecanismos de activación de la adenilil-ciclasa. La reconstitución del receptor de adrenalina purificado, proteínas G y la actividad catalítica de la adenilil-ciclasa demostró definitivamente la participación de tres entidades moleculares diferentes en el mecanismo de transmisión de señal de la adrenalina.

■ El nacimiento de una familia de receptores de membrana

El propio Lefkowitz ha recordado en entrevistas realizadas en los últimos años que 1986 marcó un punto de inflexión crítico en su investigación. En efecto, en-

tonces se dió el paso decisivo de identificar el gen que codificaba para el receptor beta-adrenérgico, lo que permitió también conocer la secuencia y características de los aproximadamente 400 aminoácidos que componen esa proteína. Ese proyecto lo lideraba en su laboratorio un postdoctoral de extraordinaria perseverancia y talento, llamado Brian Kobilka. Este investigador, nacido en Little Falls (Minnesota) en 1955 y formado también como médico cardiólogo en la Universidad de Yale, se había incorporado como postdoctoral en la Universidad de Duke en el año 1984. La disponibilidad de receptor beta-2-adrenérgico purificado permitió intentar el clonaje del gen y cDNA de este receptor utilizando técnicas que partían de su microsecuenciación peptídica. Después de varios años de esfuerzo, el grupo de Kobilka y Lefkowitz consiguió publicar la secuencia completa del receptor beta-2 adrenérgico de hámster en el número de la revista *Nature* de mayo de 1986. Sorprendentemente, el receptor de la adrenalina presentaba notables similitudes con el receptor de la luz (la rodopsina), en el sentido de que ambos parecían presentar siete tramos de aminoácidos capaces de atravesar la membrana celular.

Al mismo tiempo, el laboratorio de Lefkowitz también descubrió que los mecanismos de regulación del receptor de adrenalina eran muy parecidos a los de la rodopsina de la retina. Se había descrito que en presencia de luz la rodopsina activada se fosforilaba en su dominio intracelular por una enzima denominada rodopsina quinasa, lo que promovía su desensibilización. También en 1986, Benovic, Mayor, Caron y Lefkowitz publicaron un artículo en *Nature* en el que identificaban que una quinasa similar, denominada quinasa del receptor beta-adrenérgico (bARK por sus siglas en inglés) era capaz de fosforilar al receptor beta-2 adrenérgico en respuesta a adrenalina, y también a la rodopsina en respuesta a la presencia de luz (figura 6). Se vislumbraba, por tanto, la emergencia de una “familia” de receptores para estímulos externos muy diversos, pero que conservaba unos rasgos estructurales, de funcionamiento y de regulación común: estaba naciendo lo que luego resultó ser la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), también llamados por sus características estructurales receptores de siete dominios transmembrana, o receptores “serpentina”.

En los siguientes años, el clonaje por el laboratorio de Lefkowitz de diversos subtipos de receptores adrenérgicos y de un receptor muscarínico de acetil-colina por el grupo de Numa corroboró la idea de la existencia de una gran familia de receptores relacionados estructural y funcionalmente. También el grupo de Lefkowitz, con especial protagonismo de su colaborador J.L. Benovic, desarrolló a finales de la década de 1980 y en la década de 1990 la caracterización en detalle de los mecanismos de regulación de los GPCR por las proteínas GRK y arrestinas, abriendo

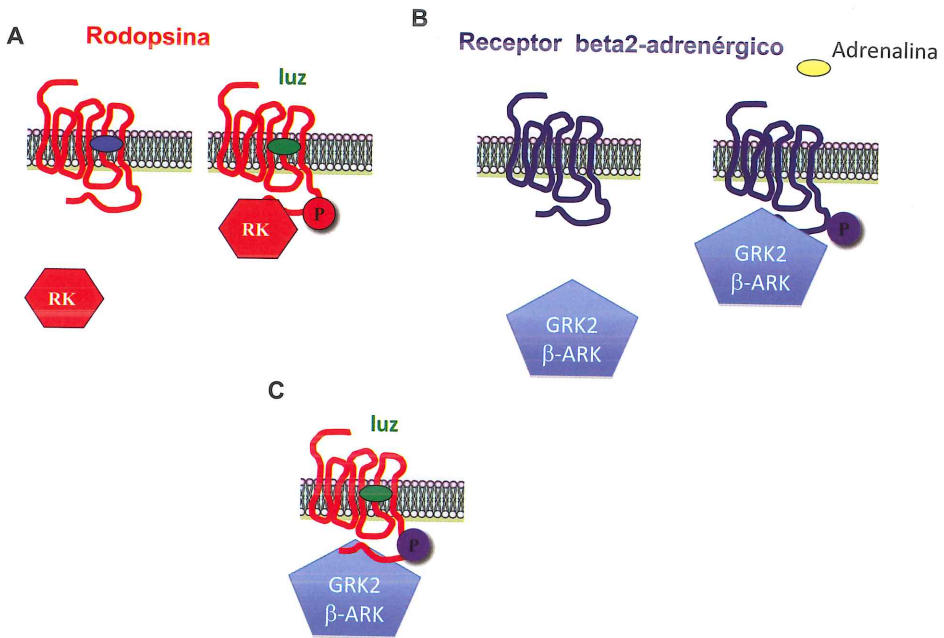


Figura 6. Similitud entre los mecanismos de regulación por fosforilación de la rodopsina y del receptor beta-2 adrenérgico promovidos por la presencia de agonistas.

nuevas perspectivas sobre el funcionamiento y los mecanismos de señalización de esta familia de proteínas.

■ La estructura íntima de los receptores acoplados a proteínas G

A pesar del inmenso progreso que suponían estos nuevos avances, persistían algunas preguntas clave: ¿cómo y dónde se unen los ligandos de los GPCR de forma específica?; ¿cómo se transmite la señal y se promueve la activación de las proteínas G? La respuesta a estas preguntas requirió de nuevos experimentos bioquímicos y biofísicos y, muy particularmente, precisaba dilucidar la estructura cristalina de estos receptores.

Tras trasladarse a la Universidad de Stanford (California) en 1989, Brian Kobilka se propuso un reto que tardó casi 20 años en alcanzar: determinar la estructura en el espacio de esos receptores. Este proyecto presentaba algunos retos muy difíciles de resolver: los GPCR son proteínas de membrana de poca abundancia relativa y son proteí-

nas muy dinámicas, capaces de adoptar diversas conformaciones, así como altamente inestables en detergentes, presentando poca exposición de superficies hidrofílicas. Todo ello suponía un auténtico reto a la hora de intentar su cristalización. Para hacer frente a estas dificultades, el grupo de Brian Kobilka en colaboración con investigadores como Gebhard Schertler y Raymond Stevens desarrollaron diversas soluciones alternativas que incluyeron el desarrollo de sistemas de expresión de alto rendimiento, la utilización de nuevos detergentes, la co-cristalización de receptores con antagonistas o agonistas inversos capaces de estabilizar conformaciones específicas del receptor; el incremento del área hidrofílica de los receptores para facilitar la cristalización, etc. Todo ello permitió publicar en el año 2007 la primera estructura del receptor beta2-adrenérgico unido al antagonista carazolol. Este avance facilitó también la comparación detallada con las estructuras tridimensionales de la rodopsina que, gracias a su mayor abundancia y facilidad de purificación, se habían obtenido por diversos autores, particularmente Krzysztof Palczewski y Okada alrededor del año 2000.

Estos progresos en la “ingeniería” de los GPCR y su cristalografía han permitido un avance acelerado en los últimos años en el conocimiento de nuevas estructuras. A finales del año 2012 se habían obtenido 16 estructuras de GPCR, 9 de ellas publicadas en el propio año 2012. Entre estas estructuras se incluyen las de los receptores beta-1 adrenérgicos, muscarínicos tipo M2 y M3, el receptor H1 de histamina, el receptor D3 de dopamina, el receptor tipo A2a de adenosina, el receptor de esfingosina 1 fosfato S1P1, el receptor de quimioquinas CXCR4, tres subtipos de receptores de opiáceos (OPRK1, OPRM1, OPRD1), el receptor de nociceptina OPRL1, así como receptores de neurotensina y el receptor de proteasas PAR1. Además, algunos de ellos han sido co-cristalizados en complejo con diferentes ligandos, lo que ha permitido investigar los cambios conformacionales relacionados con la unión de diversos compuestos químicos.

La obtención de estas diversas estructuras ha permitido conocer con precisión los dominios de receptores implicados en la interacción con sus ligandos específicos y las similitudes y diversidades estructurales presentes en los dominios extracelulares, transmembrana, e intracelular de los diversos GPCR.

La última frontera en este conocimiento de la estructura tridimensional de los receptores ha sido la identificación de los cambios estructurales que tienen lugar tras la activación del receptor y que conducen a la estimulación de las proteínas G. Para ello una vez más ha sido decisiva la aportación de Brian Kobilka, publicada en dos artículos sucesivos en la revista *Nature* el 29 de septiembre del año 2011. En estos trabajos,

su grupo describió la cristalización de un receptor beta-2 adrenérgico activado por agonista en complejo con la proteína Gs. Experimentos de una gran complejidad técnica, que incluyen la ingeniería de estas proteínas para favorecer la estabilización de ese complejo, han permitido identificar las superficies de interacción y los principales cambios estructurales que tienen lugar en las diversas proteínas del complejo (figura 7). En el caso del receptor beta-2 adrenérgico, el cambio conformacional inducido por agonistas permite la separación de los bucles intracelulares 2 y 3 de la estructura del receptor y la creación de un “bolsillo” hidrofóbico donde puede unirse la proteína Gs (figura 8), lo que permite a su vez cambios importantes en la estructura de la proteínas G que facilitan la liberación de GDP y el consiguiente paso de la proteína G a su estado activo. En definitiva, todos estos estudios están permitiendo obtener información muy relevante sobre las distintas conformaciones activas de los GPCR y sobre cómo son capaces de transmitir información al interior de la célula. El concepto general que parece emerger es que la familia de receptores de 7 dominios transmembrana tendría una arquitectura general modular, compuesta por un módulo de unión de ligandos y otro módulo de señalización hacia el interior celular (figura 9). El módulo de unión de ligandos, formado por los bucles extracelulares del receptor y la parte más externa de sus dominios transmembrana, presenta la mayor diversidad entre los distintos recep-

Receptor beta2-adrenérgico

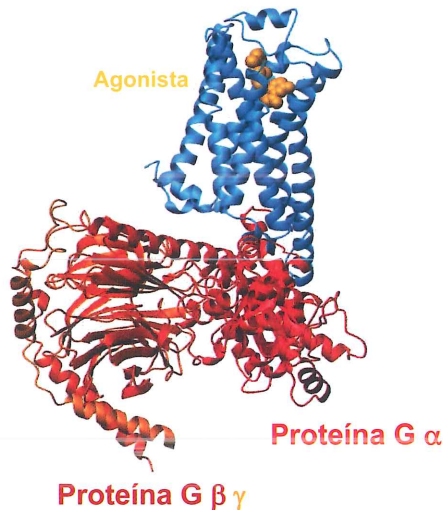


Figura 7. Estructura tridimensional del receptor beta-2 adrenérgico. Los trabajos de Kobilka han permitido cristalizar el receptor beta-2-adrenérgico activado por agonista en complejo con la proteína G e identificar las principales superficies de interacción entre estas proteínas (esquema modificado de www.nobel.org).

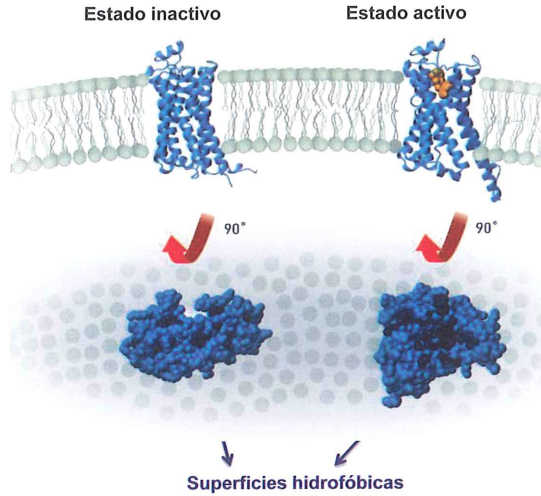


Figura 8. Cambios promovidos tras la activación del receptor. En el esquema se muestran los principales cambios conformacionales promovidos por agonistas, que conducen a un aumento de las superficies hidrofóbicas que se ofrecen a las proteínas G en el interior de la célula (esquema modificado de www.nobel.org).

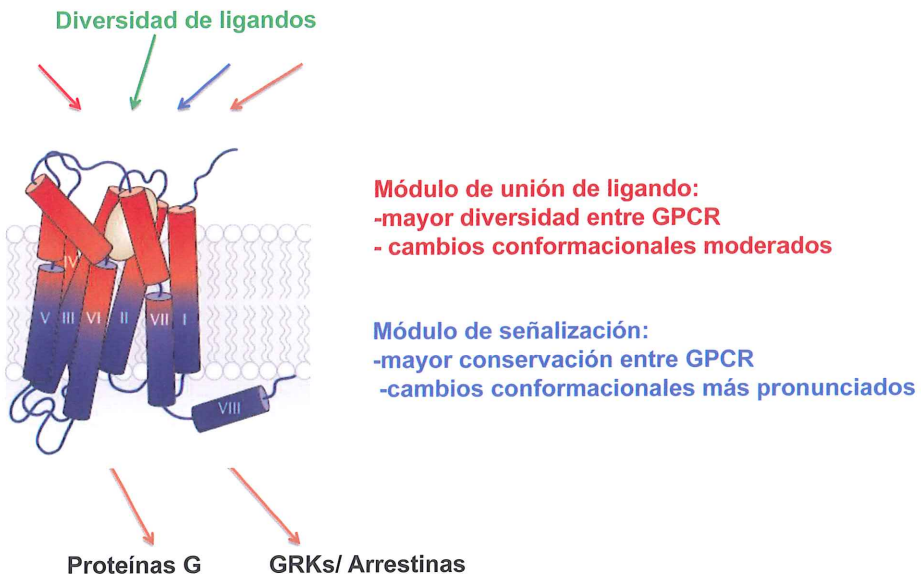


Figura 9. Arquitectura modular de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Los GPCR se estructuran en dos módulos con distintos grados de divergencia de secuencia y de movilidad conformacional (esquema inspirado en la revisión de Katritch y cols. (2012)).

tores GPCR (lo que permitiría explicar su interacción específica con múltiples ligandos diferentes) y sufre cambios conformacionales menos acusados en presencia de agonistas. Por el contrario, el módulo de señalización hacia el interior de la célula, formado por la parte más interna de los dominios transmembrana y por los bucles intracelulares del receptor, presenta menor diversidad entre las subfamilias de GPCR y sufre cambios conformacionales muy evidentes tras la llegada de los ligandos, permitiendo así la transmisión de la señal al interior de la célula. El hecho de que este último módulo sea más conservado es también coherente con el hecho de que 800 receptores para sustancias diferentes puedan converger en la interacción con las mismas proteínas G, o ser regulados por las mismas familias de quinasas GRK y de arrestinas.

■ Perspectivas futuras

La concesión del Nobel de Química a Lefkowitz y Kobilka completa justamente el reconocimiento que en años precedentes se había ido otorgando a los otros descubridores de pautas esenciales de este lenguaje de comunicación celular (Earl Sutherland, premio Nobel 1971 por identificar por primera vez el AMPc como segundo mensajero, y Al Gilman y Martin Rodbell, premio Nobel 1994 por su descubrimiento de las proteínas G). Sin embargo, hay todavía muchos interrogantes abiertos en este campo. Entre ellos cabe destacar las nuevas vías de señalización de receptores de 7 dominios transmembrana consecuencia de su interacción con las proteínas GRK y arrestinas. Estas proteínas no solamente actuarían como reguladores negativos del acoplamiento de los GPCR a las proteínas G (que es como fueron identificados), sino que presentan complejos interactomas que les permiten también participar en la propagación de la señal de estos receptores tras la llegada de un agonista. Esta divergencia de señalización de los receptores de 7 dominios transmembrana entre vías dependientes de proteínas G y otras cascadas dependientes de GRK y arrestinas ha llevado también a la identificación de los que se ha denominado “*biased ligands*”, sustancias químicas que de manera preferente inducen la interacción del receptor, bien con proteínas G, bien con GRK/arrestinas, lo que puede tener un gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos. En este mismo sentido, el mejor conocimiento de los “bolsillos” de unión de ligandos a los GPCR facilitará el diseño de nuevos compuestos químicos con mayor afinidad y/o selectividad. Por último, la secuenciación del genoma humano ha puesto de manifiesto la presencia en nuestra información genética de múltiples miembros de la familia de receptores, 7 dominios transmembrana sin mensajero fisiológico conocido (los denominados GPCR huérfanos), lo que presenta el importante reto de identificar sus ligandos endógenos y sus funciones fisiológicas e implaciones patológicas.

En definitiva, el camino abierto por Lefkowitz y Kobilka, seguido actualmente por muchísimos otros investigadores, permitirá seguir conociendo mejor las alteraciones de receptores en situaciones patológicas y avanzar en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

■ Bibliografía

- Ahlquist, R.P. (1973). "Adrenergic receptors: a personal and practical view". *Perspect Biol Med* 17, 119-122.
- Benovic, J.L.; F. Mayor, Jr., *et al.* (1986). "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase". *Nature* 321, 869-872.
- Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. (1976). "Solubilization and characterization of the beta-adrenergic receptor binding sites of frog erythrocytes". *J. Biol Chem* 251, 2374-2384.
- Cherezov, V.; Rosenbaum, D.M. *et al.* (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor". *Science* 318, 1258-1265.
- Chung, K.Y.; Rasmussen, S.G. *et al.* (2011). "Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor". *Nature* 477, 611-615.
- De Lean, A.; Stadel, J.M. *et al.* (1980). "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor". *J. Biol Chem* 255, 7108-7117.
- Dixon, R.A.; Kobilka, B.K. *et al.* (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin". *Nature* 321, 75-79.
- Katritch, V.; Cherezov, V. *et al.* (2012). "Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures". *Trends Pharmacol Sci* 33, 17-27.
- Katritch, V.; Cherezov, V. *et al.* (2013). "Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 531-556.

- Lagerstrom, M.C.; Schioth H.B. (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery". *Nat Rev Drug Discov* 7, 339-357.
- Lefkowitz, R.J.; Shenoy, S.K. (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins". *Science* 308, 512-517.
- Lefkowitz, R.J. (2004). "Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors". *Trends Pharmacol Sci* 25(8): 413-422.
- Lefkowitz, R.J. (2007). "Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective". *Biochim Biophys Acta* 1768, 748-755.
- Overington, J.P.; Al-Lazikani, B. (2006). "How many drug targets are there?" *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996.
- Palczewski, K.; Kumasaka, T. *et al.* (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor". *Science* 289, 739-745.
- Penela, P.; Murga, C. *et al.* (2010). "The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets". *Br J. Pharmacol* 160, 821-832.
- Pierce, K.L.; Premont, R.T.; Lefkowitz, R.J. (2002). "Seven-transmembrane receptors". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- Rall, T.W.; Sutherland, E.W. (1958). "Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles". *J. Biol Chem* 232, 1065-1076.
- Rasmussen, S.G.; Choi, H.J. *et al.* (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor". *Nature* 450, 383-387.
- Rasmussen, S.G.; DeVree, B.T. *et al.* (2011). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex". *Nature* 477, 549-555.
- Rodbell, M.; Birnbaumer, L. *et al.* (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action". *J. Biol Chem* 246, 1877-1882.

Ross, E. M.; Gilman A.G. (1977). "Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity". *J. Biol Chem* 252, 6966-6969.

Sprang, S.R. (1997). "G protein mechanisms: insights from structural analysis". *Annu Rev Biochem* 66, 639-678.

Tyndall, J.D.; R. Sandilya. (2005). "GPCR agonists and antagonists in the clinic". *Med Chem* 1, 405-421.