

IV.RESULTATS i DISCUSSIÓ

IV.1.- Efecte de la temperatura, el zenc i l'entorn lipídic en la conformació de la rodopsina i el seu cromòfor.

Per a la caracterització i estudi de la rodopsina nativa és necessària primer l'obtenció de la matèria primera, rodopsina a partir de retines bovines utilitzant tècniques d'extracció i d'immunopurificació.

IV.1.1.-Obtenció de la rodopsina a partir de retines bovines

Per obtenir la rodopsina a partir de retines bovines primer cal fer una extracció de ROS.

IV.1.1.1.-Extracció de ROS a partir de retines bovines

Seguint el procediment descrit en **III.2.1** s'obté l'espectre de la figura **4.1**.

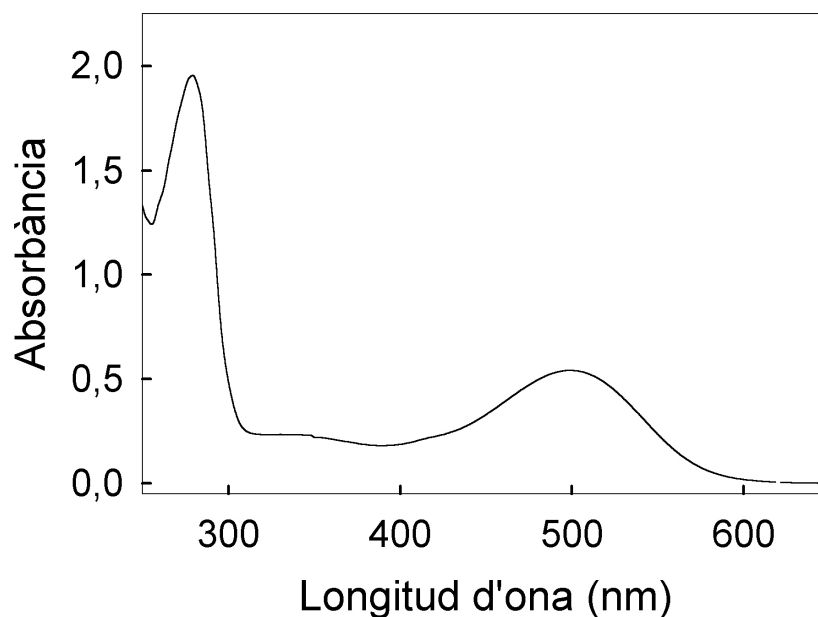


Fig. **4.1**: Espectre de ROS en tampó de fosfat potassi 70 mM pH 6,9, EDTA 0,1mM i 1% DM a 20°C.

A partir de l'absorbància a 500nm, sabent que ϵ_{500nm} de rodopsina de ROS és 40600 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Wald and Brown, 1953) i que la massa molecular és de 40000 Da (Papermaster i Dreyer, 1974), es calcula que la quantitat de rodopsina

obtinguda de les 100 retines utilitzades és de 32 mg de proteïna. Prèviament s'ha descrit que per aquest número de retines s'haurien d'obtenir al voltant de 35 mg (Papermaster i Dreyer, 1974). Aquest resultat demostraria que no hi ha hagut pèrdues de proteïna durant el llarg procés d'extracció de ROS.

La relació (o *ratio*) A280nm/A500nm, que és un dels criteris que ens indica quina és la puresa de rodopsina en la mostra de ROS (Salesse *et al.*, 1984), és de 3.6. Per intentar disminuir la relació a 2.4-2.6 com s'ha descrit anteriorment (Papermaster i Dreyer, 1974) i eliminar part de proteïna que encara es troba en la mostra i que no ens interessa ja que no és rodopsina, es va realitzar un rentat de la mostra amb urea.

Un cop realitzat el rentat la proteïna presenta una lleugera disminució de la relació A280nm/A500nm obtenint-la de 3.4 (espectre no mostrat).

Tot i que aquesta mostra de ROS ja es pot utilitzar, es pot augmentar la puresa de rodopsina utilitzant cromatografia d'immunoafinitat. Prèviament però s'ha d'acoblar una matriu de sefarosa amb l'anticòs Rho-1D4.

IV.1.1.2.-Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a CNBr-sefarosa i determinació de la seva capacitat d'unió

Abans de l'acoblament és necessari realitzar un espectre de l'anticòs Rho-1D4 per calcular la quantitat de sefarosa necessària, descrit en **IV.2.1.4**. A partir de l'absorbància a 280 nm (Fig. **4.2**), amb un valor de $\epsilon^{1\%}=1.383 \text{ mg/ml}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ es calcula que la quantitat d'anticòs inicial és de 126 mg.

Es realitza l'acoblament de l'anticòs a sefarosa i posteriorment es calcula la capacitat de la reïna per unir rodopsina. Per això, s'incuba ROS solubilitzada amb la reïna i s'elueix la proteïna amb dos tampons. Les 6 primeres elucions s'han obtingut amb tampó de baixa força iònica (Na_2HPO_4 2mM pH=6) mentre que en l'última mostra, el rentat E, s'ha eluït la proteïna amb tampó d'alta força iònica (Na_2HPO_4 2mM pH=6 i 150 mM NaCl) a on es desprèn tot el que encara queda unit a la reïna (majoritàriament opsina). Els espectres de la proteïna purificada en les diferents elucions amb la reïna acoblada es mostren en la figura **4.3**.

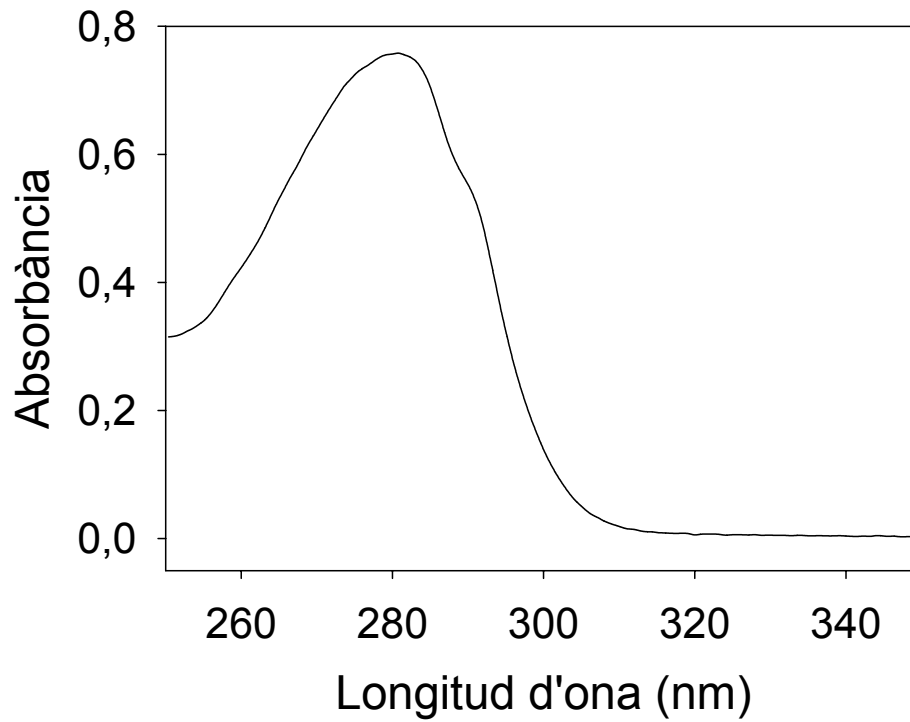


Fig. 4.2: Espectre de l'anticòs Rho-1D4 en NaHCO_3 0.25M i NaCl 0.9M (pH=9).

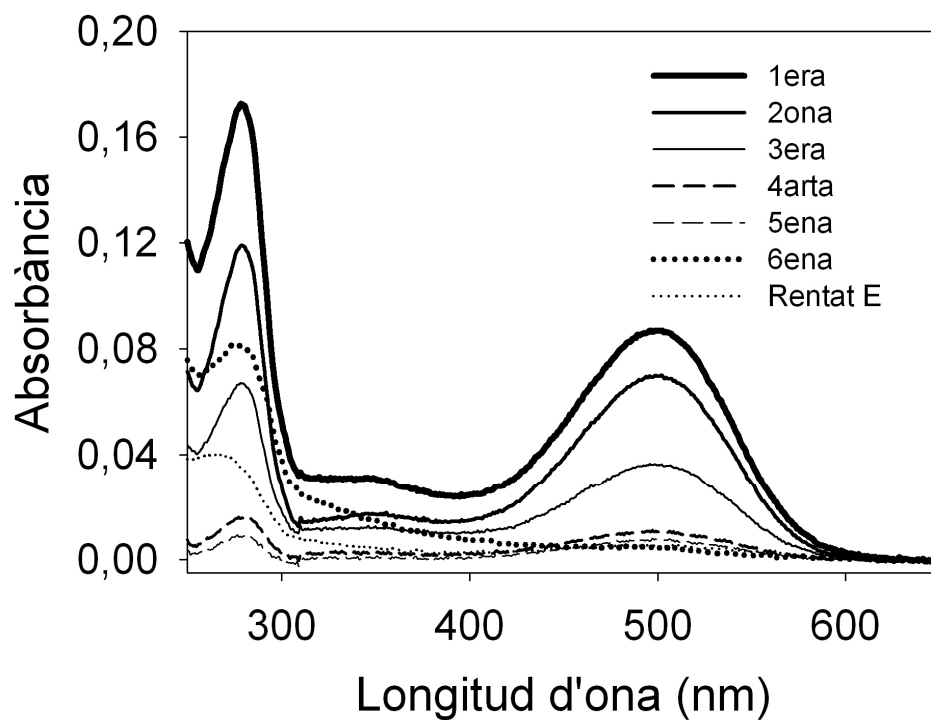


Fig. 4.3: Espectres de la rodopsina de ROS purificada en Na_2HPO_4 2mM pH=6 i 0.05% DM o Na_2HPO_4 2mM pH=6, 150 mM NaCl i 0.05% DM (Rentat E) a partir de la reina acoblada amb l'anticòs Rho-1D4.

A partir de l'absorbància a 500 nm dels espectres (Fig. 4.3) es calcula la quantitat de proteïna obtenint el resultat de la taula 4.1.

Elució	Volum (ml)	Absorbància	Quantitat de Proteïna (µg)
1era	1.0	0,087	86
2ona	0.5	0,070	34.6
3era	0.5	0.036	18
4era	0.5	0.011	5.3
5ena	0.5	0.008	3.7
6ena	0.5	0.005	2.7
Rentat tampó E	0.5	0.005	2.6
Proteïna total obtinguda			152.9
Mostra inicial	1.0	0.26	256.4

Taula 4.1: Quantitat de rodopsina purificada amb la reïna acoblada a l'anticòs Rho-1D4.

De la proteïna utilitzada inicialment, s'ha recuperat un 60% després de la purificació i majoritàriament entre la 1era i la 2ona elució (78% de la proteïna total purificada).

Calculant la diferència de la proteïna inicial, la total eluïda i sabent la quantitat de reïna que s'ha utilitzat en la purificació s'obté que la capacitat d'unió de la reïna és d'1.26 µg de proteïna/µl de reïna, similar a valors obtinguts anteriorment (Cha *et al.*, 2000 i Hwa *et al.*, 1997).

Aquesta reïna es podrà utilitzar per a la purificació de rodopsina a partir de retines bovines o bé rodopsina recombinant expressada en cèl·lules COS-1.

IV.1.1.3.-Purificació de la rodopsina a partir de ROS

Un cop obtingut ROS a partir de les retines, es purifica rodopsina mitjançant el procediment explicat en **III.2.1.5**, es realitza un espectre de cadascuna de les elucions i el resultat d'aquests espectres és a la figura **4.4**.

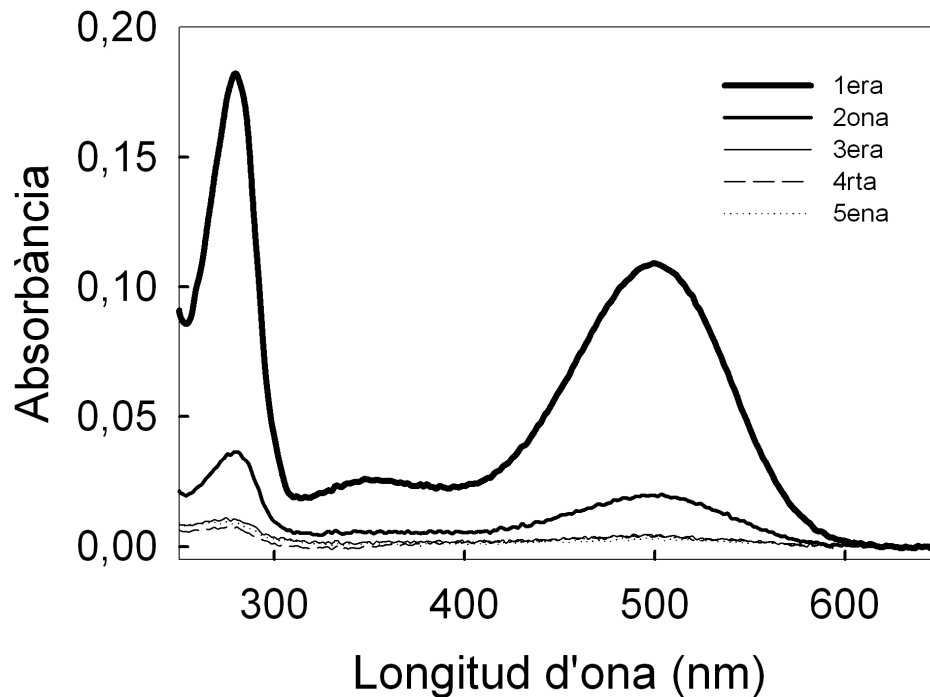


Fig. 4.4: Espectres d'absorció de les elucions de la rodopsina purificada en Na_2HPO_4 2mM pH=6 i DM 0.05% a 20°C.

S'ha descrit que la relació A_{280}/A_{500} de rodopsina de boví purificada és entre 1.6-1.8 (Hong *et al*, 1982), en els nostres resultats s'obtenen *ratios* de 1.6 i 1.8 en les dues primeres elucions i més de 2 en les tres següents (taula **4.2**). Això s'explica per que en les dues primeres elucions, es purifica majoritàriament rodopsina, en canvi en les darreres elucions es purifica tant rodopsina, que contribuiria a l'absorbància a 500nm, com opsina, que contribueix a augmentar la banda de 280 nm i per tant a empitjorar la *ratio*.

Elucions	A_{280nm}/ A_{500nm}
1	1.6
2	1.8
3	2.5
4	2.4
5	3.1

Taula 4.2: Relació A_{280nm}/A_{500nm} obtinguda en les diferents elucions de la rodopsina purificada.

L'avantatge d'utilitzar rodopsina i ROS de retina és treballar amb la proteïna nativa pròpiament dita, a més que se n'obté amb més quantitat. Això facilita el seu estudi si es compara amb les proteïnes recombinants, que requereixen més manipulació, més temps i on la quantitat de proteïna obtinguda és més petita que a partir de retines.

Saber quins factors poden influir en l'estabilitat de la rodopsina és important per tenir un coneixement més profund de la proteïna en les condicions de treball i aplicar-ho en l'estudi de proteïnes mutants associades a malalties de la retina.

En aquest treball es mostrarà quina influència té la temperatura en la isomerització de l'11-*cis*-retinal i quin és l'efecte del zenc i del detergent DM, utilitzat en la purificació de la proteïna, en l'estabilitat de rodopsina.

IV.1.2.- Efecte del detergent DM en l'estabilitat de la rodopsina

L'entorn lipídic de la rodopsina és important per la seva estabilitat i organització intramembranal (Polozova i Litman, 2000) a causa d'una interacció molt íntima entre la rodopsina i la membrana lipídica ja que la proteïna presenta uns solcs hidrofòbics que estan en contacte amb la bicapa (Hessel *et al.*, 2001). En l'estudi de rodopsina normalment es solubilitzen les mostres amb detergent per tal de preservar les propietats dels receptors formant un complex membrana-detergent-rodopsina i s'ha vist que el detergent modula la capacitat del receptor per activar la proteïna G (DeGrip *et al.*, 1998).

En aquest apartat s'estudia com la concentració de DM afecta l'estabilitat de la rodopsina, concretament la dels fotointermediaris MetaII i MetaIII seguint el protocol descrit en **III.2.5.3.3**.

IV.1.2.1.-Estabilitat de la MetaII a diferents concentracions de DM

L'estabilitat de la MetaII es mesura a partir del valor d'absorbància a 440nm d'una mostra de rodopsina acidificada després de ser il·luminada. Entre la il·luminació i l'acidificació es deixen passar diferents temps, des de 0 minuts fins a 1 o 2 h. A mesura que passa el temps, s'observa que la mostra de rodopsina acidificada presenta un màxim desplaçat a longituds d'ona més baixes de 440 nm (Fig. 4.5), degut a que la MetaII es va separant en opsina i tot-*trans*-retinal.

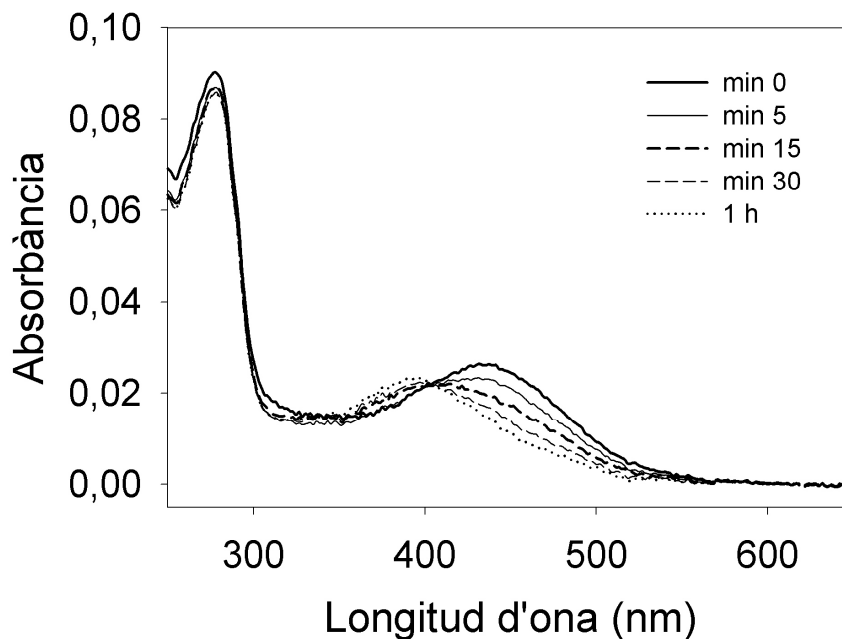


Fig. 4.5: Espectres obtinguts després d'acidificar a diferents temps rodopsina il·luminada en tampó fosfat potassi 70 mM pH 6.9, EDTA 0.1mM i 0.05% DM a 20°C.

Aquest assaig es repeteixen a diferents concentracions de DM i es representen en un gràfic d'absorbància a 440nm respecte el temps (Fig. 4.6).

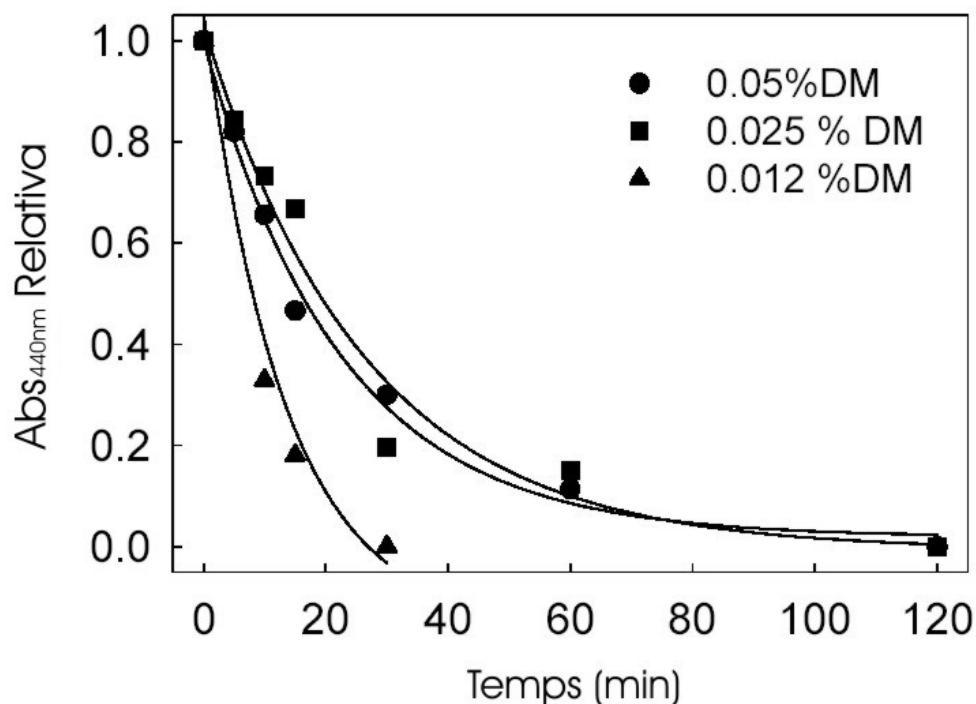


Fig. 4.6: Decay de la MetaII en tampó fosfat potassi 70 mM pH 6.9 i EDTA 0.1mM a les diferents concentracions de DM, determinat a partir del mètode d'acidificació (Sakamoto i Khorana, 1995).

En aquest gràfic s'observa com baixes concentracions de DM promouen la separació de l'opsina del tot-*trans*-retinal mentre que l'estabilitat de MetaII és similar en 0.05% i 0.025% de DM, que es confirma amb el càlcul del temps de vida mitjana ($t_{1/2}$) (taula 4.3).

% DM	$t_{1/2}$ MetaII (min)
0.012	9.1
0.025	18.2
0.05	18.1

Taula 4.3. Temps de vida mitja de la Meta II a diferents concentracions de DM.

Aquests resultats mostren que MetaII és més estable a elevades concentracions de DM, tant si és 0.025% com 0.05% en canvi a 0.012% el temps de vida mitja el fotointermediari disminueix a la meitat.

IV.1.2.2.-Formació de la MetaIII en presència de diferents concentracions de DM

Pel seguiment de la formació de MetaIII es segueix el valor d'absorbància a 465 nm a les diferents concentracions de detergent (Fig. 4.7) i es calcula el % de formació del fotointermediari respecte el valor d'absorbància a 465 nm de la mostra inicial en fosc. El percentatge de formació de la MetaIII en les diferents concentracions de detergent es mostra a la taula 4.4.

%DM	% Formació MetaIII
0.012	36
0.0175	30
0.025	24
0.05	15

Taula 4.4. Percentatge de formació de MetaIII a diferents concentracions de DM.

A partir d'aquests resultats s'observa que a mesura que s'augmenta la concentració de DM, disminueix la formació de la MetaIII.

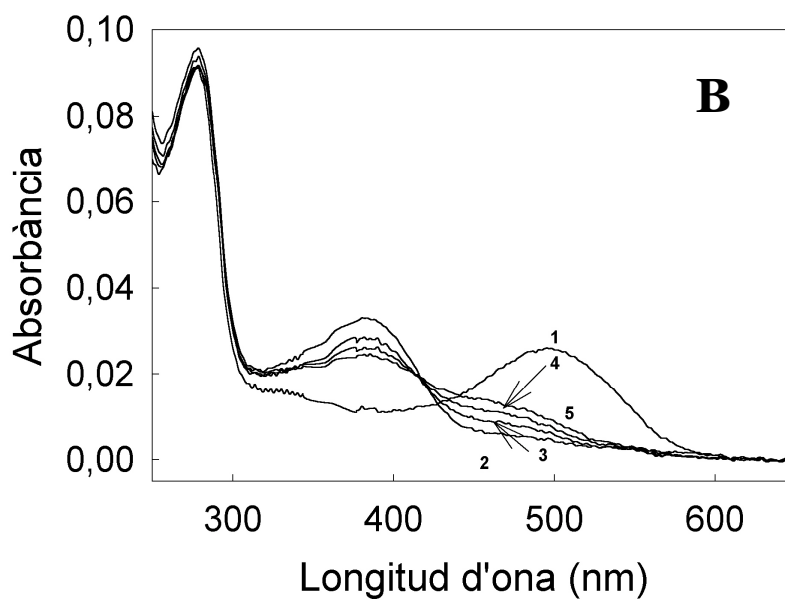
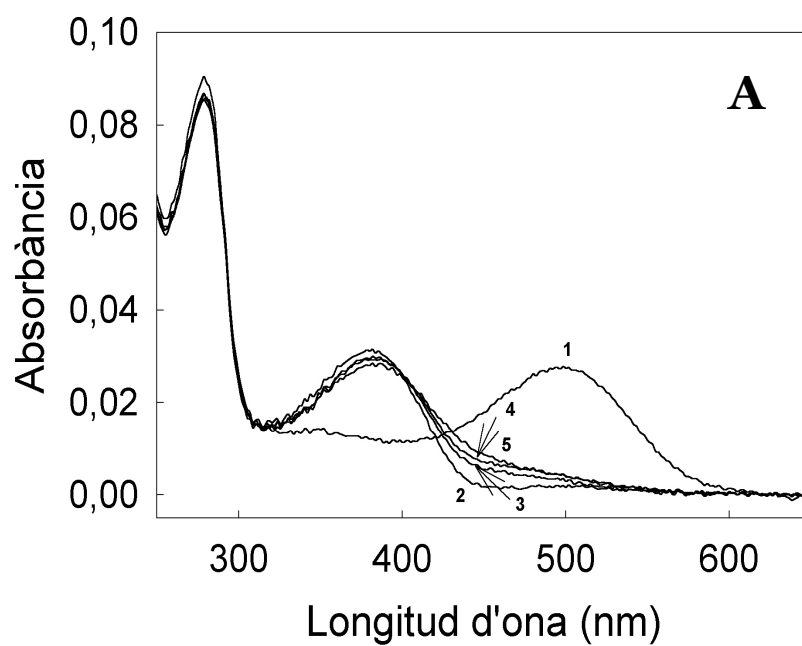


Fig. 4.7: Espectres de la formació de la MetaIII en tampó fosfat potassi 70 mM (pH 6.9) i EDTA 0.1mM a les diferents concentracions de DM. A) Formació de MetaIII en 0.05%DM 1) fosc, 2) espectre il·luminat minut 0, 3) minut 3, 4) minut 6 i 5) 36 minuts. B) Formació de MetaIII en 0.012%DM 1) en fosc, 2) il·luminat minut 0, 3) minut 6, 4) minut 12 i 5) minut 24.

IV.1.2.3.-Com afecta la concentració de detergent a l'estabilitat i l'activitat de la rodopsina?

A mesura que disminuïm la concentració de detergent, observem una disminució de l'estabilitat de la MetaII, mentre que la formació de MetaIII es veu disminuïda per l'increment de concentració del DM.

La concentració de detergent condiciona l'equilibri entre MetaI i MetaII i s'ha observat que el DM desplaça l'equilibri cap a la formació de MetaII (Vogel *et al.* 2004), tal i com mostren els nostres resultats. En canvi en un altre detergent, la digitonina, s'ha vist que dóna rigidesa a les micel·les de rodopsina-detergent-membranes, i que fa desplaçar l'equilibri cap a la formació de MetaI (Vogel *et al.* 2004). En els nostres resultats, aquesta rigidesa dels complexos es podria comparar amb la de la membrana de ROS sense solubilitzar o amb poca presència de detergent, provocant que es formés MetaIII, via MetaI (Vogel *et al.* 2004).

Els resultats obtinguts es poden complementar amb dues característiques més com són la funcionalitat i l'estabilitat de rodopsina mesurada per calorimetria diferencial de rastreig (DSC, *difference scanning calorimetry*) (Marrón, 1996).

Els resultats referents a la capacitat de rodopsina per activar la proteïna G si es realitza a diferents concentracions de DM, des de 0% fins a 0.05% de DM, mostren que augmenta l'activitat del receptor des de 0% DM fins a 0.01% on s'observa una màxima activació i a partir d'aquí, al augmentar la concentració l'activitat disminueix.

Quan es comparen aquests resultats amb els de l'estabilitat de MetaII i la formació de MetaIII ens trobem que un paper important el realitzaria la presència de transducina a l'entorn, que actua desplaçant l'equilibri de MetaIII a MetaII provocant que aquesta rodopsina inactiva però unida al tot-*trans*-retinal, passi a la forma activa (Zimmermann *et al.* 2004). Així doncs, mentre que els experiments espectroscòpics es realitzen en una concentració inapreciable de transducina (la que pot existir en la mostra de ROS en que s'han realitzat els experiments) i hi observem una elevada formació de MetaIII a baixes concentracions de detergent, en els experiments d'activació, al existir la transducina a una concentració de 250 nM (apart de la present en la mostra de ROS) pot desplaçar-ne l'equilibri i provocar que per molt que hi hagi MetaIII

des del punt de vista espectroscòpic, sigui veritablement MetaII la que activi a la transducina en els experiments de funcionalitat.

El perquè a altes concentracions de detergent la Meta II és més estable però activa menys a la transducina, s'explicaria per què les micel·les formades pel DM poden alterar l'equilibri de proteïna-membrana-detergent de cada micel·la donant un entorn a la rodopsina no favorable per a la unió i/o activació de la proteïna G (Ramon *et al.*, 2003 i Mitchell *et al.*, 2001; Bubis, 1998), i també per que aquestes condicions poden afectar l'estabilitat de la transducina.

En resum, altes concentracions de detergent afavoreixen una millor estabilitat de la MetaII però no afavoreixen les condicions per a que aquesta MetaII formada pugui activar a la proteïna G. És per això que els experiments d'activació es realitzen en les concentracions més baixes de DM, però per sobre de la concentració micel·lar crítica (0.01%DM).

En els resultats d'estabilitat tèrmica de la rodopsina obtinguts per DSC observem que l'estabilitat de la part proteica, la opsina, no es veu afectada significativament per la presència del detergent. En canvi, en els experiments d'estabilitat tèrmica realitzats a 55°C, al cromòfor (opsina + 11-cis-retinal) i seguits per espectroscòpia UV-Vis demostren que hi ha un canvi en l'entorn del retinal (Fig. 4.8) ja que s'observa un augment en el màxim de longitud d'ona a 380 nm, característic del retinal lliure.

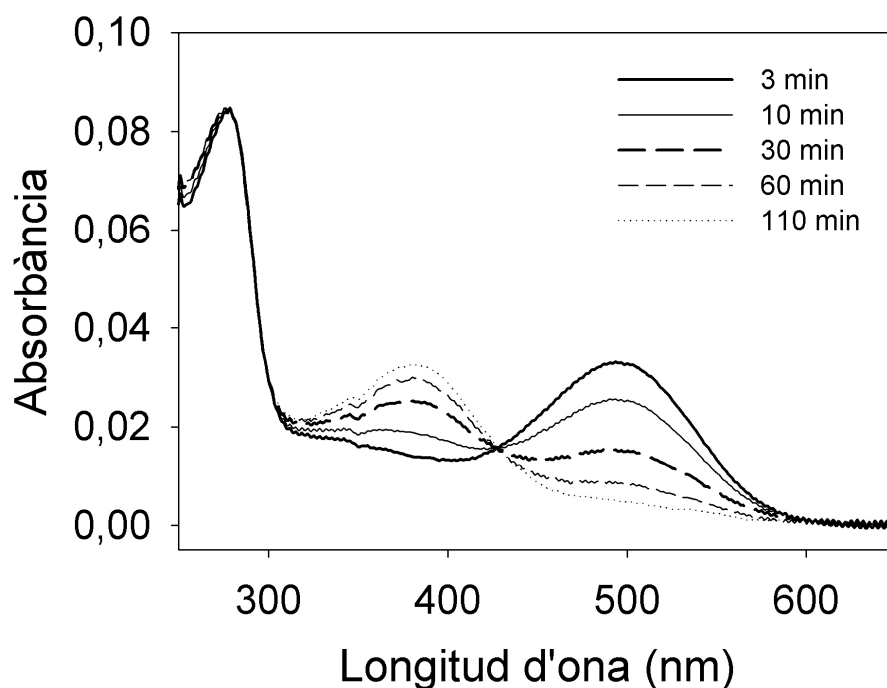


Fig. 4.8: Seguiment del procés de desnaturalització tèrmica de rodopsina de ROS a 55°C

Tots aquests factors aporten més evidències de que l'entorn lipídic condiciona l'estabilitat dels fotointermediaris i la funcionalitat de la rodopsina.

IV.1.3.- Isomerització específica de l'11-*cis*-retinal unit a la rodopsina sota condicions de desnaturalització

La majoria de treballs publicats de rodopsina es centren en la part proteica, és a dir, en realitzar mutacions en la proteïna per estudiar l'efecte en l'estructura i/o funció de l'opsina, però cal considerar la importància de l'altra part que constitueix la rodopsina, l'11-*cis*-retinal. En aquest apartat s'estudia que li succeeix a l'11-*cis*-retinal un cop és tractat a 55°C, en solució i quan està unit a la rodopsina, per això, s'han realitzat els experiments descrits en III.2.5.3.2 i s'obtenen els resultats de les figures 4.9 i 4.10.

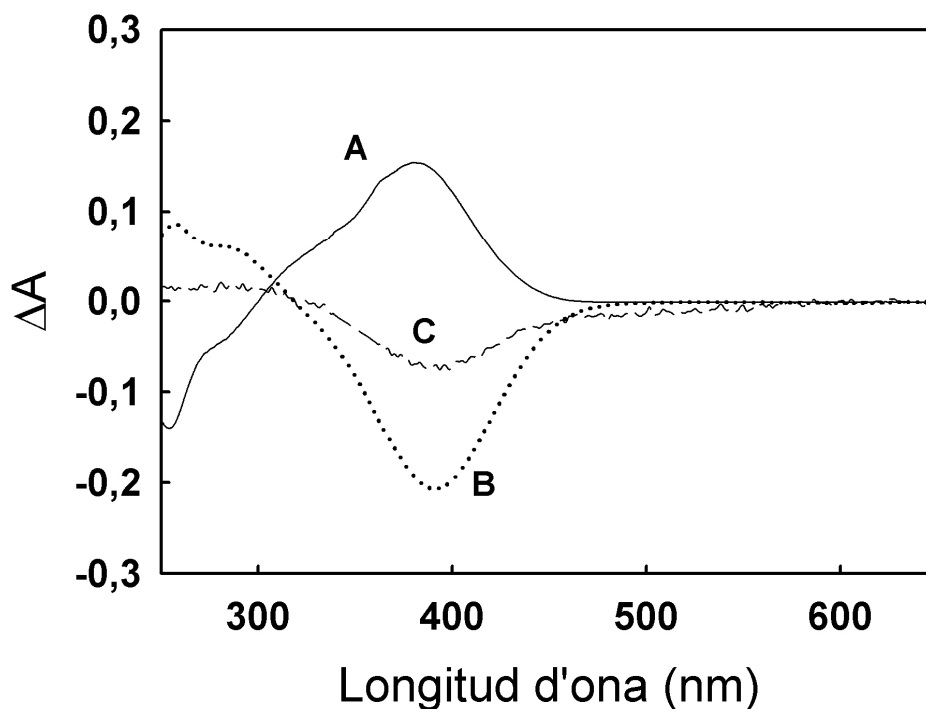


Fig. 4.9: Espectres de diferència entre abans i després d'il·luminar de a) 11-*cis*-retinal en etanol b) tot-*trans*-retinal en etanol c) rodopsina en Na₂HPO₄ 2mM pH=6.0 tractada a 55°C durant 30 min.

S'observa que el retinal extret de rodopsina tractada a 55°C (C) presenta un comportament molt similar al tot-*trans*-retinal (B). Per estudiar si aquesta isomerització es produeix a causa de la proteïna o pròpiament per l'11-*cis*-

retinal, s'ha repetit l'experiment utilitzant 11-*cis*-retinal tractat a 55°C i els resultats es mostren en la figura 4.10.

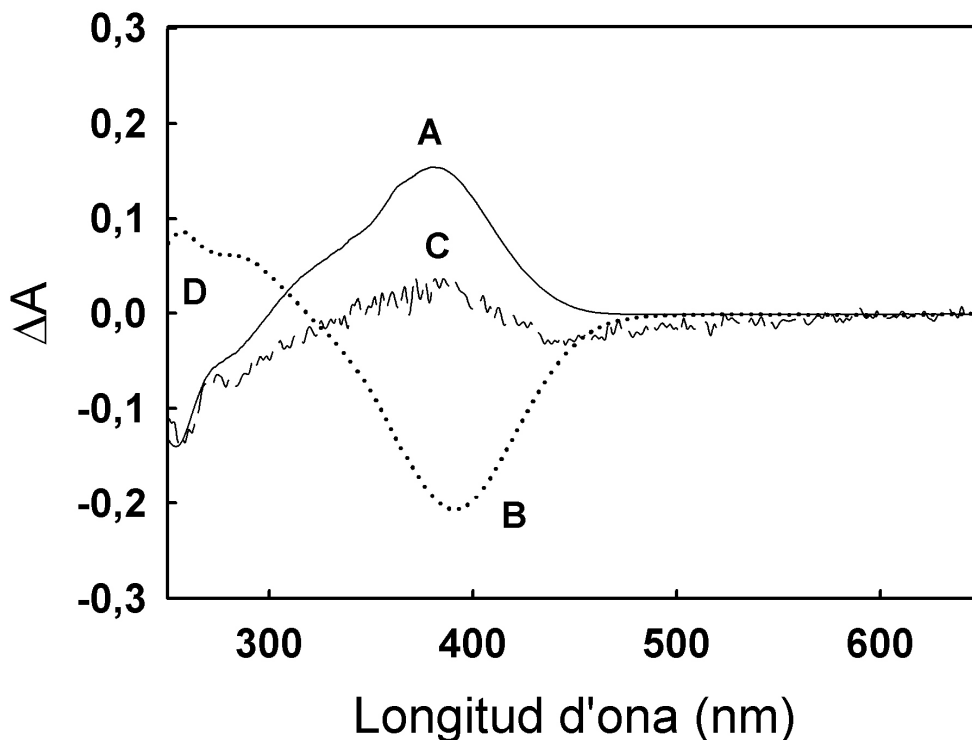


Fig. 4.10: Espectres de diferència d'abans i després d'il·luminar de a) 11-*cis*-retinal en etanol b) tot-*trans*-retinal en les mateixes condicions que l'11-*cis*-retinal i c) 11-*cis*-retinal en etanol i tractat a 55°C durant 30 min.

L'espectre de diferència de l'11-*cis*-retinal tractat a 55°C (C) és similar al del cromòfor sense tractar (A).

Aquests resultats demostren que l'11-*cis*-retinal i el tot-*trans*-retinal presenten un diferent patró d'espectre de diferència i d'aquesta manera els podem distingir en aquests experiments. En les figures 4.9 i 4.10 observem que l'espectre de diferència del retinal extret de la rodopsina tractada a 55°C no presenta un mateix patró que el de l'11-*cis*-retinal en solució sinó similar al del tot-*trans*-retinal. Mentre que quan es mostra l'espectre de diferència de l'11-*cis*-retinal en solució tractat a 55°C, aquest és molt similar al obtingut en el cas d'aquest mateix pigment sense tractar.

Les mostres tractades són analitzades per HPLC seguint el procediment descrit en l'apartat III.2.8 i s'obtenen els resultats que es mostren en la figura 4.11.

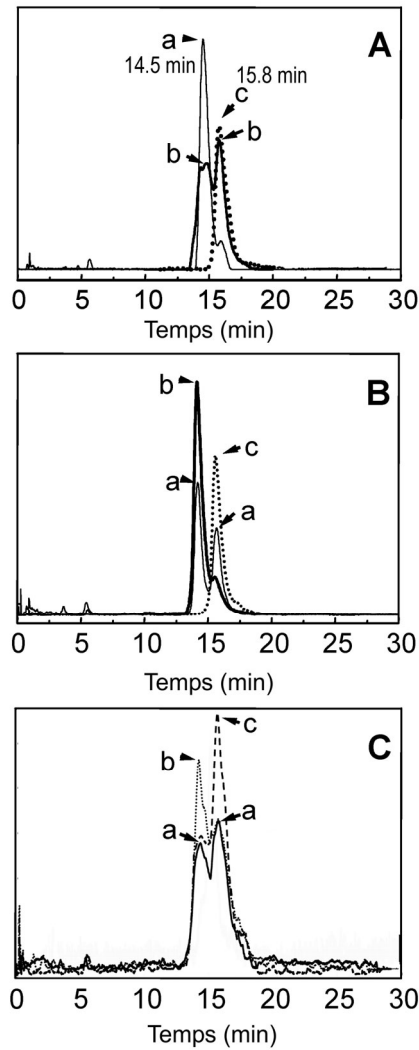


Fig. 4.11: Cromatograma d'HPLC d'11-*cis*-retinal lliure i de rodopsina tractat a 55°C. En les absisses es mostren el temps de retenció dels diferents retinals en 72% acetonitril aquós (volum/volum) i acetat d'amoni 0.015 M pH=5.5 (A: mostres d'11-*cis*-retinal en fosc (a), il·luminat (b) i tot-*trans*-retinal en fosc (c); B: barreja d'11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal en fosc (a), 11-*cis*-retinal tractat 1h a 55°C (b) i tot-*trans*-retinal tractat 1h a 55°C; C: barreja d'11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal en fosc (a), retinal extret de rodopsina sense tractar (b) i retinal extret de rodopsina tractada 30 min a 55°C (c)).

Els resultats obtinguts a partir de l'HPLC confirmen el que ja s'havia observat en l'anàlisi espectroscòpica. En la figura 4.11A es mostra una barreja d'11-*cis*-retinal en fosc (a) i il·luminat (b) i tot-*trans*-retinal en fosc (c). En les mostres en fosc s'observen 2 temps de retenció diferents; l'11-*cis*-retinal a 14.5 min i 15.8 min en el cas del tot-*trans*-retinal. La mostra il·luminada ens presenta dos pics, un que equival a l'11-*cis*-retinal (14.5 min) i l'altra al 11-*cis*-

retinal il·luminat, és a dir tot-*trans*-retinal, a 15.8 min, causat per que la mostra d'11-*cis*-retinal es troba parcialment il·luminada.

La figura **4.11B** mostra una barreja d'11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal sense tractar (a), 11-*cis*-retinal tractada a 55°C (b) i tot-*trans*-retinal tractat a 55°C (c). En el cromatograma, observem que les mostres sense tractar i les mostres tractades presenten el mateix comportament que els respectius sense tractar. Per tant, l'11-*cis*-retinal i el tot-*trans*-retinal mantenen la seva configuració a 55°C.

La figura **4.11C** mostra el cromatograma d'una barreja d'11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal sense tractar (a), una mostra del retinal extret a partir de rodopsina sense tractar (descriu en l'apartat **III.2.8.**) (b) i mostra del retinal extret que prové de rodopsina tractada i que el seu espectre de diferència correspon al **C** de la figura **4.9**. S'observa que el temps de retenció del retinal extret de rodopsina no tractada correspon al temps de l'11-*cis*-retinal, 14.5 min, mentre que el retinal extret de la mostra de rodopsina tractada a 55°C correspon al temps de retenció del tot-*trans*-retinal, 15.8 min.

Els cromatogrames confirmen el que s'havia observat en les figures **4.9** i **4.10**, és a dir, que l'11-*cis*-retinal tractat durant 1 h a 55°C en solució és més estable que quan es troba unit a la opsina, on s'isomeritza a tot-*trans*-retinal.

Aquests resultats s'expliquen per que l'energia llumínica necessària pel canvi d'isomerització entre l'11-*cis* i el tot-*trans* és molt similar a la energia tèrmica que s'ha proporcionat al sistema per a permetre el mateix efecte (Ala-Laurita *et al.* 2004) i sembla ser que l'energia tèrmica equivalent a 55°C permet la isomerització.

Segons aquests resultats, quan la rodopsina és tractada a 55°C i a mesura que es va desplegant, va provocant el canvi d'11-*cis*-retinal a tot-*trans*-retinal. Això s'explicaria perquè l'acoblament present entre el complex opsina-retinal és màxim de manera que no només canvis en el retinal provoquen canvis conformationals en la proteïna, sinó que a l'inrevés, canvis en la proteïna induïrien la isomerització del retinal. S'han fet treballs que proporcionen més evidències sobre l'acoblament tant fort del cromòfor del retinal i l'opsina i reforça el paper de la interacció específica dels aminoàcids formant part de la butxaca del retinal (Spooner *et al.* 2002.; Creemers *et al.* 2002; Sugihara *et al.* 2002).

IV.1.4.- Efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina

En aquest apartat s'estudia l'efecte del zenc, un ió present en elevades concentracions a la retina, en l'estabilitat de la conformació inactiva i activa de rodopsina purificada i de ROS, la capacitat de la rodopsina il·luminada per tornar a unir-se a retinal i observar si provoca un canvi intern en la proteïna mitjançant el càlcul de la quarta derivada de l'espectre d'absorció que ens determinarà si el zenc produeix un canvi en l'entorn dels aminoàcids aromàtics (vegeu l'apartat **III.2.5.3.1**).

IV.1.4.1.-Estabilitat tèrmica de la forma inactiva de la rodopsina en presència de zenc i d'altres cations.

A partir de l'absorbància a 500 nm (que disminueix al llarg del temps, vegeu figura 4.7) es representen les corbes de desnaturalització en absència o presència de 15 i 50 μM ZnCl_2 (Fig. 4.12).

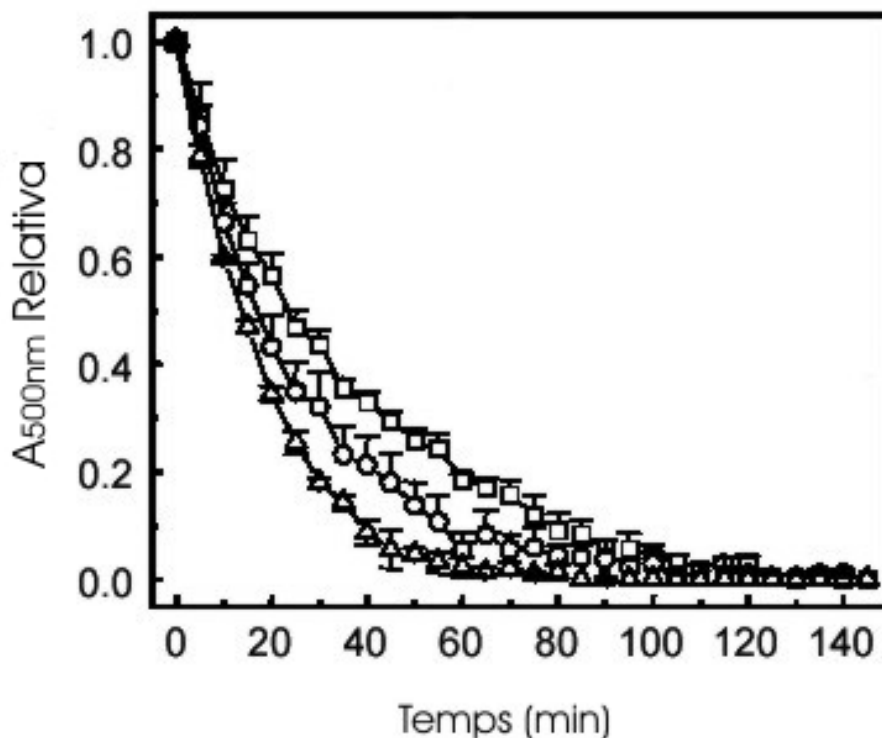


Fig. 4.12: Corba de desnaturalització tèrmica de rodopsina purificada en HEPES 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl_2 2 mM i 0.02%DM en presència de 15 (Δ) i 50 (\circ) μM ZnCl_2 respecte el control sense zenc (\square) a 55°C.

A mesura que s'augmenta la concentració de zenc es produeix un efecte desestabilitzador en la conformació inactiva de rodopsina. Aquest resultat també s'ha observat en una publicació recent en que es treballa amb rodopsines mutants d'RP i on el resultat de la rodopsina *wild type* (WT) a 10 μ M i 50 μ M confirma l'augment de la velocitat de *decay* en experiments realitzats en presència de zenc (Stojanovic *et al.* 2004).

Per tal de comprovar si aquest efecte s'observa només en presència de zenc, es realitza el mateix assaig en presència d'altres cations que formen part del grup dels elements de transició dins de la taula periòdica (tals com el cadmi, el cobalt i el coure), el calci i la colina. Aquest darrer és per descartar l'efecte de la càrrega. Aquests cations ja s'havien utilitzat anteriorment en rodopsina per estudiar la seva competència respecte el zenc (Schuster *et al.*, 1992). Els resultats obtinguts es representen en la figura 4.13.

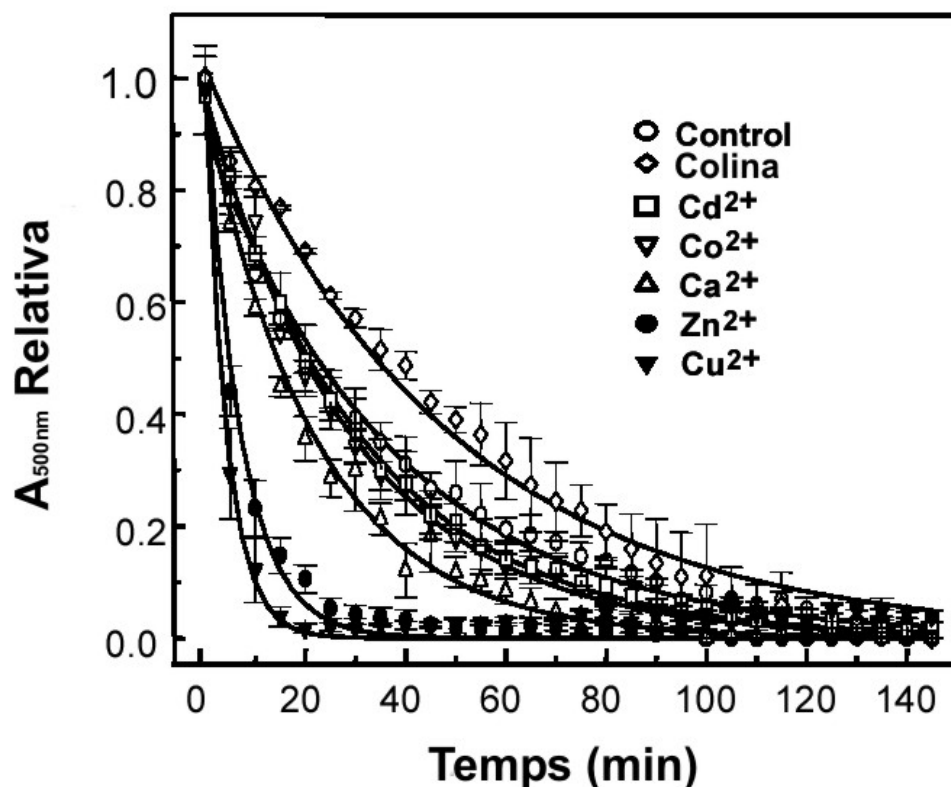


Fig. 4.13: Corba de desnaturalització tèrmica a 55°C de rodopsina purificada en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM en presència dels diferents cations a 50 μ M.

Segons els resultats obtinguts, es confirma que l'efecte inestabilitzador del zenc és específic si es pren com a excepció el resultat del coure, un catió que s'ha

observat que competeix amb el zenc per la unió de rodopsina (Schuster *et al.*, 1992). El calci, cadmi o cobalt provoquen un efecte similar al de la proteïna en absència de cations i en el cas de la colina, sembla que hi ha un augment de l'estabilitat al llarg del temps, a causa de la seva condició de component de les membranes que estabilitzarien a la rodopsina dins les micel·les. Paral·lelament es comprova si aquest resultat obtingut en rodopsina purificada, on les condicions no són naturals, s'observa amb rodopsina en les membranes de ROS (Fig. 4.14).

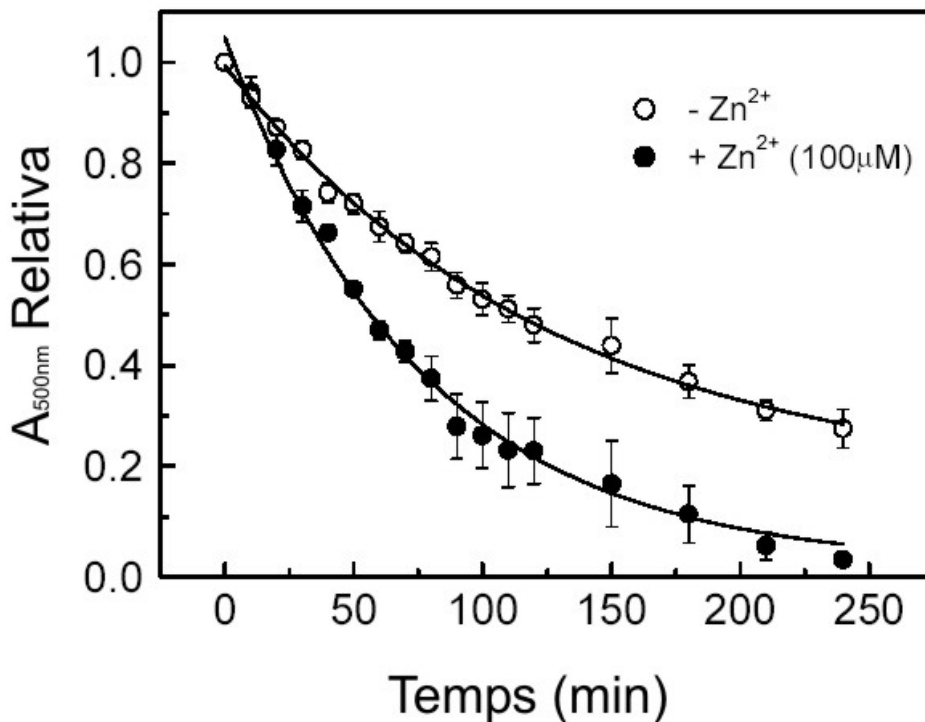


Fig. 4.14: Estabilitat tèrmica de rodopsina de membranes de ROS en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM en absència i presència de zenc a 55°C.

Aquests resultats mostren que una mostra de ROS en membranes presenta el mateix comportament que una de rodopsina purificada i en detergent ja que el zenc augmenta la velocitat de desnaturalització tèrmica de la rodopsina.

IV.1.4.2.-Determinació dels paràmetres termodinàmics de la rodopsina en presència de zenc

En aquest apartat es calculen els paràmetres termodinàmics del procés de desnaturalització tèrmica de rodopsina purificada en presència i absència de 50

μM de zenc mitjançant el gràfic d'Arrhenius per estudiar quins paràmetres energètics canvien i relacionar-los amb canvis en la conformació de la rodopsina entre ambdues condicions (Fig. 4.15).

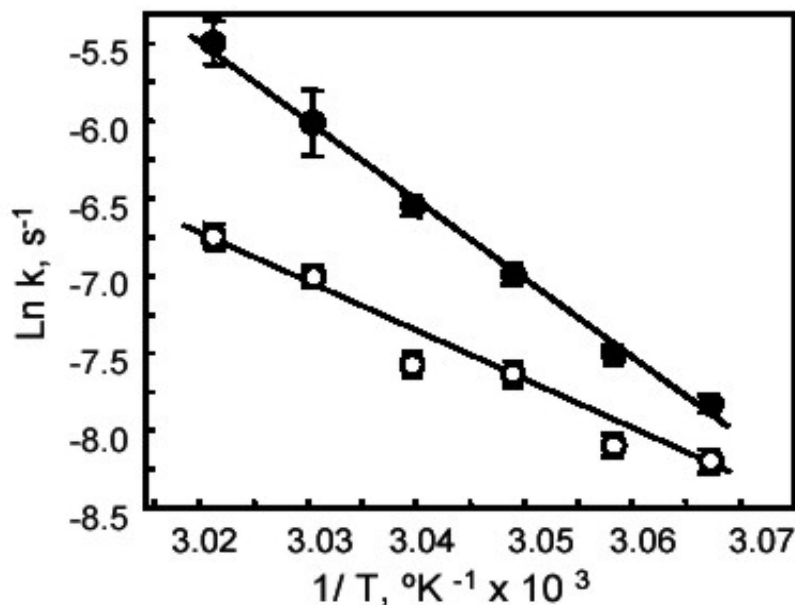


Fig. 4.15: Gràfic d'Arrhenius de la desnaturalització tèrmica de rodopsina purificada en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl_2 2 mM i 0.02%DM en presència de 50 μM (●) i absència de zenc (○).

Considerant que els valors de constant de velocitat (k) alts corresponen a menys estabilitat per part de la proteïna, aquests resultats confirmen que la proteïna control és més estable que en presència de zenc a 50 μM . A partir del valor de k i seguint les fórmules definides en la taula 3.3 es calculen els paràmetres termodinàmics d' E_a , ΔH , ΔG i ΔS , (taula 4.5).

Paràmetre	Absència de Zenc	Presència de Zenc (50 μM)
d' E_a	99.09 ± 0.06	156.18 ± 0.20
ΔH	98.44 ± 0.05	155.53 ± 0.19
ΔG	5.74 ± 0.03	4.77 ± 0.04
$\Delta S(10^{-3})$	282.62 ± 0.06	460.00 ± 0.09

Taula 4.5. Paràmetres termodinàmics de rodopsina purificada en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl_2 2 mM i 0.02%DM. Les unitats són en Kcal/mol.

Aquests paràmetres confirmen que veritablement el zinc desestabilitza la proteïna. Ens mostra que l'entropia (ΔS) del sistema augmenta, com també augmenta l'energia d'activació (E_a) i l'entalpia (ΔH). Aquest resultat podria reflectir una reorganització de les aigües de l'interior de la rodopsina, tal i com s'ha vist en el D2-like-receptor de la dopamina (Schetz i Sibley, 1999).

IV.1.4.3.-Regeneració de la rodopsina en presència de diferents concentracions de zinc

En aquest assaig s'estudia l'efecte del zinc en la capacitat de la rodopsina per captar 11-*cis*-retinal afegit exògenament un cop ha estat il·luminada. Seguint l'augment d'absorbància a 500 nm respecte el temps en presència de diferents concentracions de zinc, s'obté el gràfic de la figura 4.16.

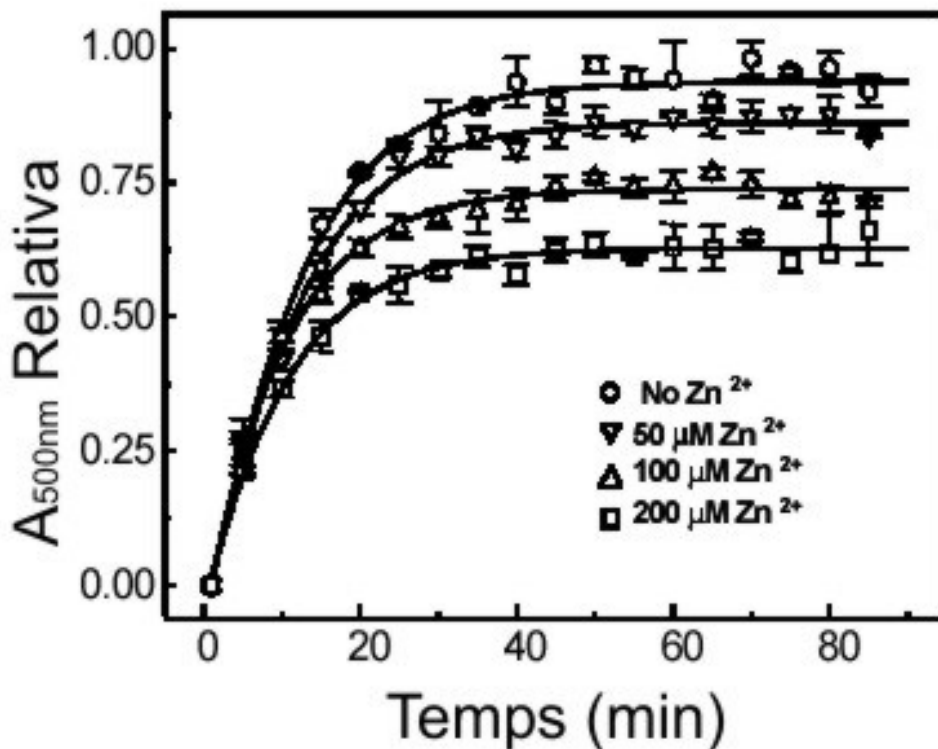


Fig. 4.16: Regeneració de rodopsina purificada de ROS en HEPES 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02% DM i en presència de diferents concentracions de zinc.

En aquest resultat es pot observar com el zinc influeix negativament en la regeneració de la proteïna, una concentració de zinc 200 µM en produeix una disminució de fins el 30%.

S'ha proposat una possible via d'entrada de l'11-*cis*-retinal a rodopsina que es troba entre els aminoàcids N315, C316 i T319 (que pertanyen a la 8ena hèlix) i K325, N326, L328 i G329 (que pertanyen al extrem C-terminal) (Schädel *et al.* 2003 i Heck *et al.* 2003b). Aquesta regió també s'ha estudiat com a un punt d'unió extern del zinc en rodopsina i en el que s'ha postulat que podria ser un punt inestabilitzador (Stojanovic *et al.*, 2004). Així doncs, la presència del zinc en aquest punt podria dificultar l'entrada del retinal i per tant la regeneració de rodopsina. Tot i així cal considerar l'efecte negatiu que produeix el catió en l'estabilitat de la rodopsina i que contribuiria també a afectar a la unió del retinal a l'opsina .

Paral·lelament, es comprova que aquest efecte s'observa també en membranes de ROS (Fig. 4.17).

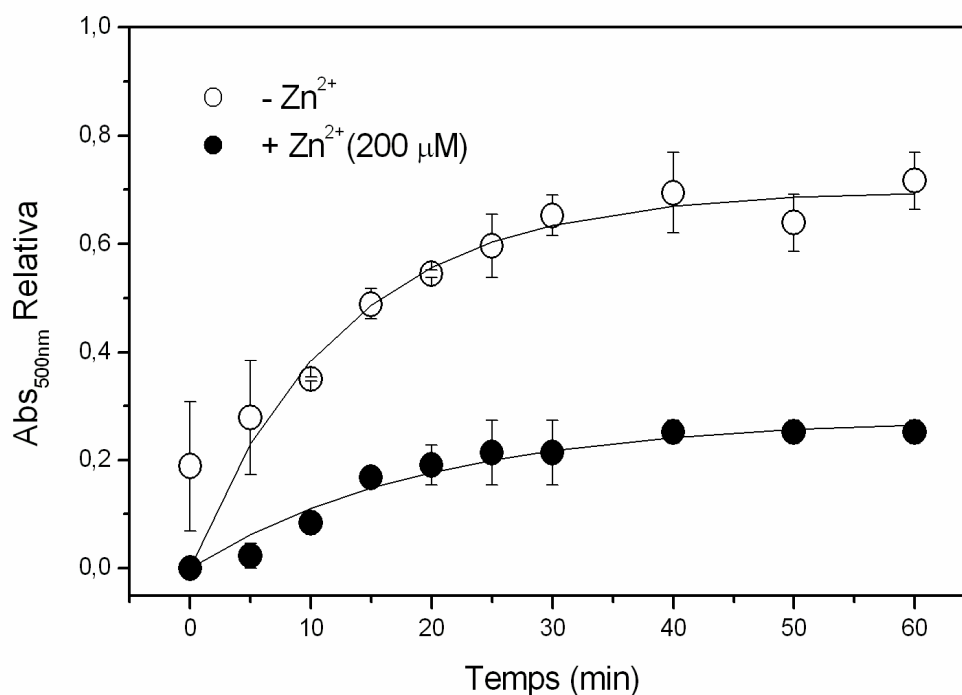


Fig. 4.17: Regeneració de rodopsina en membranes de ROS en HEPES 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM en presència i absència de zinc.

En aquest assaig s'observa l'efecte del zinc que succeïa en l'apartat anterior a on s'utilitzava rodopsina purificada i en detergent. Per tant confirmaria que en

condicions natives el zenc també disminueix la capacitat de l'opsina per captar el retinal.

IV.1.4.4.-Formació de la Meta III en presència de zenc

La MetaIII és un intermediari del procés d'activació de rodopsina que darrerament s'ha proposat com a ser un estadi d'emmagatzematge de rodopsina no activa i encara unida a tot-*trans*-retinal (Heck *et al.* 2003). Aquest intermediari presenta un màxim d'absorbància a 465 nm. En l'assaig de determinació de la MetaIII es mesura l'absorbància a aquesta longitud respecte el temps en diferents concentracions de zenc i s'obté el resultat que es mostra en la figura 4.18.

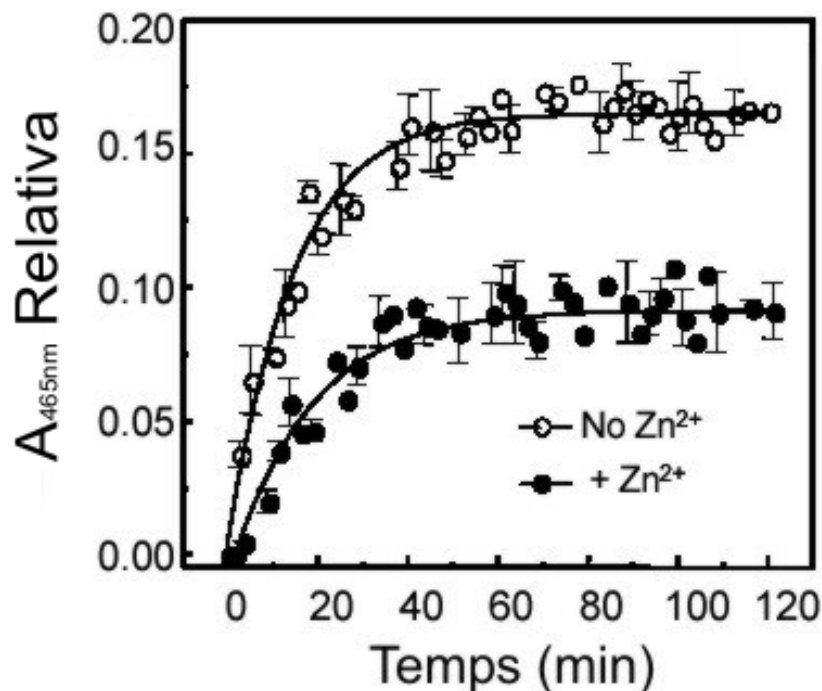


Fig. 4.18: Formació de la MetaIII en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM en presència i absència de zenc.

El zenc redueix la formació de l'estadi MetaIII, això s'explicaria per que tal i com s'ha observat anteriorment, el catió desestabilitza a la proteïna en la seva conformació inactiva, aquest fet provocaria que els intermediaris de la via de fotoactivació també siguin més inestables i per tant el zenc afecti negativament a la formació de MetaIII.

IV.1.4.5.-Efecte del zenc en l'entorn dels aminoàcids aromàtics de la rodopsina a partir de l'espectrofotometria de quarta derivada.

Aquest experiment es basa en la utilització de la quarta derivada dels espectres d'absorció per separar les components electròniques corresponents als aminoàcids aromàtics i que ens permetrà estudiar els canvis en l'entorn d'aquests aminoàcids.

En aquest cas s'han utilitzat mostres de rodopsina en presència i absència de zenc per estudiar que succeeix en els aminoàcids aromàtics. Els espectres de quarta derivada es mostren en la figura 4.19.

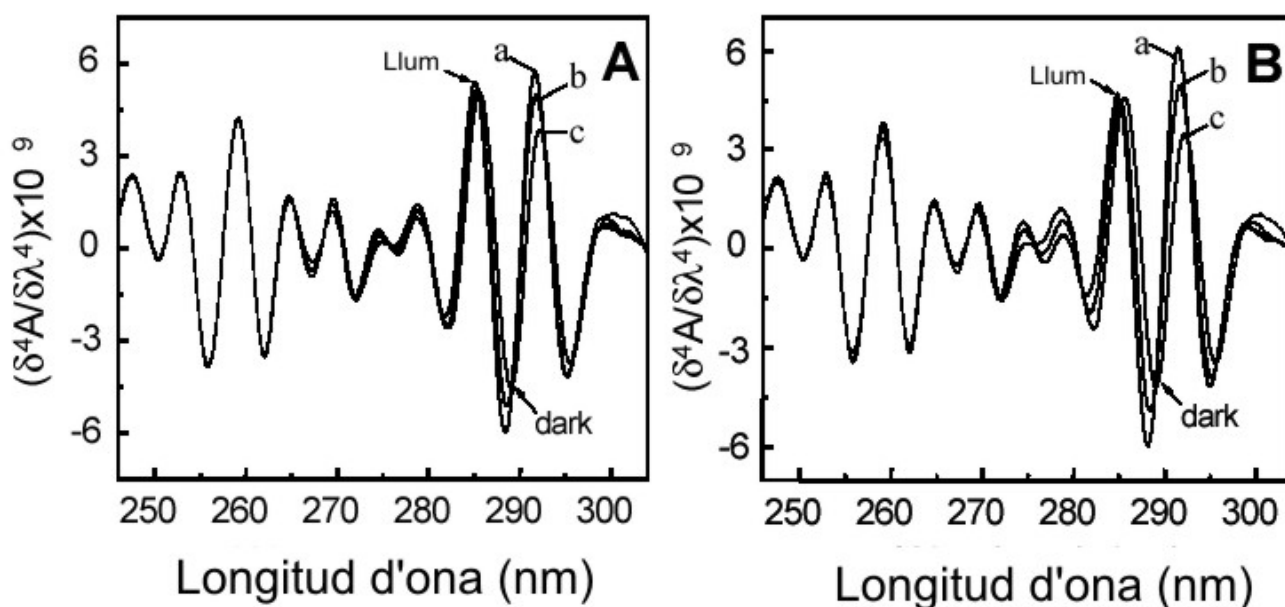


Fig. 4.19: Espectres de la quarta derivada de rodopsina en 20 mM Hepes (pH 7.4), 145 M NaCl, 2 mM MgCl₂ i 0.02%DM en absència (A) i presència de zenc (200 μM) (B). a) correspon a la mostra en fosc i b) i c) a les mostres il·luminada. La mostra c) correspon a 9 hores després de la il·luminació.

Cadascun dels màxims i mínims d'aquests espectres corresponen als aminoàcids aromàtics Trp, Phe i Tyr (del Valle *et al.*, 2002; Anzenbacherova *et al.*, 2000; Duñach *et al.*, 1983; Lange *et al.* 1996). Aquests es mostren de manera esquemàtica en la figura 4.20.

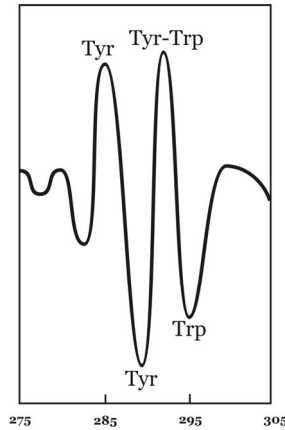


Fig. 4.20: Esquema d'un espectre de quarta derivada on es marquen els màxims i mínims que corresponen a cadascun dels aminoàcids aromàtics.

A partir dels espectres de quarta derivada de la figura 4.19 es pot determinar quin aminoàcid correspon a cada pic de longitud d'ona. Els resultats es presenten en la taula 4.6.

λ (nm)	Control				Zenc		
	Foscor	Llum	$\Delta\lambda$		Foscor	Llum	$\Delta\lambda$
$\lambda_{\text{màx Tyr}}$	285.6	285.1	0.5		285.6	284.8	0.8
$\lambda_{\text{mín Tyr}}$	289.0	288.4	0.6		289.0	288.1	0.9
$\lambda_{\text{màx Tyr-Trp}}$	292.2	291.7	0.5		292.2	291.5	0.7
$\lambda_{\text{mín Trp}}$	295.5	295.1	0.4		295.5	294.9	0.6

Taula 4.6. Longituds d'ona dels màxims i mínims de la quarta derivada de rodopsina en Hepes 20 mM (pH 7.4), NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM en presència i absència de zenc (200 μ M).

Els resultats control mostren que en llum hi ha un canvi en el pic màxim de tots els aminoàcids aromàtics cap a longituds d'ones inferiors quan s'il·lumina la proteïna. Aquest fet es pot interpretar per l'exposició de Tyr i Trp cap a entorns més hidrofílics en el procés de fotoactivació, que ja s'havia observat anteriorment en mutants de rodopsina de Trp (Lin i Sakmar, 1996).

Aquest efecte es veu més augmentat en presència de zenc on el canvi de longitud en foscor respecte la rodopsina il·luminada suggereix que el catió s'uneix de forma diferencial, és a dir, que en foscor s'uneix a uns punts i un cop il·luminada

afavoreix la unió de més àtoms de zenc a la proteïna, possiblement per l'exposició de nous punts d'unió de zenc.

IV.1.4.6.-Efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina i dels seus fotointermediaris

El zenc s'ha observat que presenta funcions molt importants en l'organisme i particularment en la retina (Grahn *et al.*, 2001). En l'organisme, promou l'agregació del pèptid priònic altament fibril·logènic (Jobling *et al.*, 2001) i de la proteïna β -amieloide (Atwood, *et al.*, 1998). A més a més el zenc pot actuar de modulador al·lostèric en d'altres membres de la superfamília de GPCR, tals com el receptor de la dopamina (Schetz i Sibley, 1997), de la quemoquina (Gerlach *et al.*, 2003), de la melanocortina (Holst i Schwartz, 2003) i del β_2 -adrenèrgic (Swaminath *et al.*, 2003).

Més concretament en la rodopsina, en estudis anteriors s'ha observat que el zenc s'uneix a rodopsina purificada i que n'augmenta la seva fosforilació (Shuster *et al.*, 1992 i Shuster *et al.*, 1996), a més a més s'ha trobat unit en l'estructura tridimensional de la rodopsina (Palczewski *et al.*, 2000) i s'han postulat quatre punts d'unió de zenc (Stojanovic *et al.*, 2004). En aquest darrer treball, els autors proposen que la rodopsina té quatre punts d'unió al zenc, tres d'ells són externs; al voltant de la H195, un altre a la tercera nansa intradiscal i l'altra entre els aminoàcids 311 i 327, a la vuitena hèlix, a la part citoplasmàtica. Aquest punts serien inestabilitzadors de la proteïna com ho demostren amb els seus resultats amb rodopsines recombinants. El mateix efecte s'observen en els nostres resultats realitzats amb rodopsina purificada de ROS i rodopsina en membranes. Per tant sembla que el zenc s'uneix a aquests punts externs i en disminueix la seva estabilitat.

Els resultats d'estabilitat tèrmica, regeneració del cromòfor i el càlcul dels paràmetres termodinàmics es complementen. Una baixa estabilitat tèrmica si es compara respecte l'absència de zenc, lligat a una disminució de la regeneració i un augment d'entropia i d'entalpia així com d'energia d'activació del sistema mostren que aquest catió no afavoreix a l'estabilitat de la proteïna en les nostres condicions d'estudi. Paràmetres termodinàmics determinats en la unió del zenc pel D2-like-receptor de la dopamina suggereixen que variacions en l'entropia

són degudes a un reordenament dels ponts d'hidrogen (Schetz i Sibley, 1999). En rodopsina aquest reordenament es produiria en les molècules d'aigua, que tenen un paper funcional en la proteïna (Okada *et al.*, 2002).

Hem vist que el zenc inestabilitza a la proteïna i a la vegada se sap que la rodopsina és important per a la viabilitat de ROS i dels bastons de la retina (Humphries *et al.*, 1997 i Liang *et al.* 2004). Perquè doncs s'utilitza el zenc en la teràpia de malalties degeneratives de la retina, com l'RP (Berson, 2000)? Aquesta aparent contradicció podria explicar-se perquè el catió està al interior de la proteïna per a estabilitzar-la (Stojanovic *et al.*, 2004), i per tant que s'uneix mentre la rodopsina s'està sintetitzant. Tot i així s'ha de considerar que l'RP és una malaltia heterogènia i que el zenc administrat en la teràpia pot actuar en d'altres regions.

IV.2.-Efecte de mutacions en l'estabilitat de la rodopsina.

Un cop estudiats diversos factors que poden alterar l'estabilitat de la rodopsina nativa, s'han construït, expressat i purificat mutants de rodopsina per a veure com afecten canvis puntuals a l'estabilitat i la conformació de la proteïna.

Per una banda, s'han escollit mutacions que estan associades a malalties de la retina i per una altra, mutacions que estan implicades en la xarxa iònica present entre la part citoplasmàtica de les hèlixes 3 i 6.

IV.2.1.-Mutacions associades a malalties de la retina

IV.2.1.1.-Mutació L46R associada a l'RP

L46 és un aminoàcid que es localitza en la primera hèlix de la rodopsina orientat cap a la membrana lipídica. S'ha detectat la mutació L46R com a causant d'una forma severa d'RP (Rodriguez *et al.*, 1993) i encara no ha estat caracteritzada. En aquest treball es vol estudiar quin efecte provoca aquesta mutació en la proteïna i aportar més informació sobre el mecanisme molecular amb la malaltia. Prèviament s'han descrit d'altres mutacions associades a l'RP en aquesta primera hèlix; com M44T (Andrés *et al.*, 2003), F45L (Sung *et al.*, 1991; Kaushal i Khorana, 1994), G51A, G51V i G51R (Kaushal i Khorana, 1994; Hwa *et*

al., 1997 ; Bosch *et al.*, 2003), P53R (Kaushal i Khorana, 1994) i T58R (Sung *et al.*, 1991; Kaushal i Khorana, 1994).

IV.2.1.1.1.-Construcció del mutant L46R per mutagènesi dirigida

S'ha construït el mutant L46R seguint el procediment descrit en l'apartat **III.2.3.1.** i s'ha digerit el DNA obtingut per tal de comprovar la presència d'opsina mitjançant electroforesi de gel d'agarosa. El gel obtingut es mostra en la figura **4.21**, a on la banda corresponent a l'opsina (1059 parells de bases (pb)) està una mica per sobre de la banda de 1000 pb del patró de PM.

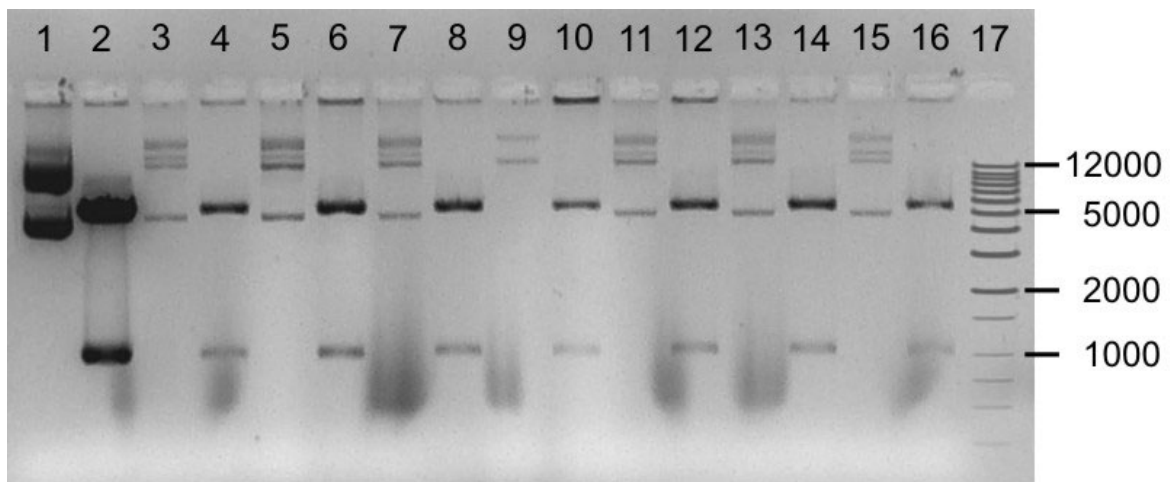


Fig. **4.21**: Gel d'agarosa a l'1% de comprovació de la digestió del possible DNA L46R purificat a partir de les colònies DH5α. 1) control sense digerir; 2) control digerit; 3), 5), 7), 9), 11), 13) i 15) colònies 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sense digerir; 4), 6), 8), 10), 12), 14), 16) colònies 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 digerit; 17) marcador de PM.

Per seqüenciació es va comprovar la mutació i el resultat es mostra en la figura **4.22**.

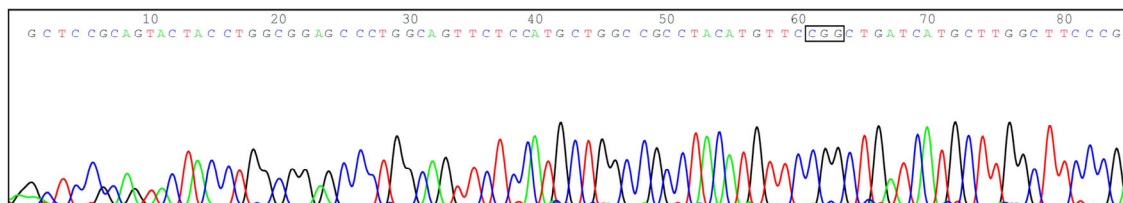


Fig. **4.22**: Cromatograma de la seqüència del mutant senzill L46R. En el requadre es mostra el codó que codifica per R46.

IV.2.1.1.2.-Anàlisi espectroscòpica del mutant L46R

S'ha expressat i purificat el mutant de rodopsina L46R juntament amb el WT seguint les condicions descrites en l'apartat **III.2.4.** i s'han obtingut els espectres de la figura **4.23.**

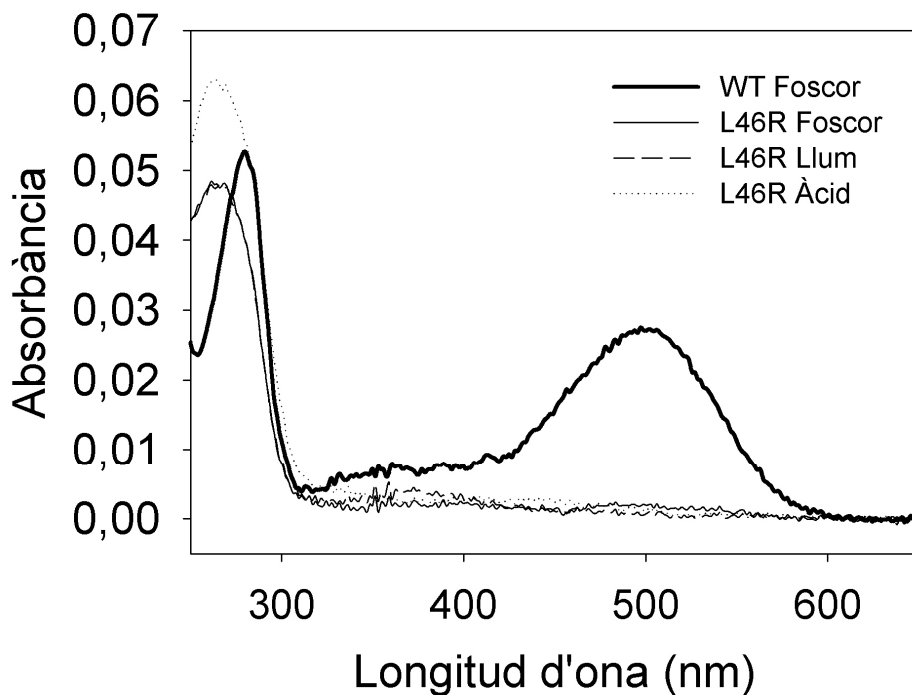


Fig. **4.23:** Espectres de WT i L46R en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM en foscó, il·luminat i posterior acidificació amb H_2SO_4 2N a 20°C.

En aquest espectre s'observa que la rodopsina L46R no regenera correctament amb el 11-cis-retinal, demostrat per la poca absorbància a 500 nm respecte la proteïna WT. Una ampliació d'aquest espectre ens permet comprovar realment que la banda a 500 nm correspon a la proteïna i no a un artefacte de l'espectre, per això la rodopsina s'ha il·luminat i acidificat (Fig. **4.24.**).

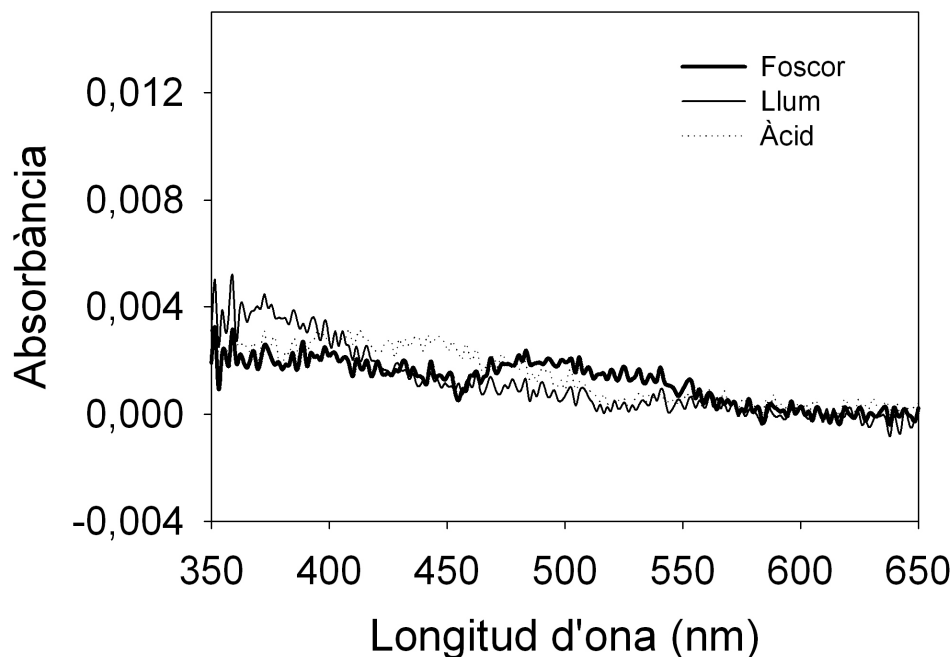


Fig. 4.24: Ampliació dels espectres de L46R en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM en fosc, il·luminat i posterior acidificació amb H_2SO_4 2N a 20°C.

En els anteriors espectres, es mostra rodopsina purificada en un tampó d'elevada força iònica, que ens permet eluir tant rodopsina com opsina (Garriga *et al.*, 1996). Donada la baixa absorbància a 500 nm, la il·luminació i acidificació de la mostra ens permet descartar que sigui deguda a soroll de fons del espectre. El mutant L46R s'obté majoritàriament en forma d'opsina que és el causant d'una relació A280/A500 tant alta (vegeu taula 4.7).

Rodopsina	A500nm	Ratio A280/A500
WT	0.027	1.9
L46R	0.0018	23.5

Taula 4.7: Absorbància a $\lambda=500\text{nm}$ i *ratio* A280nm/A500nm de rodopsina WT i L46R en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM en fosc.

La poca absorbància de L46R a 500nm pot ser deguda a diverses causes, o bé per que la proteïna és inestable i se'n sintetitza en poca quantitat o bé perquè la proteïna no uneix correctament l' 11-*cis*-retinal a causa d'un malplegament de la proteïna (Sung *et al.*, 1991).

Per tal de comprovar si aquesta proteïna presenta problemes de síntesi des d'un principi, es determina el valor d'absorbància a 280nm, la banda que correspondria a la proteïna unida i no unida a 11-*cis*-retinal. En aquest cas, s'observa que l'absorbància a $\lambda=280$ nm en la figura **4.23** del mutant, és similar a la WT, per tant la proteïna s'expressa igual que la proteïna WT i que el problema es troba en el plegament i la unió a 11-*cis*-retinal. Per estudiar-ho, es varen analitzar membranes de cèl·lules COS-1 per electroforesis SDS-PAGE i per *western-blot*.

IV.2.1.1.3.-Electroforesi de SDS-PAGE, electrotransferència de proteïnes i tinció en plata de membranes de COS-1 transfectades amb DNA L46R i WT

Membranes de COS-1 transfectades amb DNA L46R (que anomenarem a partir d'ara membranes L46R), es varen carregar en un gel SDS-PAGE i posteriorment es va realitzar l'electrotransferència de proteïnes i detecció immuno específica (*western-blot*) i tinció de plata, seguint els protocols descrits en l'apartat **III.2.7**. El gel tenyit en plata i la membrana de nitrocel·lulosa es mostren en les figures **4.25** i **4.26**.

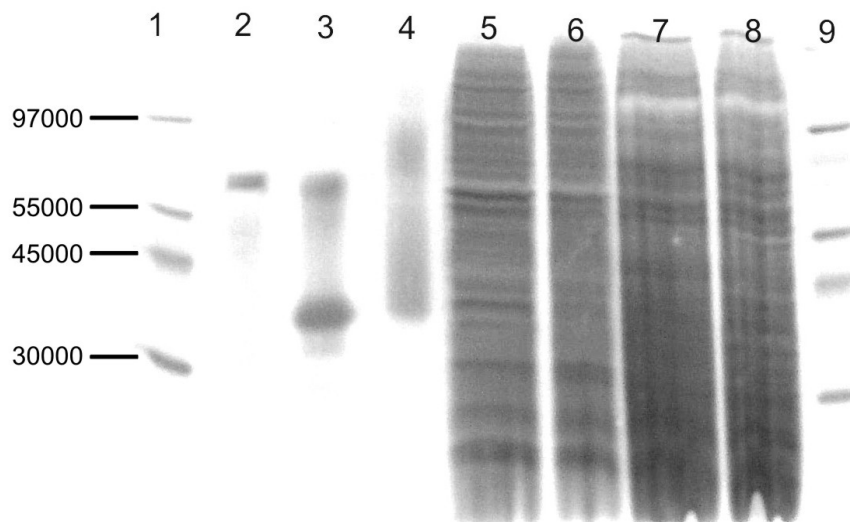


Fig. **4.25**: Gel de SDS-PAGE tenyit en plata de les mostres de membrana de cèl·lules COS-1 transfectades amb DNA d'opsina WT i L46R. 1) i 9) marcador de PM; 2) BSA (0.5 μ g); 3) rodopsina purificada de ROS; 4) rodopsina WT purificada; 5) interior cel·lular WT; 6) interior cel·lular L46R; 7) membranes de WT; 8) membranes de L46R.

En el gel tenyit amb plata, es poden determinar quines són les bandes de rodopsina (entre les bandes de 45000 Da i 30000 Da del marcador de PM) i del dímer (66000 Da, que correspon a la mateixa banda d'albumina) en la mostra de rodopsina purificada de ROS (carril 3), que s'utilitzarà com a referència per a determinar la banda de rodopsina en el *western* (Fig. 4.26). En la mostra de WT purificat (carril 4) s'observa el *smear* característic que presenta la proteïna expressada per COS-1 degut a que aquestes cèl·lules glicosilen a la rodopsina de manera diferent a com ho fan les cèl·lules fotoreceptores (Oprian *et al.*, 1987).

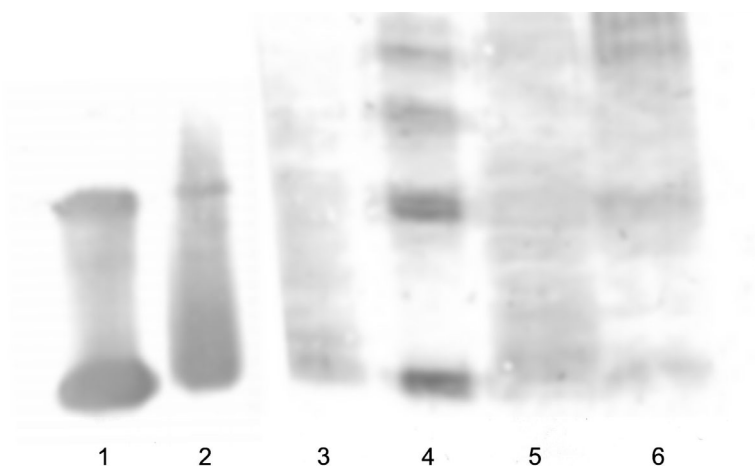


Fig. 4.26: Membrana de nitrocel·lulosa de la membrana de cèl·lules COS-1 transfectades amb DNA d'opsina- L46R i WT. 1) rodopsina purificada de ROS, 2) WT purificat, 3) interior cel·lular WT, 4) interior cel·lular L46R, 5) membranes WT i 6) membranes L46R.

En la mostra de membranes de L46R (carril 6) del *western* (Fig. 4.26) destaquen dues bandes discretes, una que correspon a rodopsina (a l'entorn de 40000 Da) i l'altra, a l'entorn de 66000 Da, que correspondria al dímer si es compara amb el carril 1 de la mostra de rodopsina de ROS i en el gel de tinció en plata (Fig. 4.25). Si en canvi, s'observa el carril de les membranes WT (carril 5), es detecta el *smear* de bandes, ja observat en el gel de plata, i que no mostra el mutant L46R, degut a que el mutant presenta un diferent patró de glicosilació. Aquest comportament ja s'havia detectat en d'altres mutants que desencadenen RP, com el T58H, de la mateixa hèlix (Sung *et al.*, 1991) i estaria associat al malplegament (*misfolding*) de l'opsina. Les mostres d'interior cel·lular fan referència a la part de les cèl·lules que no són membranes. La finalitat d'aquesta mostra és controlar el procés de preparació de membranes i observar si queda

proteïna en els orgànuls intracel·lulars. En aquest cas observem que en les cèl·lules transfectades amb L46R ha quedat molta proteïna en l'interior de cèl·lula (carril 4), per tant la proteïna és inestable i majoritàriament no arriba a la membrana de la cèl·lula, com si succeeix en la proteïna WT (carril 3).

IV.2.1.1.4.-Efecte de la mutació L46R en l'estabilitat de la rodopsina i la seva implicació en el mecanisme molecular que causa l'RP

Els resultats mostren que aquest mutant té un patró de glicosilació diferent que el WT i es troba majoritàriament a l'interior de la cèl·lula si es compara amb el WT, per tant s'englobaria dins els mutants de tipus II segons Sung (Sung *et al.*, 1991) i Doi (Doi *et al.*, 1990). Els mutants classificats com a tipus II es caracteritzarien per presentar un patró de glicosilació diferent i una menor distribució en la membrana cel·lular respecte a l'interior del reticle endoplasmàtic. Per tant R46 és un aminoàcid que desestabilitza a la proteïna impedit que majoritàriament arribi a la membrana. Això s'explicaria per que aquest canvi de Leu, que és apolar, a Arg que està carregada positivament i té més volum, provocaria distorsions en la membrana que repercutirien en l'estabilitat de la proteïna impedit la formació del cromòfor i que també podria afectar a la formació del dímer. En experiments teòrics basats en l'estructura primària, anàlisi n-grams, que matemàticament estableix una relació entre la seqüència i l'estructura de les proteïnes, s'ha observat que L46R provoca un canvi important en l'estructura secundària de la rodopsina (Bosch L., Klein-Seetharaman J. i Garriga P., resultat no publicats).

Tot i que l'hèlix 1 ha estat des de sempre poc considerada i no se li han atribuït funcions importants és la que té més quantitat de mutacions causants d'RP autosòmica dominant, a excepció de l'hèlix 3 (Abdulaev, 2003). L'hèlix 1 i 2 són molt importants perquè contenen un gran nombre de Pro i Gly que formen part d'un cinturó que s'expandeix al llarg del domini transmembrana i a més a més entre elles existeix una unió molt estreta a causa del parell iònic N55 i D83 i múltiples contactes hidrofòbics. Recentment s'ha aportat nova informació d'aquestes hèlices on s'explicaria la importància que tindrien en la rodopsina (Bosch *et al.*, 2003 i Abdulaev, 2003). En el cas del mutant L46R al estar

encarat cap a la membrana crea una distorsió que remarcaria la importància de l'hèlix 1 per a la correcta organització estructural de la proteïna.

IV.2.1.2.-Mutació de la rodopsina associada a la CNC T94I i altres mutacions en la posició 94

T94 es localitza a la butxaca del retinal i es vol observar quin efecte produeix en rodopsina la mutació de CNC, T94I i contribuir a desxifrar el mecanisme molecular que desencadena la malaltia (Al-Jandal *et al.*, 1999). Per això, s'han construït i caracteritzat els mutants de rodopsina T94I, T94D, T94S i T94K per tal d'estudiar la importància de la mutació T94I en rodopsina i en general la posició 94 en la proteïna. La mutació T94S implica un canvi conservatiu, la T94D és un canvi per mimetitzar els altres mutants de CNC coneguts fins al moment, G90D i A292E (Rao *et al.*, 1994 i Dryja *et al.*, 1994) i T94K és un canvi que contraresta la càrrega de la base de Schiff (vegeu apartat **I.3.1**).

IV.2.1.2.1.- Caracterització espectroscòpica de T94I, T94S, T94K i T94D

Un cop construïts els mutants i purificats (com es descriu en **III.2.4.**), s'han realitzat els espectres de cada mutant (Fig. **4.27**).

Aquests espectres mostren que el T94S, T94D presenten un comportament espectroscòpic similar al WT, amb lleugers desplaçaments de la banda de 500 nm cap a longituds d'ones inferiors (taula **4.8**). En el cas de T94K en canvi s'observa que rodopsina no regenera amb 11-*cis*-retinal per que no s'observa pic d'absorció a 500 nm. En el mutant T94I s'observa un desplaçament en la longitud d'ona de gairebé 20 nm respecte la proteïna WT (taula **4.8**).

Les elucions I i II es realitzen a elevada o baixa força iònica respectivament i ens mostrarien que l'opsina T94K té problemes de plegament i per aquest motiu no pot unir el retinal a causa del volum i la càrrega de la Lys. En els altres casos en canvi no s'observen problemes de regeneració per que tots mantenen una *ratio* similar al WT (taula **4.8**).

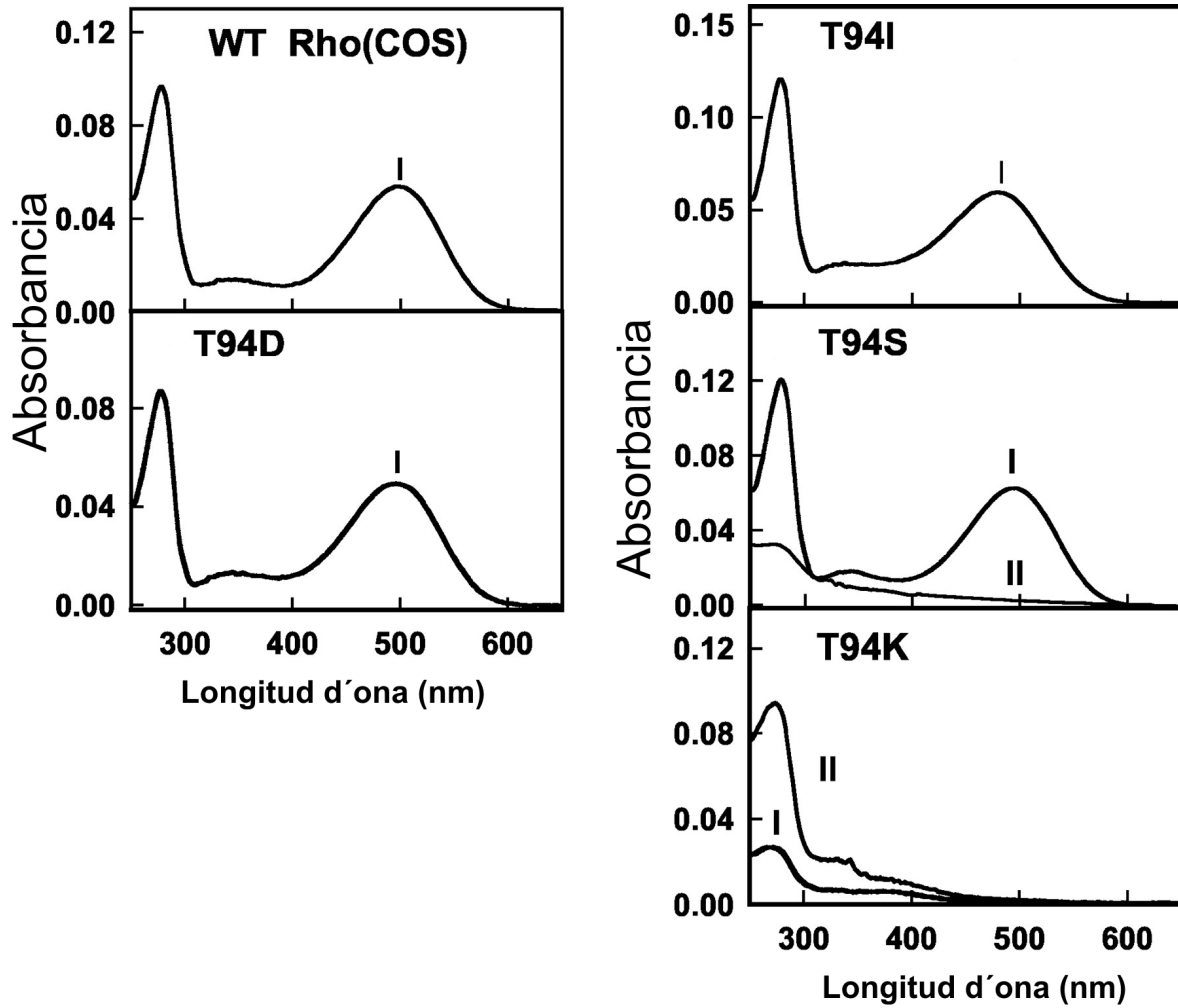


Fig. 4.27: Espectres d'absorció de rodopsina WT, T94I, T94D, T94K i T94S en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM (I) o Na_2HPO_4 2mM pH=6 i 0.05% DM (II) a 20°C.

Rodopsina	$\lambda_{\text{màx}}(\text{nm})$	A280/A500
WT	500	1.8
T94D	496	1.7
T94I	482	2
T94K	---	--
T94S	494	1.9

Taula 4.8: Longitud d'ona d'absorbància màxima de les rodopsines WT, T94D, T94I, T94K i T94S en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM.

Els comportament enfront la il·luminació dels mutants que s'han pogut regenerar es mostren en la figura 4.28.

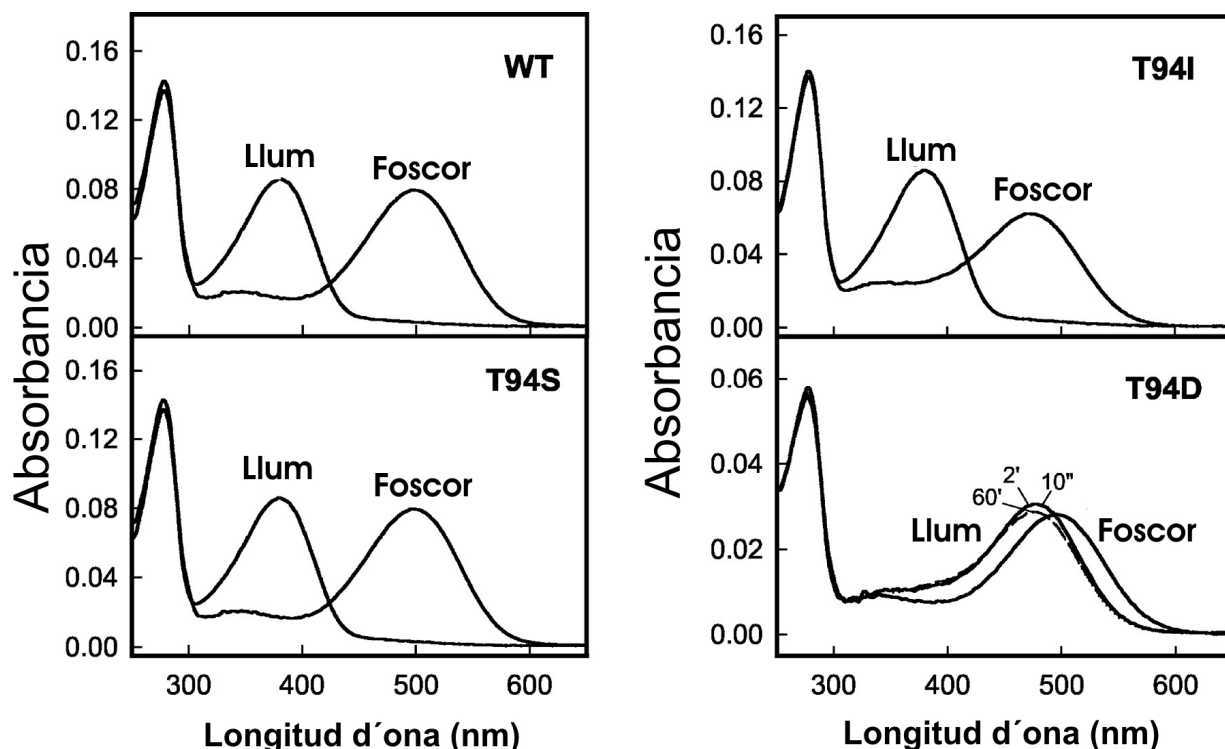


Fig. 4.28: Espectres d'il·luminació de rodopsina WT, T94I, T94S i T94D en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a $\text{pH}=7.2$ i 0.05%DM a 20°C .

En aquest cas observem que tot i el desplaçament observat en l'espectre de T94I en fosc, un cop il·luminat el màxim d'absorbància és a 380 nm, similar a WT i T94S. En canvi, el cas de la T94D un cop il·luminat en comptes de donar la longitud d'ona a 380 nm com succeeix en el WT, la longitud d'ona es desplaça només fins a 465 nm. Aquest fenomen també s'havia observat en el cas d'altres mutacions en rodopsina com el G90D que provoca la CNC (Rao *et al.* 1994) o el G51V de l'RP (Bosch *et al.* 2003) on es postula que aquest màxim d'absorbància al entorn de 465 nm pugui correspondre a l'estadi MetaIII, fent que la rodopsina estigui en forma de reservori i per tant no funcional, el que explicaria un possible mecanisme molecular de la malaltia que desencadena. També s'ha descrit que un cop il·luminats altres mutants com el Y268F i Y192F, que es localitzen a l'entorn de la butxaca del retinal, també presenten aquest comportament. Els autors ho expliquen perquè quan el 11-*cis*-retinal capta la

llum, per impediments estèrics no acaba de isomeritzar-se a tot-trans-retinal (Janz i Farrens, 2004).

Aquest comportaments confirmen que la posició T94 és propera a la butxaca del retinal i a més a més juga un paper important en l'estabilització de la base de Schiff (Janz i Farrens, 2004). L'estudi espectroscòpic de la mutació de la CNC, T94I ens mostra que en foscor hi ha un desplaçament en la longitud d'ona respecte el WT provocat pel canvi d'un aminoàcid polar com és la Thr a un aminoàcid apolar com és la Ile. S'ha observat que en aquesta regió hi ha la presència d'una molècula d'aigua i el canvi d'un aminoàcid polar a un apolar en un entorn hidrofílic causaria canvis en l'entorn de l'11-cis-retinal provocant el canvi de la longitud d'ona (Buss *et al.* 2002).

IV.2.1.2.2.- Estabilitat tèrmica dels mutants en posició 94

En aquest experiment es segueix l'estabilitat dels mutants de la posició 94 a 37°C mesurant el màxim d'absorbància a diferents temps. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 4.29.

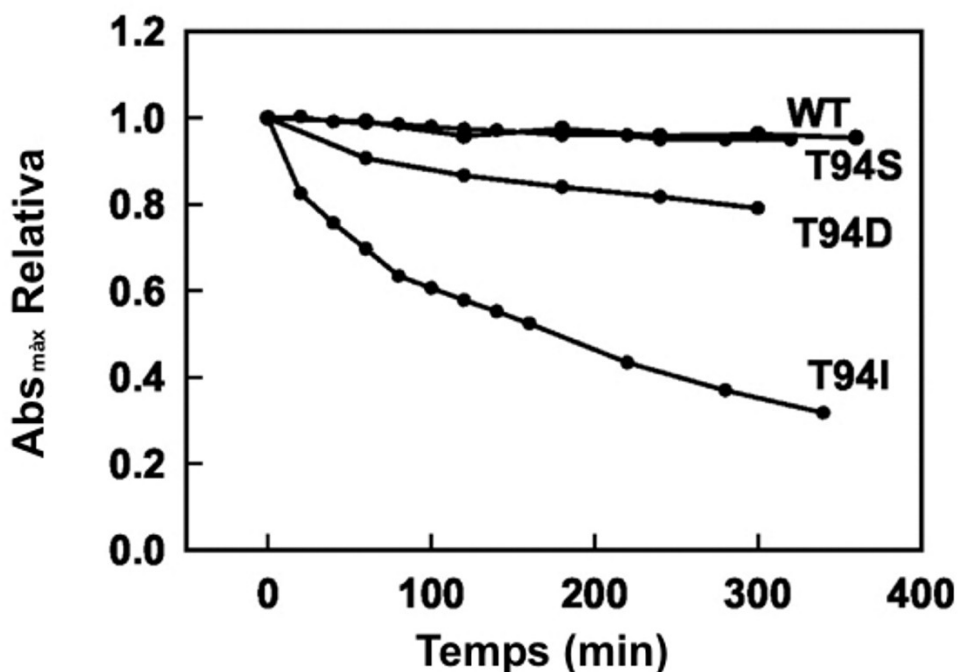


Fig. 4.29: Estabilitat tèrmica dels mutants T94I, T94D i T94S en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 37°C.

Els resultats mostren que el WT i el T94S presenten un comportament similar demostrant que aquest canvi conservatiu no afecta l'estabilitat de la proteïna. El T94D és menys estable que el WT però encara és menys estable el mutant de CNC T94I. T94D presenta aquest comportament perquè la substitució de Thr a Asp, afectaria a l'estabilitat de la rodopsina al afegir una càrrega negativa en un entorn tant carregat com és el de la base de Schiff, però l'efecte no seria tant dramàtic com en T94I ja que en T94D és un aminoàcid polar i pot mantenir-se en aquest entorn hidrofílic, al contrari del canvi d'aminoàcid polar a apolar de T94I on clarament afecta a l'estabilitat de la conformació inactiva de la proteïna.

IV.2.1.2.3.-Reactivitat enfront de la hidroxilamina dels mutants en la posició 94

La hidroxilamina és un compost que s'utilitza en estudis de rodopsina per determinar si una mutació pot afectar la compactació estructural en l'entorn de la base de Schiff. S'han tractat aquests mutants amb hidroxilamina i els resultats obtinguts es mostren en la figura 4.30.

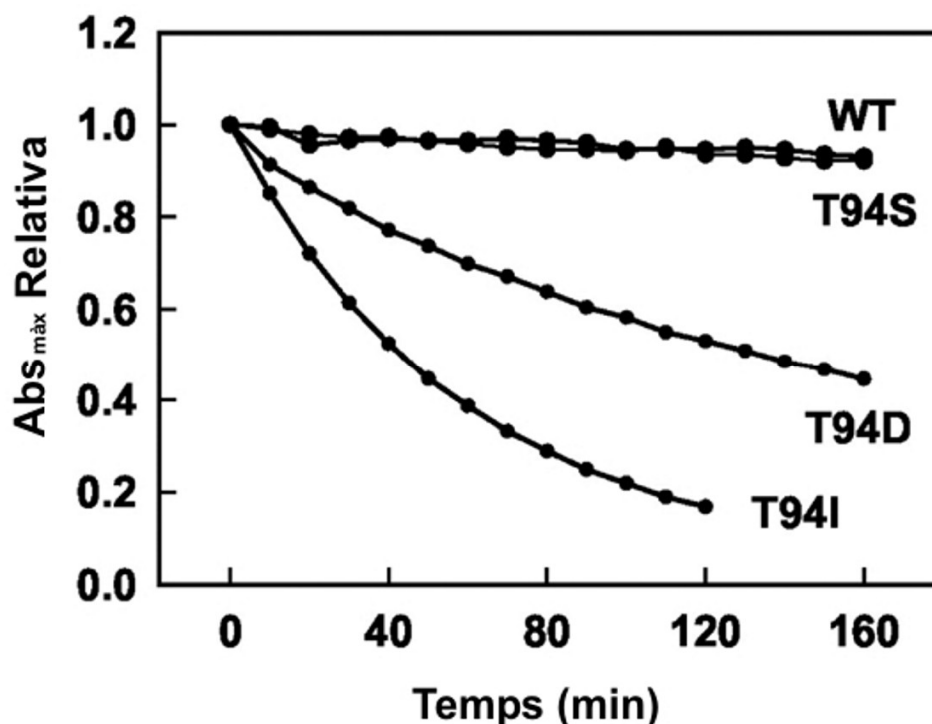


Fig. 4.30: Reactivitat enfront de la hidroxilamina en els mutants T94S, T94I i T94D en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

En aquest gràfic podem observar que l'efecte de la hidroxilamina sobre el mutant T94S no varia respecte el WT. En el mutant T94D, en canvi, després de 3 hores, ja ha disminuït en un 50% l'absorbància inicial mentre que en el cas de T94I, en 50 minuts ja ha disminuït a la meitat l'absorbància inicial. Això vol dir que aquestes mutacions afecten l'empaquetament de les hèlices provocant que la hidroxilamina entri a dins de la proteïna per a hidrolitzar la base de Schiff.

IV.2.1.2.4.-Estabilitat de la conformació activa determinada per espectroscòpia de fluorescència dels mutants en posició 94

Mitjançant espectroscòpia de fluorescència es detecta l'alliberament del retinal per part de la rodopsina un cop s'ha il·luminat. S'ha seguit el protocol descrit en l'apartat **III.2.6** i els resultats obtinguts es mostren en la taula **4.9**.

Rodopsina	t^{1/2} (min)
WT	15.8
T94D	30.1
T94I	96.9
T94S	7.2

Taula **4.9**: Taula que mostra els temps de vida mitja de MetaII dels mutants en la posició 94.

L'estabilitat de la MetaII és molt diferent en els mutants respecte el WT. El mutant T94S que fins ara presentava resultats similars al WT, mostra que tot i ser un canvi conservatiu disminueix l'estabilitat de la MetaII encara que l'estabilitat a 37°C de la forma inactiva i la reactivitat enfront de la hidroxilamina és similar al WT. L'estabilitat de la MetaII dels mutants T94D i T94I en canvi és molt superior que la del WT i això és una característica que encara no s'havia observat en els altres mutants de CNC (Gross *et al.*, 2003). En T94I és 6 vegades superior al WT.

IV.2.1.2.5.-Com pot la mutació T94I desencadenar la malaltia de la CNC?

A diferència de l'RP, els mutants en rodopsina que desencadenen la CNC presenten la característica comuna que formen part de l'entorn de la butxaca del retinal i actuen en una xarxa electrostàtica que estabilitza la base de Schiff (Rao *et al.*, 1994; Dryja *et al.*, 1994; Janz i Farrens, 2004). En canvi en el cas de l'RP, les mutacions estan més àmpliament distribuïdes al llarg de tota la proteïna (Farrar *et al.*, 2002) i presenten patrons bioquímics molt diferents (Doi *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1991 i Kaushal i Khorana, 1994) fet que complica el seu estudi.

El mutant T94I presenta unes característiques molt inusuals que demostren que la posició 94 és important en les diferents conformacions de la proteïna, en la forma inactiva pel desplaçament de la longitud d'ona en el màxim d'absorbància, la baixa estabilitat a 37°C que mostrarien que hi ha una reorganització en l'entorn de la base de Schiff (Janz i Farrens, 2004). En canvi, la forma activa és molt més estable que el WT, característica encara no descrita en els altres mutants de CNC (Gross *et al.*, 2003), aquest fet és específic d'aquest mutant i pot considerar-se també com una de les bases moleculars de la patologia.

La CNC també se l'anomena la ceguesa nocturna estacionària congènita degut a que tot i que la malaltia causa una reducció de la sensibilitat dels bastons, no s'observa una degeneració de les cèl·lules de la retina, almenys fins els últims estadis de la vida (Sieving *et al.*, 1995). En un treball molt recent s'ha observat que ratolins transgènics *knock-out* per la rodopsina nativa que expressen rodopsina G90D, formen els discos de ROS però mantenen només el 10% de la sensibilitat de la llum observada en la proteïna WT (Naash *et al.*, 2004). La causa que promouria la pèrdua de la sensibilitat de rodopsina és l'activitat constitutiva que s'ha descrit que presenten aquests mutants (Gross *et al.*, 2003) i la baixa estabilitat de la rodopsina en la seva conformació inactiva. En el mutant T94I s'hi sumaria a més l'efecte observat en l'elevada estabilitat de la MetaII. Aquesta elevada estabilitat de la conformació activa de la rodopsina, provoca que la proteïna estigui més temps activa i no hi hagi reciclatge del retinal per que encara està unit a la proteïna, això fa que la proteïna sigui menys

sensible als estímuls externs provocant la saturació del receptor (Naash *et al.*, 2004).

IV.2.2.-Efecte de les posicions 134, 247 i 251 en l'estabilitat i la conformació de la rodopsina

El moviment de les hèlices és important en l'activació dels GPCR (Farrens *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2002 i Patel *et al.*, 2004). Treballs realitzats amb d'altres membres de la superfamília, com el β 2-adrenèrgic (Ballesteros *et al.*, 2001), el μ -opioid (Huang *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002) i el 5-hidroxitriptamina 2A (Shapiro *et al.*, 2002) on es modificaven aminoàcids de la regió citoplasmàtica, s'observaven canvis en l'activació de la proteïna G. Els aminoàcids modificats són els corresponents a les posicions 134, 247 i 251 de rodopsina. En aquesta tesi s'han construït i purificat els mutants senzills E247A, E247Q, T251A, T251E i T251K i les seves combinacions formant mutants dobles i triples i s'han analitzat espectroscòpicament per estudiar els canvis que aquestes mutacions produeixen en l'estructura de la rodopsina.

IV.2.2.1.-Construcció dels mutants en les posicions 134, 247 i 251 mitjançant mutagènesi dirigida i per *cassette*.

Els mutants d'opsina s'han construït seguint el protocol descrit en l'apartat de **III.2.3.** i s'han utilitzat diferents tècniques de DNA recombinant.

IV.2.2.1.1.-Construcció dels mutants senzills, dobles i triples en les posicions 134, 247 i 251 mitjançant mutagènesi dirigida

Els mutants descrits en la taula **3.1** que afecten les posicions 134, 247 i 251 s'han comprovat primer mitjançant gels d'agarosa i posteriorment per seqüenciació. Tots els DNA dels mutants de la posició T251 eliminen la diana de restricció de l'enzim MluI i per tant a partir dels gels d'agarosa es poden descartar falsos positius. Un exemple dels gels obtinguts es mostra en la figura **4.31**.

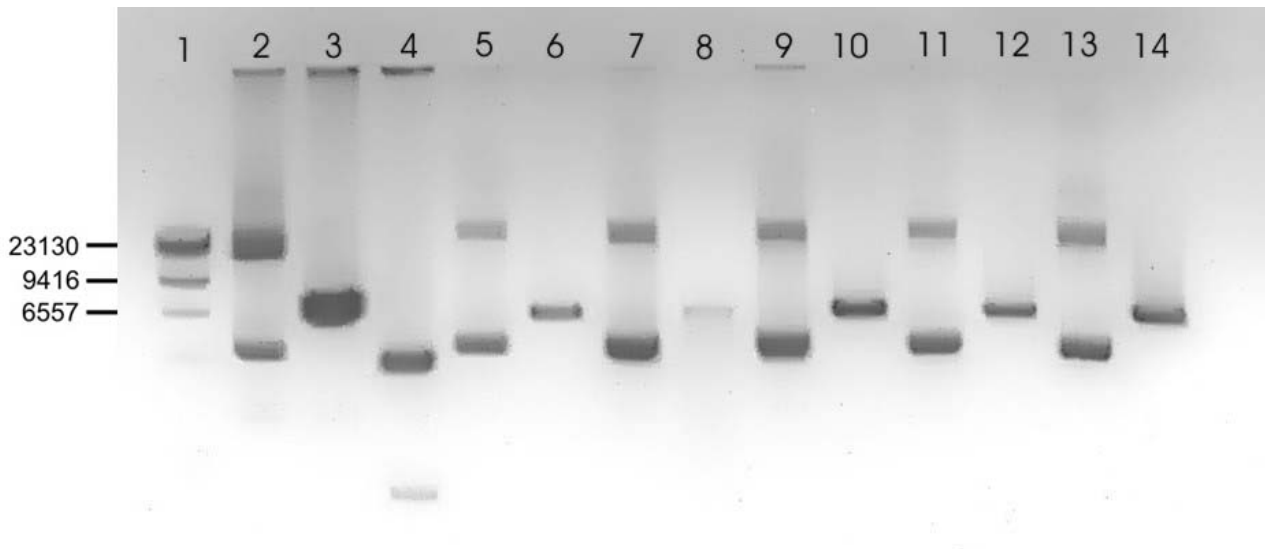


Figura **4.31**: Gel d'agarosa a l'1% realitzat per a la comprovació de les mutacions en el DNA dels mutants T251E, i E134Q/T251E digerits amb NheI i MluI. 1) marcador de PM; 2) control WT sense digerir; 3) control WT digerit per un enzim; 4) WT digerit amb els dos enzims; 5), 7) i 9) colònia T251E 1, 2 i 3 sense digerir; 6), 8) i 10) colònia T251E 1, 2 i 3 digerit amb els dos enzims; 11), 13) i 15) colònia E134Q/T251E 1, 2 i 3 sense digerir i 12), 14) i 16) colònia E134Q/T251E 1 i 2 digerit pels dos enzims.

A partir de les digestions, observem que els DNA mutats no són digerits per ambdós enzims (carrils 6, 8, 10, 12 i 14) si es compara amb la mostra del control (carrils 2, 3 i 4), per tant s'infereix que s'ha introduït la mutació, tot i així cal la comprovació del DNA mitjançant seqüenciació. En les figures **4.32**, **4.33**, **4.34** i **4.35** es mostren els cromatogrames de la seqüenciació d'alguns dels mutants purificats on s'observa que realment si que han introduït la mutació.

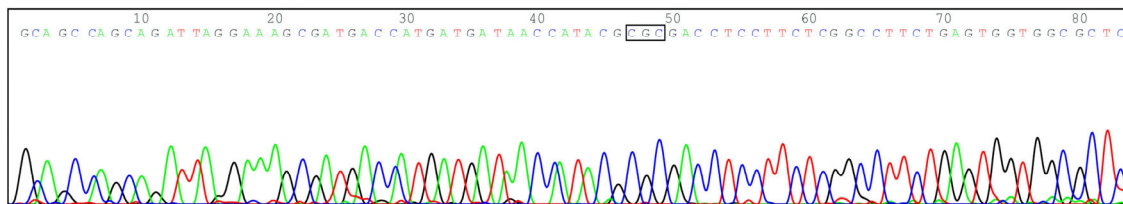


Fig. **4.32**: Cromatograma de la seqüència del mutant senzill T251A. En el requadre es marca la posició d'A251 (la direcció de la seqüència és de 3' → 5').



Fig. 4.33: Cromatograma de la seqüència del doble mutant E134Q/T251A. En el requadre es marquen la posició primer de d'A251 i en la cinquena fila la de Q134 (la direcció de la seqüència és 3'→5').

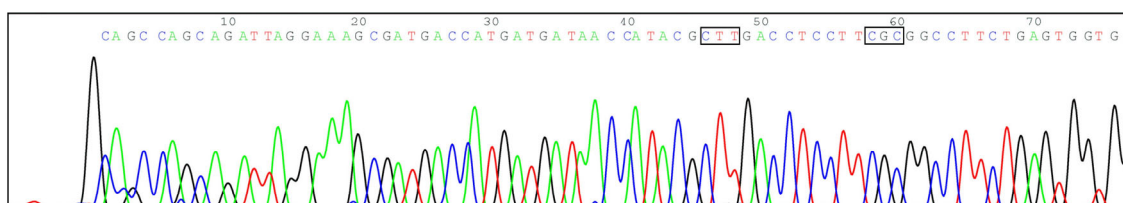


Fig. 4.34: Cromatograma de la seqüència del doble mutant E247A/T251K. En el requadre es marquen la posició primer de K251 i després d'A247 (la seqüència és 3'→5').



Fig. 4.35: Cromatograma de la seqüència del triple mutant E134Q/E247Q/T251E. En el requadre es marquen per aquest ordre la posició d'E251, de Q247 i de Q134 (la direcció de la seqüència és 3'→5').

IV.2.2.1.2.-Construcció dels mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q mitjançant mutagènesi per *cassette*

Un cop realitzat el protocol explicat en l'apartat III.2.3.2.1 i abans de seqüenciar les mostres de DNA per comprovar que contenen la mutació, es realitza un gel d'agarosa (**annex 4**) per tal de comprovar si les mostres de DNA purificades contenen el gen de l'opsina (Fig. 4.36).

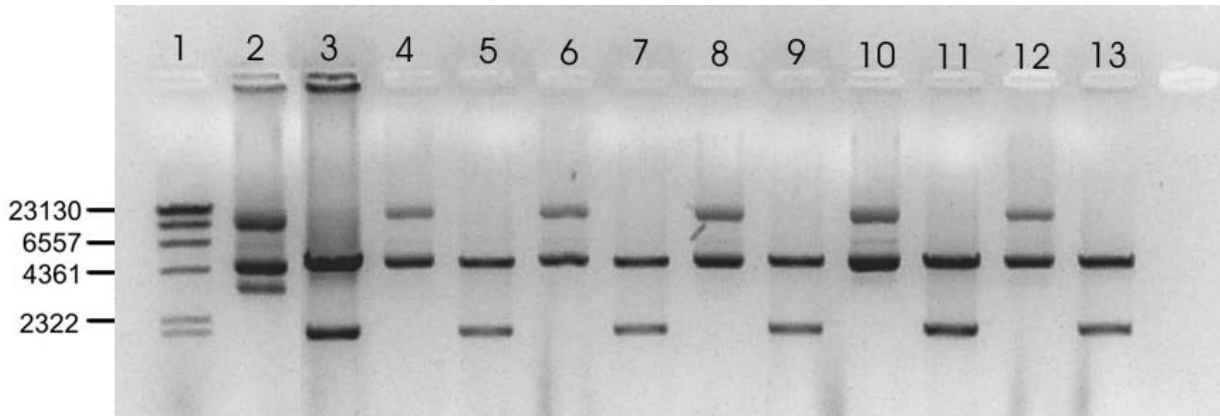


Fig. **4.36**: Gel d'agarosa a l'1% dels DNA E134Q/E247Q i E247Q/E247A digerits amb EcoRI i SalI. 1) marcador de PM; 2) control WT sense digerir; 3) control WT digerit; 4), 6) i 8) colònia E134Q/E247Q 1, 2 i 3 sense digerir; 5), 7) i 9) colònia E134Q/E247Q 1, 2 i 3 digerit; 10) i 12) colònia E247Q/E247A 1 i 2 sense digerir; 11) i 13) colònia E247Q/E247A 1 i 2 digerit.

En aquest gel es comprova que els DNA purificats a partir de les colònies obtingudes contenen el gen de l'opsina ja que presenta el mateix patró de bandes del que s'observa en la mostra control (carrils 2 i 3). Tot i així en aquest cas no s'afecta cap diana de restricció, i no es poden descartar falsos positius i només ho podem comprovar a través de seqüenciació.

Es varen seqüenciar diverses colònies i es va confirmar la presència de la mutació (Fig. **4.37**).

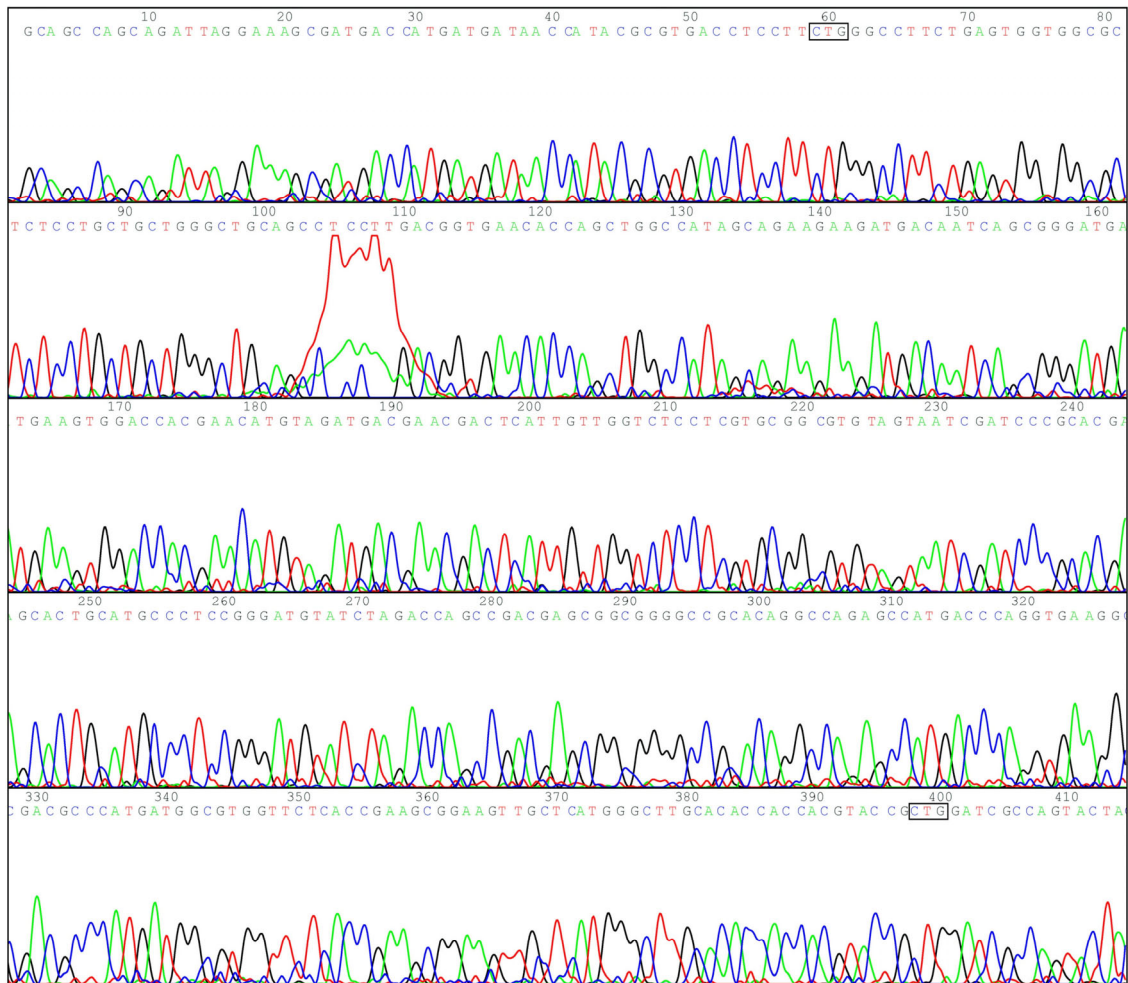


Fig. 4.37: Cromatograma de la seqüència del doble mutant E134Q/E247Q. En un requadre es marquen primer les posicions d'E247 i després el Q134 (la direcció de la seqüència 3'→5').

Un cop comprovats tots els mutants, es varen transfectar en cèl·lules COS-1 i purificar mitjançant l'anticòs Rho-1D4.

IV.2.2.2.-Anàlisi espectroscòpica dels mutants de la zona citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6 de la rodopsina

IV.2.2.2.1.-Espectres dels mutants de la zona citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6

S'han expressat i immunopurificat les proteïnes segons el procediment descrit anteriorment, s'han obtingut els espectres de tots els mutants descrits en la taula 3.3.

En la figura 4.38, es mostren els espectres del mutant E134Q (descriu anteriorment per Sakmar *et al.*, 1989; Fahmy i Sakmar, 1993; Cohen *et al.*,

1993; Arnis *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997), E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q i en la taula 4.10 es comparen les seves relacions d'A280nm/A500nm. Mutacions homòlogues a aquestes ja s'han descrit anteriorment en el receptor β 2-adrenèrgic (Ballesteros *et al.*, 2001), per tal de determinar els aminoàcids implicats en un dels mecanismes que promouen el moviment entre les hèlixes 3 i 6 que desencadena l'activació del receptor (Farrens *et al.*, 1996; Sheikh *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997; Javitch *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1999 i Jensen *et al.*, 2001). Es proposa que aquests aminoàcids estan implicats en una xarxa iònica existent entre la part citoplasmàtica de la tercera hèlix, concretament el triplet d'aminoàcids D(E)RY(S) altament conservat, i la sisena hèlix dels GPCR. En rodopsina s'ha observat que l'aminoàcid E247 és un dels aminoàcids que jugaria un paper important en aquesta xarxa i en l'estructura del receptor (Palczewski *et al.*, 2000). Aquesta posició ha estat estudiada no només en el cas del β 2-adrenèrgic, sinó en d'altres membres de la superfamília com són en el receptor de la hormona pituïtària tirotròpina, on la mutació D619G (que correspon a la posició 247 en rodopsina) causa l'adenoma de la tiroïdes (Parma *et al.*, 1993), l' α_{1b} -adrenèrgic (Greasley *et al.*, 2002) i el receptor de la lutropina (Kosugi *et al.*, 1998).

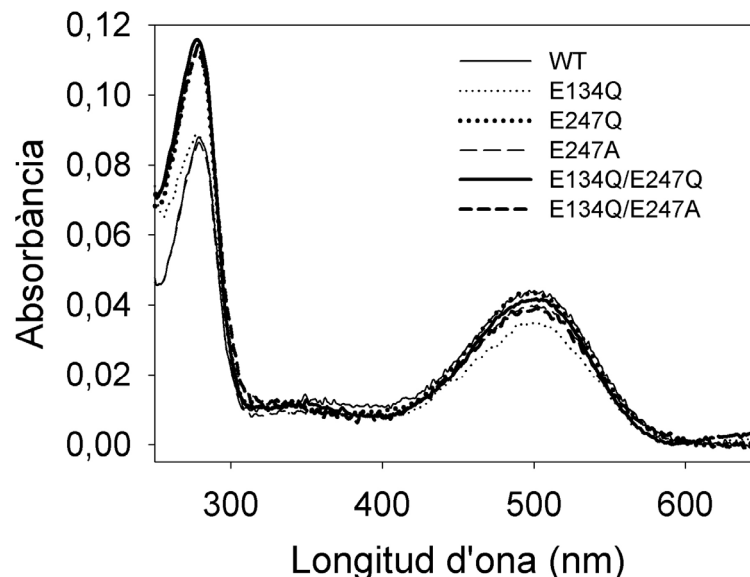


Fig. 4.38: Espectres de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05% DM a 20°C.

Aquest espectres mostren que els mutants s'expressen en la mateixa quantitat que la proteïna WT. Els mutants però no uneixen el cromòfor de manera

idèntica a la proteïna WT (taula **4.10**), essent el mutant senzill E247Q el que li afecta més l'entrada o unió del retinal dins de la butxaca.

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.040	2.0
E134Q	0.035	2.5
E247A	0.040	2.3
E247Q	0.043	3.0
E134Q/E247A	0.039	2.9
E134Q/E247Q	0.042	2.7

Taula **4.10**: Ratios de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05% DM a 20°C.

Per complementar aquests resultats s'ha realitzat modelització molecular i simulació en el mutant E134Q/E247A utilitzant el programa GROMACS v.3.1.4., i s'ha observat que les regions citoplasmàtiques de les hèlices 3 i 6 són més properes si es compara amb el WT, ja que sembla que existeix una interacció entre l'Ala de la mutació E247A i la V138 de la tercera hèlix (Fig. **4.39C i D**).

D'altra banda en aquests mutants, la R135 perd els contraions que l'estabilitzen provocant que les hèlices 3 i 6 es mantinguin juntes amb d'altres interaccions perquè la rodopsina no perdi l'estructura. Això demostraria que aquests dos aminoàcids no són els únics residus que estabilitzen aquesta regió per que sinó s'observarien canvis en la *ratio* de regeneració. Per aquest fet i a partir de l'estructura tridimensional de rodopsina es varen estudiar quins altres aminoàcids podrien estar implicats en aquesta xarxa. Un d'ells és el de la posició 251, que tal i com es pot observar en la figura **4.39** es troba molt proper a la zona i encarat cap a 134, 135 i una volta d'hèlix per sota de la posició 247.

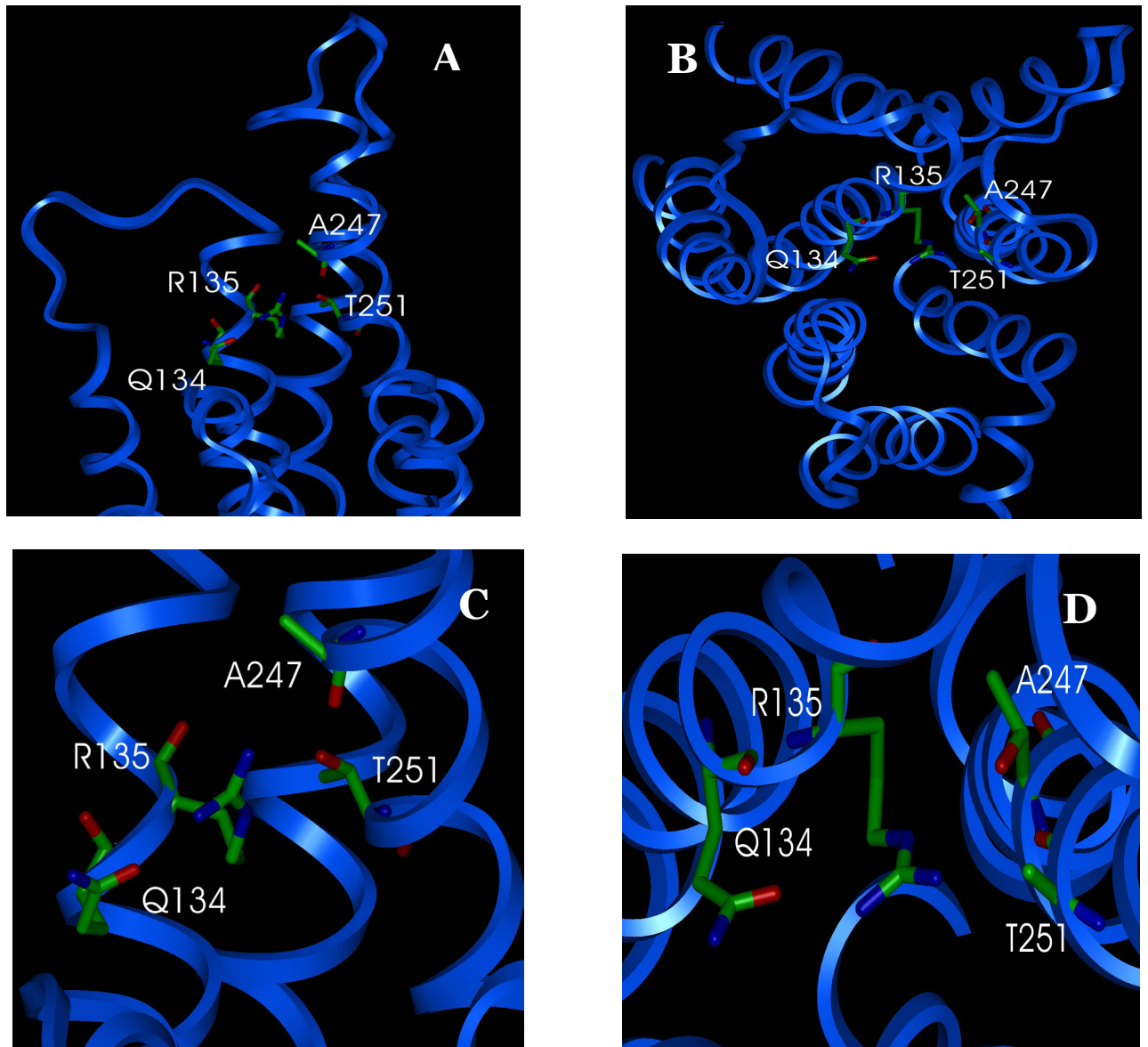


Fig 4.39: Visió lateral (A i C) i des del citoplasma (B i D) del model de rodopsina mutant E134Q/E247A. Es mostren la proximitat dels aminoàcids Q134, R135, A247 i T251 (realitzat per l'Arnau Cordoní (Dpt. Enginyeria Química, UPC) utilitzant el programa Insight II, Acelrys, San Diego, CA).

Aquesta posició ha estat estudiada en d'altres GPCR ja que s'ha suposat que estan implicats en aquesta xarxa i en l'activitat del receptor, com en el cas de l' α_{1B} -adrenèrgic (Kjelsberg *et al.*, 1992), el μ -opioid, (Huang *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002), el receptor cannabinoid-2 (Feng i Song, 2003) i els receptor de la 5-hidroxitriptamina 1B (Shapiro *et al.*, 2002) i 2A (Pauwels *et al.*, 1999).

La figura 4.40 mostra els mutants senzills T251A, T251E i T251K.

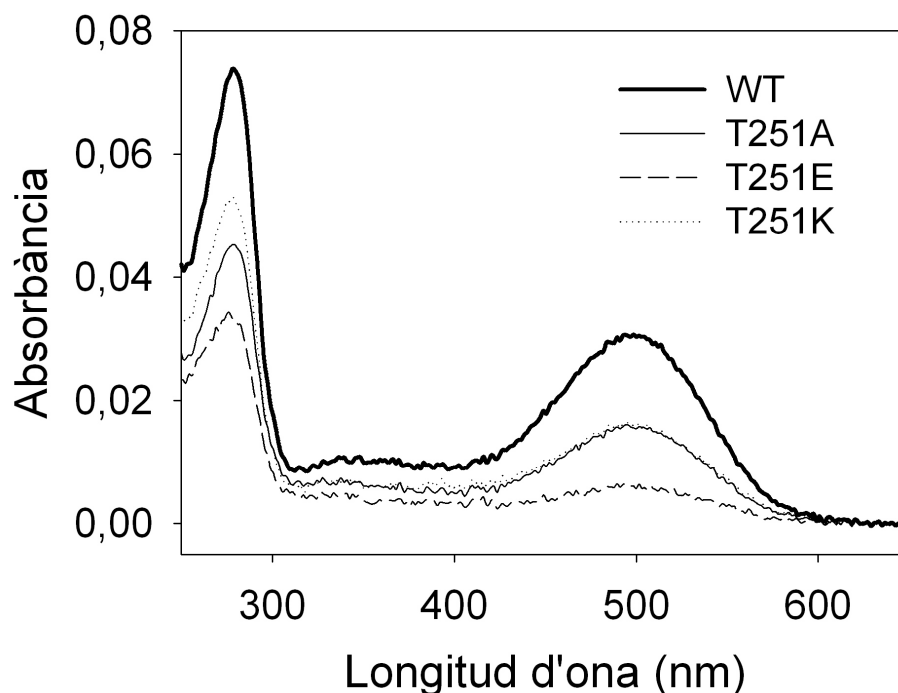


Fig 4.40: Espectre de rodopsina WT, T251A, T251E i T251K en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Les *ratios* dels espectres de la figura 4.40 es mostren en la taula 4.11.

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.031	2.4
T251A	0.015	2.9
T251E	0.006	5.0
T251K	0.016	3.1

Taula 4.11: *Ratios* de rodopsina WT, T251A, T251E i T251K en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Aquests mutants senzills ens mostren la influència de la T251 en la zona. Els mutants s'expressen en menor quantitat que el WT i presenten *ratios* més altes que la proteïna nativa (taula 4.11). Concretament el mutant T251E és el que mostra un efecte més desestabilitzador en la proteïna. Això s'explicaria perquè s'afegeix una càrrega en una regió on ja hi ha les càrregues negatives d'E134 i E247.

A partir d'aquests mutants senzills es varen fer combinacions amb els mutants que es mostren en la figura **4.38**. Els mutants dobles de la combinació es mostren en les figures **4.41**, **4.42**, **4.43** i les *ratios* d'A280/A500 en les taules **4.12**, **4.13**, **4.14**.

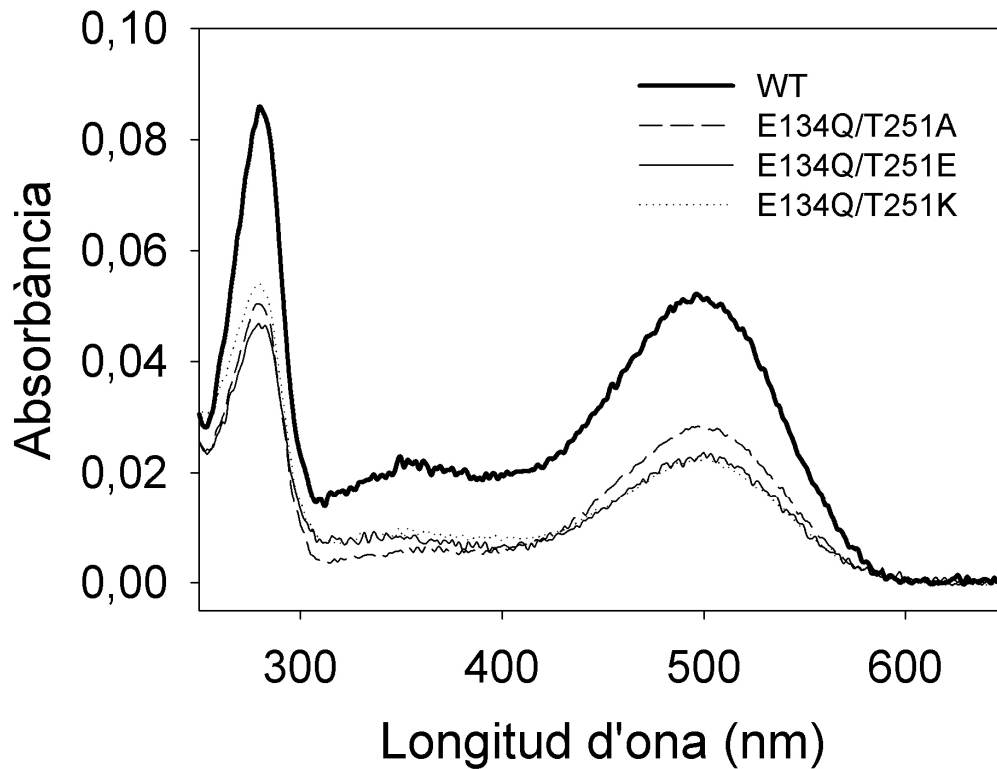


Fig. **4.41**: Espectres de rodopsina WT, E134Q/T251A, E134Q/T251E i E134Q/T251K en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Les *ratios* dels espectres de la figura **4.41** es mostren en la taula **4.13**.

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.051	1.8
E134Q/T251A	0.028	1.8
E134Q/T251E	0.024	1.9
E134Q/T251K	0.023	2.4

Taula **4.12**: *Ratios* dels espectres WT, E134Q/T251A, E134Q/T251E i E134Q/T251K realitzats en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

En aquest cas observem que els mutants es purifiquen en menor quantitat que el WT però les *ratios* es mantenen similars a la proteïna nativa a excepció del mutant E134Q/T251K (taula **4.12**). L'efecte en aquest mutant s'explicaria per que la càrrega i el volum de T251K es compensen només per l'E247.

En aquest espectre també es destacaria l'efecte estabilitzador que s'observa en la mutació E134Q/T251E si es compara amb el mutant senzill T251E (Fig. **4.40**). Per a complementar el resultat obtingut en aquest mutant, s'ha utilitzat el programa de dinàmica molecular GROMACS v.3.1.4., i no s'han observat canvis en la butxaca d'unió del retinal però sí en l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix 6 i l'hèlix 8. El mutant T251E per si sol, presenta una cadena massa gran per mantenir-se estable aquest entorn i té tendència a apropar-se a la V139 (de l'hèlix 3) i a la L226 (de l'hèlix 5) provocant un problema estèric molt important que causa la poca quantitat de rodopsina purificada. En afegir la mutació E134Q, formant el doble mutant E134Q/T251E, la càrrega de R135 perd la càrrega estabilitzadora de l'E134, però és compensada per E251. Tot i així es creen certes distorsions en aquesta zona però que no es reflecteix en la seva capacitat per unir-se al retinal.

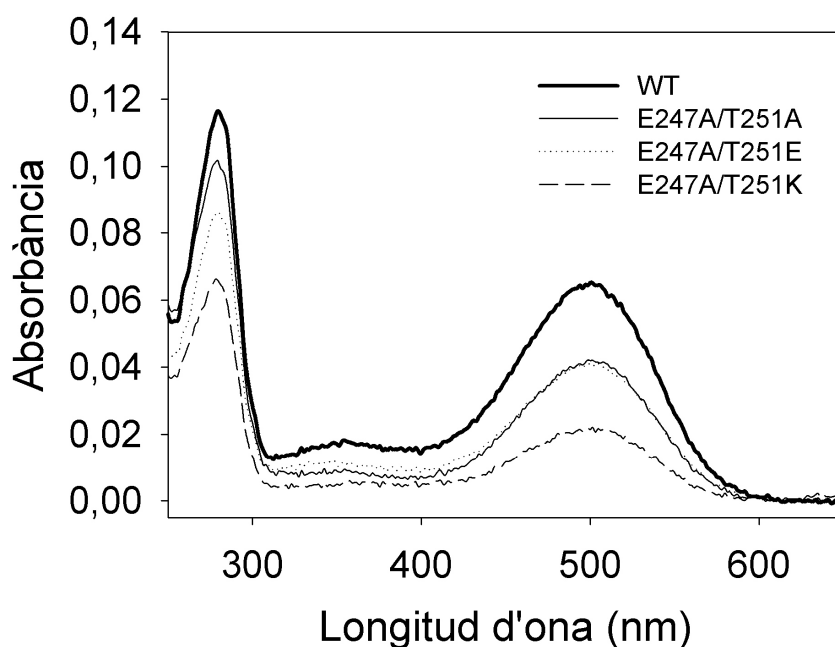


Fig. **4.42**: Espectres de les rodopsines WT, E247A/T251A, E247A/T251E i E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Els doble mutants E247A/T251A i E247A/T251E es purifiquen en menor quantitat que el WT però presenten *ratios* similars a la proteïna nativa (taula 4.13). En canvi, el doble mutant E247A/T251K és el que s'expressa en menor quantitat de tots tres i a més a més té una *ratio* més alta. La càrrega i el volum de la cadena lateral de T251K és més estable si es compensa amb una mutació en la tercera hèlix, com succeeix en el mutant E134Q/T251K (Fig. 4.41) que si la mutació es produeix en l'E247 de la sisena.

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.065	1.7
E247A/T251A	0.042	2.4
E247A/T251E	0.041	2.1
E247A/T251K	0.021	3.0

Taula 4.13: *Ratios* dels espectres de les rodopsines WT, E247A/T251A, E247A/T251E i E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

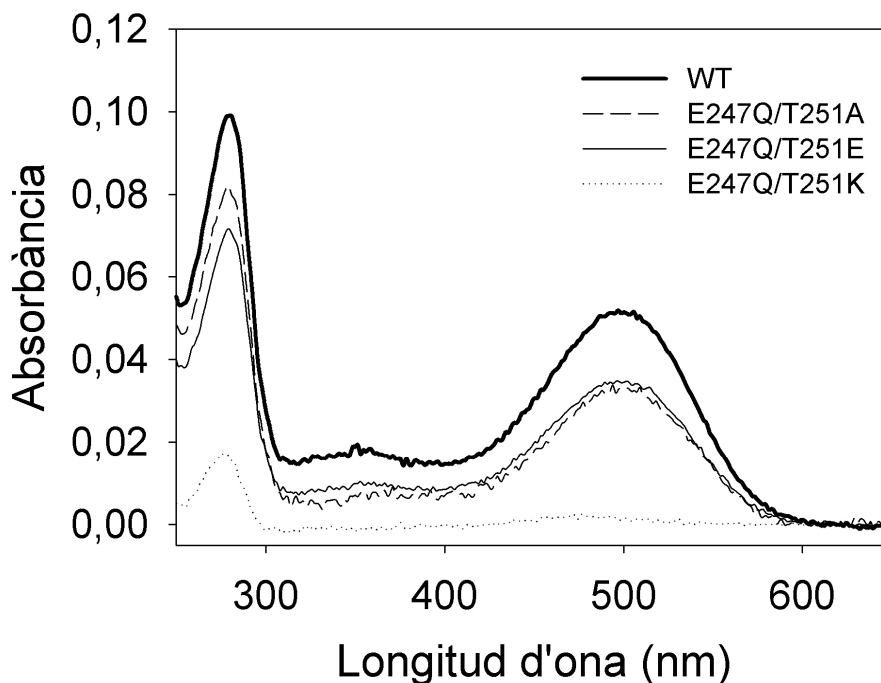


Fig. 4.43: Espectres de les mostres WT, E247Q/T251A, E247Q/T251E i E247Q/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Les *ratios* dels espectres de la figura **4.43** es mostren en la taula **4.14**.

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.051	1.9
E247Q/T251A	0.032	2.5
E247Q/T251E	0.034	2.0
E247Q/T251K	0.002	6.6

Taula **4.14**: *Ratios* dels espectres de les mostres del WT, E247Q/T251A, E247Q/T251E i E247Q/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

Els mutants s'expressen en menor quantitat que el WT i presenten *ratios* més altes que la proteïna nativa (taula **4.14**). La mutació E247Q/T251K és la que produeix un efecte desestabilitzador més important en la proteïna, fins i tot és major que en el cas del doble mutant E247A/T251K on es canvien els mateixos aminoàcids.

Tant el mutant senzill E247Q com els dobles E134Q/E247Q, E247Q/T251A, E247Q/T251E i E247Q/T251K (Figs. **4.38** i **4.43**) ens mostren que E247Q afecta a la regeneració de la proteïna amb l'11-*cis*-retinal i que tant la càrrega com el volum tenen importància en aquesta zona. Aquesta xarxa per a mantenir-se estable ha de mantenir unes interaccions òptimes entre els aminoàcids que compensin les càrregues i el volum de les seves cadenes laterals.

Posteriorment es varen purificar els mutants triples d'aquesta combinació de mutants i s'han obtingut els espectres que es mostren en les figures **4.44** i **4.45**. Les *ratios* dels espectres de les figures **4.44** i **4.45** es mostren en les taules **4.15** i **4.16**.

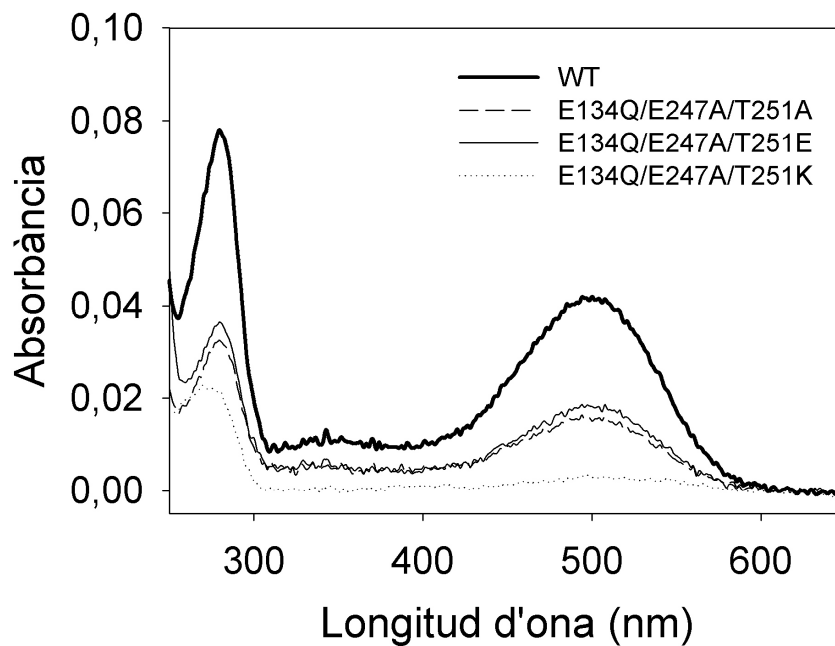


Fig. 4.44: Espectres de les rodopsines WT, E134Q/E247A/T251A, E134Q/E247A/T251E i E134Q/E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM realitzats a 20°C.

Rodopsina	A ₅₀₀	A ₂₈₀ /A ₅₀₀
WT	0.042	1.9
E134Q/E247A/T251A	0.015	2.1
E134Q/E247A/T251E	0.018	2.0
E134Q/E247A/T251K	0.003	7.2

Taula 4.15: *Ratios* dels espectres de rodopsines WT, E134Q/E247A/T251A, E134Q/E247A/T251E i E134Q/E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM realitzats a 20°C.

Aquests triples mutants s'expressen en menor quantitat que el WT i presenten *ratios* similars a la proteïna nativa a excepció del triple mutant E134Q/E247A/T251K on la *ratio* és molt elevada. Això s'explicaria per que la càrrega de la T251K en el triple mutant no es troba compensada ni per E134 ni E247.

El mateix succeeix en el cas dels mutants E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E i E134Q/E247Q/T251K, tal i com es mostra en la figura 4.45:

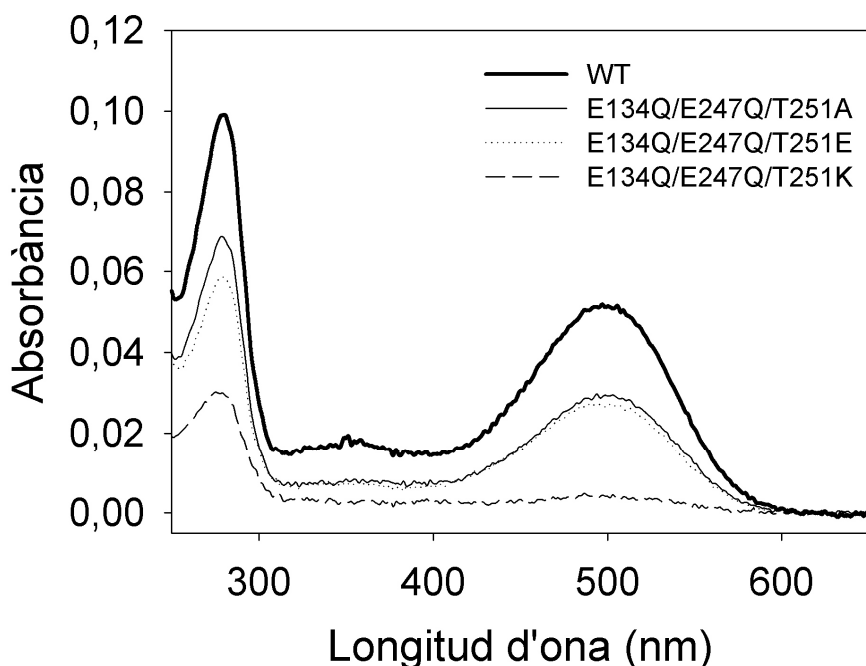


Fig 4.45: Espectres de les rodopsines WT, E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E i E134Q/E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM realitzats a 20°C.

La *ratio* dels espectres de la figura 4.45 és:

Rodopsina	A500	A280/A500
WT	0.051	1.9
E134Q/E247Q/T251A	0.03	2.3
E134Q/E247Q/T251E	0.027	2.2
E134Q/E247Q/T251K	0.004	7.1

Taula 4.16: *Ratios* dels espectres WT, E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E i E134Q/E247A/T251K purificades en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM realitzats a 20°C.

Els triples mutants E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E s'expressen en menor proporció que el WT però presenten una *ratio* similar a la proteïna nativa. El triple mutant E134Q/E247Q/T251K en canvi s'expressa en molt poca

quantitat i presenta una *ratio* molt superior a la de la proteïna nativa, el mateix efecte que s'havia observat en E134Q/E247A/T251K.

Aquests resultats mostrarien que aquestes posicions són importants en l'expressió de rodopsina i sobretot en la seva regeneració amb l'11-*cis*-retinal. Això determinaria que mutacions en la part citoplasmàtica poden indirectament afectar a la butxaca d'unió del retinal. Tot i així, s'ha proposat que l'entrada de l'11-*cis*-retinal es troba entre els aminoàcids E249, K311, A235 i D330 (Schädel *et al.*, 2003) (que són propers a la zona que estem alterant). Nosaltres proposem que l'apropament o el distanciament d'aquestes zones provocat per les mutacions, també podria dificultar l'entrada del retinal.

S'ha suposat que mutants que s'expressen en poca quantitat o regeneren en menys quantitat són menys estables, però veritablement calen experiments d'estabilitat tèrmica per determinar-ne l'estabilitat de la conformació inactiva.

IV.2.2.2.2.-Estabilitat tèrmica dels mutants en les posicions 134, 247 i 251.

Realitzats els experiments d'estabilitat tèrmica a 45°C dels mutants WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q s'han obtingut els resultats que es mostren en la figura 4.46 i els temps de vida mitjana en la taula 4.17.

Rodopsina	t_{1/2}(min)
WT	65
E134Q	22
E247A	29
E247Q	13
E134Q/E247A	13
E134Q/E247Q	14

Taula 4.17: Temps de vida mitjana de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q en KH₂PO₄ 1.8 mM, Na₂PO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM realitzats a 45°C.

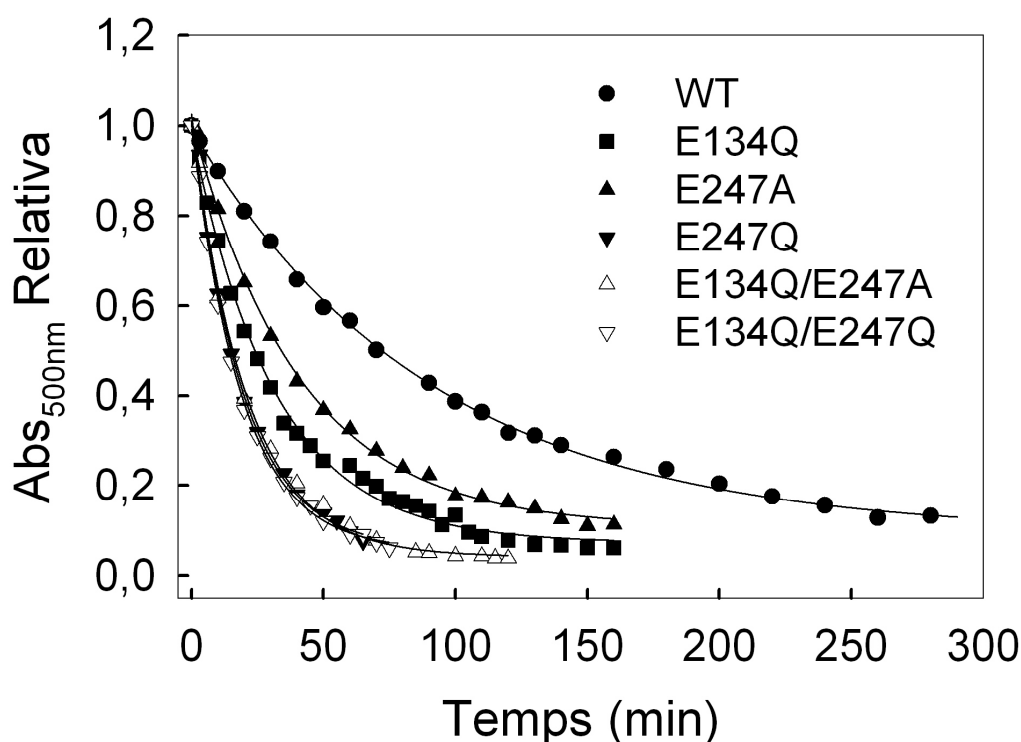


Fig. 4.46: Estabilitat tèrmica de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 45°C.

Aquests mutants es poden classificar en dos grups. En el primer s'inclourien els mutants senzills E134Q i E247A que coincideixen també en que presenten una *ratio* molt similar al WT (taula 4.10) mentre que el grup dels més inestables, el mutant senzill E247Q i als dobles E134Q/E247A i E134Q/E247Q, són també els que presenten una *ratio* més elevada si es compara amb la proteïna nativa.

El mutant E247A desestabilitza a rodopsina, però a l'afegir la mutació E134Q s'augmenta aquesta inestabilitat. D'altra banda, quan al mutant senzill E247Q se li afegeix la mutació E134Q no afecta a la seva estabilitat. Aquests resultats afirmarien el que s'havia discutit anteriorment amb el valor de les *ratios*, és a dir que la mutació E247Q produeix una desestabilització més important en la rodopsina. Això s'explicaria perquè el volum de la cadena lateral d'E247Q ocupa un espai en la zona que impedeix als residus de la tercera hèlix (R135 i E134) interaccionar de manera òptima amb els de la sisena hèlix. En canvi, en el cas de la mutació E247A tot i eliminar la càrrega, el volum de la cadena lateral és més

petit i no impedeix que E134 i R135 puguin apropar-se amb d'altres aminoàcids de la sisena hèlix com T251 (pel seu grup hidroxil).

S'ha calculat també el temps de vida mitjana del procés de desnaturalització tèrmica a 45°C dels mutants senzills T251A i T251K i els dobles E247Q/T251A i E247Q/T251E i s'han obtingut els resultats de les taules **4.18** i **4.19**:

Rodopsina	t_{1/2}(min)
T251A	60
T251K	45

Taula **4.18**: Temps de vida mitjana dels mutants T251A i T251K en KH₂PO₄ 1.8 mM, Na₂PO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 45°C.

Rodopsina	t_{1/2}(min)
E247Q/T251A	38
E247Q/T251E	70

Taula **4.19**: Temps de vida mitjana dels mutants E247Q/T251A i E247Q/T251E en KH₂PO₄ 1.8 mM, Na₂PO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 45°C.

Aquests resultats, ens confirmen que la càrrega de T251E compensa la càrrega perduda en la mutació E247Q en el mutant E247Q/T251E, tot el contrari d'E247Q/T251A que és menys estable. Això confirmaria el que s'havia observat en la quantitat de proteïna purificada i la capacitat de regeneració del cromòfor. D'altra banda, els mutants senzills T251A i T251K es purifiquen en quantitats similars al WT i presenten *ratios* molt semblants a la proteïna nativa (Fig. **4.40** i taula **4.11**). La seva estabilitat tèrmica a 45°C, en canvi, mostra que T251K és menys estable que T251A. Això s'explicaria per la càrrega i el volum de la cadena lateral de la Lys.

Per ampliar el coneixement d'aquests mutants, es vol estudiar el seu grau d'empaquetament. Amb aquesta finalitat, es varen tractar aquests mutants amb hidroxilamina.

IV.2.2.2.3.-Reactivitat en front de la hidroxilamina dels mutants 134, 247 i 251

Es varen tractar amb hidroxilamina els mutants E134Q, E247A, T251A, E134Q/E247A, E245A/T251A i E134Q/E247A/T251A i es va seguir la disminució de l'absorbància a 500 nm respecte el temps (Fig. 4.47).

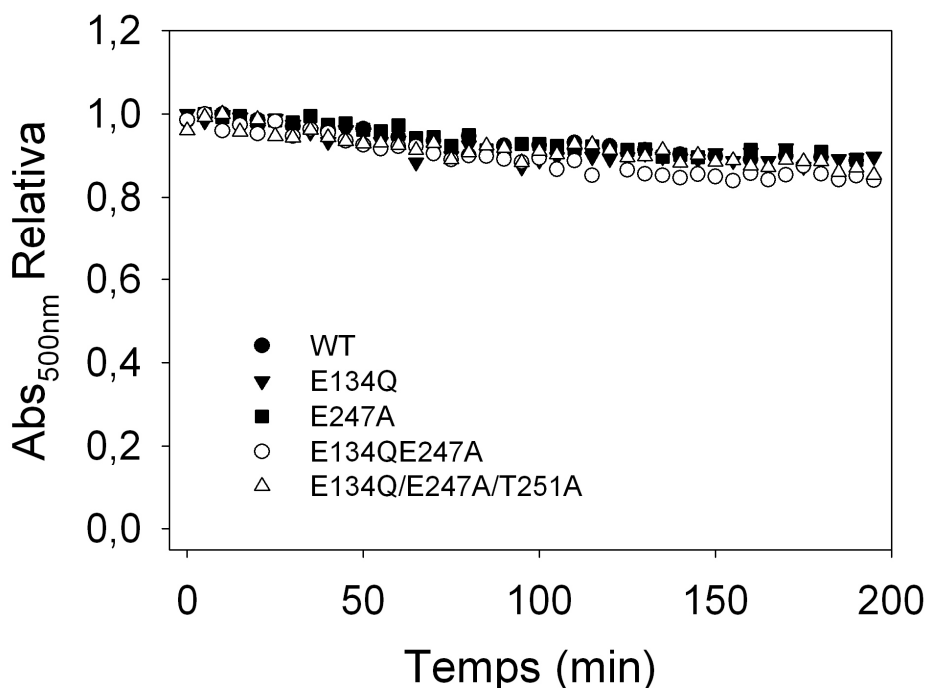


Fig. 4.47: Reactivitat enfront de la Hidroxilamina 30 mM pH=7.0 en rodopsines WT, E134Q, E247A, E134Q/E247A i E134Q/E247A/T251A en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

En aquest cas observem que no hi ha diferències importants entre els mutants i el WT i que tot i alterar una xarxa que mantindria les hèlixes 3 i 6 la hidroxilamina no accedeix amb facilitat a la butxaca d'unió del retinal.

Això demostraria que tot i que les rodopsines tenen menys estabilitat les modificacions que es realitzen afecten a la proteïna de manera local en aquest regió.

IV.2.2.2.4.-Com afecta la xarxa electrostàtica de la part citoplasmàtica de les hèlixes 3 i 6 en l'estabilitat de la rodopsina?

A partir de l'estructura tridimensional i per treballs realitzats amb d'altres receptors se sap que l'aminoàcid E134 de la tercera hèlix i E247 i/o T251 de la

sisena es troben propers i són importants per a l'activació i l'estabilitat de la conformació inactiva de la proteïna (Ballesteros *et al.*, 2001; Greasley *et al.*, 2002; Kosugi *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2002).

En els GPCR s'ha creat una nomenclatura comú per comparar les posicions dels aminoàcids (Ballesteros *et al.*, 1995). És a dir, la posició que en rodopsina és la R135 en β_2 -adrenèrgic és la R131, s'ha anomenat posició 3.50, on el 3 correspon a la hèlix 3 i el 50 a la posició més conservada. Per tant, els aminoàcids per sobre d'aquesta posició s'anomenaran 3.51, 3.52, i per sota 3.49, 3.48 etc... Un cop realitzada aquesta puntualització que serà important per a la comprensió i comparació dels nostres resultats amb els altres membres de la superfamília, ens centrarem en les posicions 3.49, 6.30 i 6.34 (que corresponen als aminoàcids E134, E247 i T251 respectivament en rodopsina).

Els nostres resultats mostren que aquestes posicions són importants per a l'estabilitat de la conformació inactiva, degut al paper que juguen en el manteniment de la xarxa electrostàtica d'aquesta zona, però no en l'estructura global de la rodopsina.

El triplet d'aminoàcids D(E)^{3.49}R^{3.50}Y(S)^{3.51} és altament conservat entre els membres de la superfamília de GPCR i s'ha vist que la D(E)^{3.49} manté una interacció electrostàtica amb R^{3.50} i que la seva disrupció és un dels canvis que provoquen l'activació del receptor. S'ha descrit que mutacions que neutralitzen l'aminoàcid D(E)^{3.49} provoquen uns canvis conformacionals en els receptors permetent l'activació a la proteïna G en absència del lligand. Per exemple, en la rodopsina (Fahmy *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 1993 i Kim *et al.* 1997), en el α_{1B} -adrenèrgic (Scheer *et al.*, 1996), en el receptor H2 de la histamina (Alewijjnse *et al.*, 2000) i en el β_2 -adrenèrgic (Samama *et al.*, 1993). Tot i així aquesta posició també s'ha associat en d'altres funcions com en els casos del receptor de la hormona alliberadora de la gonadotropina on també és important per a la internalització del receptor (Arora *et al.*, 1997) i en el receptor μ -opioid per a l'expressió (Li *et al.*, 2001).

Fins ara les posicions 6.30 i 6.34 s'havien estudiat en receptors com el β_2 -adrenèrgic (Ballesteros *et al.*, 2001), el receptor de tirotròpina (Parma *et al.*, 1993), l' α_{1b} -adrenèrgic (Greasley *et al.*, 2002), el receptor de la lutropina (Kosugi *et al.*, 1998), el μ -opioid (Huang *et al.*, 2001) i el 5-hidroxitriptamina 2A (Shapiro *et al.*, 2002) entre d'altres. En rodopsina, s'han construït mutants que

inclouen aquests aminoàcids però en que es feien deleccions de fragments sencers per estudiar la importància de la tercera nansa citoplasmàtica en l'activació de la proteïna G (Franke *et al.*, 1988 i Franke *et al.*, 1990) i també s'han fet mutacions puntuals per determinar si al constrènyer ambdues hèlices s'observava una disminució de l'activitat del receptor (Sheikh *et al.*, 1996), però fins ara no s'havien descrit ni caracteritzat el seu paper en la xarxa electrostàtica present entre la part citoplasmàtica de la hèlices 3 i 6.

A partir dels resultats obtinguts es conclou que els canvis realitzats en la posició E134 (ja descrit anteriorment) i E247 afecten en menor mesura l'entrada i unió del retinal a la butxaca de l'opsina que els canvis realitzats en T251, sobretot de T251E i T251K. Tot i així, afecten a l'estabilitat de la conformació inactiva de la proteïna a 45°C.

Aquests mutants es varen escollir perquè en els receptors que havien estudiat aquesta posició s'observa una elevada activitat constitutiva i en el nostre cas es vol estudiar com afecta a la formació del cromòfor i l'estabilitat de la conformació inactiva del receptor. Observem que l'efecte de la mutació T251E és dramàtic per a l'estabilitat de la rodopsina però quan es combina amb E134Q, E247Q, E247A i el doble mutant E134Q/E247Q i E134Q/E247A la proteïna contraresta l'efecte negatiu de T251E i regenera amb el cromòfor. Per altra banda, el mutant senzill T251K regenera amb l'11-*cis*-retinal de forma similar al WT però en canvi si es combina amb els altres mutants, la relació A280/A500 augmenta fins arribar a valors de 7 en els triple mutants. Això s'explicaria perquè el mutant T251K estabilitza aquesta càrrega per les cadenes laterals properes d'E134 i E247. A mesura que es van eliminant aquestes càrregues, la proteïna disminueix la capacitat d'unir 11-*cis*-retinal i de mantenir-se estable.

En canvi, el mutant T251A presenta una *ratio* similar al WT tant en mutant senzill, com dobles i triples, tot i que es purifica en menys quantitat. S'ha vist que l'A6.34 es troba en d'altres receptors de la superfamília com el cannabinoid-2 (Feng i Song, 2003), α_{1B} -adrenèrgic (Kjelsberg *et al.*, 1992) i m1-muscarínic (Hogger *et al.*, 1995) però l'efecte que produeix en rodopsina no es pot comparar amb el d'aquests receptors per que els aminoàcids propers, la compensació de càrrega i volum dels aminoàcids de l'entorn no són els mateixos.

La posició 6.34 presenta més o menys importància en aquesta xarxa electrostàtica en funció del aminoàcids del voltant. Per exemple en el μ -opioid,

la mutació T6.34D estabilitza i reforça l'estructura receptor. En canvi, la mutació T6.34K que al tenir proper el R3.50 crea repulsió i desestabilitza a la proteïna (Huang *et al.*, 2001). Els autors ho expliquen per que en aquest cas la posició 6.30 és ocupada per una leucina i no actua de forma directa en la xarxa electrostàtica.

A partir dels nostres resultats, semblaria que la posició 6.30 és important per a l'estabilitat de la xarxa entre les hèlices 3 i 6 i la posició 6.34 és un punt de recolzament per a D(E)3.49 i R3.50. Tot i que les mutacions en 134 i 247 no afecten a l'estructura global de rodopsina i és capaç de regenerar amb el 11-*cis*-retinal mantenint la *ratio* com el WT, no vol dir que localment puguin provocar algun efecte. Es pot remarcar doncs que ambdós aminoàcids són importants per l'estabilitat del receptor però existirien d'altres que actuarien de manera directa o indirecta estabilitzant la xarxa electrostàtica que manté la distància i l'estabilitat entre la tercera i la sisena hèlix, com la G121 i la F261 (de l'hèlix 3 i 6) (Han *et al.*, 1996) i M257 (Hèlix 6) (Han *et al.*, 1998), i la interacció d'altres hèlices com la 2 i a 7 (Yamashita *et al.*, 2000) i que també influeixen en l'activació de la proteïna G (Janz i Farrens, 2004).

Alguns d'aquests mutants presenten dificultat en regenerar amb 11-*cis*-retinal per formar el cromòfor. Això permet relacionar aminoàcids de la part citoplasmàtica amb la butxaca d'unió del retinal. Hi ha antecedents que afirmen que el mutant senzill E134Q, pot unir també el tot-*trans*-retinal (Han i Sakmar, 2000). En aquesta tesi també s'ha volgut explorar aquesta possibilitat per tal d'establir si hi ha una relació entre les mutacions en la part citoplasmàtica de la proteïna i la butxaca d'unió del retinal.

IV.2.2.3.-Importància de la zona citoplasmàtica en la unió de retinal.

Se sap que el WT no pot unir tot-*trans*-retinal però s'ha mostrat que determinat mutants com E113A (Fahmy *et al.*, 1995) E113Q (Sakmar *et al.*, 1989) i G121L/M257A, M257A i M257Y entre d'altres, poden unir covalentment tot-*trans*-retinal (Han i Sakmar, 2000). Aquests aminoàcids estan implicats directament o indirectament en la butxaca del retinal.

S'ha descrit que el mutant E134Q presenta una estructura parcialment activada (Kim *et al.*, 1997) i en presència de tot-*trans*-retinal pot activar a la transducina.

L'estudi d'altres rodopsines mutades en aquesta posició i properes com 247 i 251 per si poden unir tot-*trans*-retinal ens permeten aprofundir en el coneixement de la relació tant estreta que existeix entre tots els dominis estructurals de la rodopsina. Per això, en aquest treball es regeneren els mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q amb tot-*trans*-retinal.

Per tal de regenerar els mutants en tot-*trans*-retinal, aquest s'ha resuspès seguint el protocol descrit en **III.2.4.3**. Paral·lelament s'ha resuspès 11-*cis*-retinal i 9-*cis*-retinal per utilitzar-los com a un control. El 9-*cis*-retinal s'ha observat que es troba com a contaminant en el tot-*trans*-retinal. Els espectres obtinguts dels diferents retinals es mostren en la figura **4.48**.

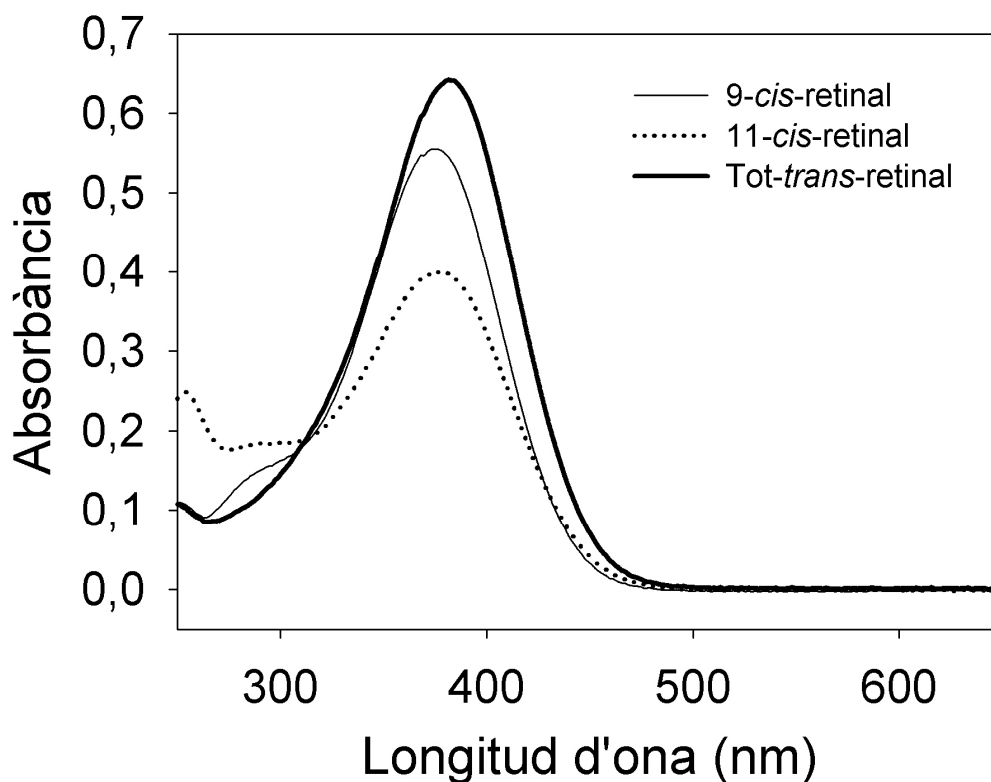


Fig. **4.48**: Espectres d'11-*cis*-retinal, 9-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal dissolts en etanol a 20°C.

A partir del valor d'absorbància màxim obtingut en aquests espectres, el coeficient d'extinció molar (taula **3.2**) i la dilució a la que s'han realitzat els espectres (vegeu apartat **III.2.4.3**.) es calcula la concentració de cada retinal, que es mostra en la taula **4.20**.

Retinal	Absorbància Màxima	Dilució	Concentració
9- <i>cis</i> -retinal	0.55	1/10000	154 mM
11- <i>cis</i> -retinal	0.40	1/1000	16 mM
Tot- <i>trans</i> -retinal	0.64	1/10000	150 mM

Taula 4.20: Valors d'absorbància i concentració de 9-*cis*-retinal, 11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal en etanol 100% a 20°C.

Els retinals presenten una longitud d'ona d'absorbància màxima diferent a causa de l'estructura de cada retinal, que es mostra en la figura 4.49.

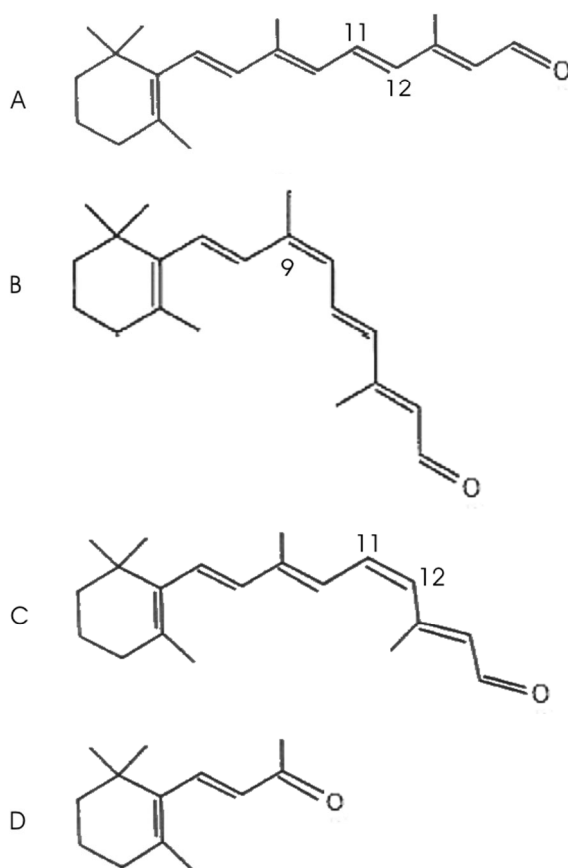


Fig. 4.49: Estructures del tot-*trans*-retinal (A), 9-*cis*-retinal (B), 11-*cis*-retinal (C) i β -ionona (D).

El fet que es produeixi aquest desplaçament de longitud d'ona en el màxim d'absorbància en els diferents retinals és degut a la diferent protecció que ofereix la cadena hidrocarbonada a l'anell de la β -ionona. La β -ionona

pròpiament dita, presenta una longitud d'ona de 300 nm (Jäger *et al.*, 1996) un cop s'afegeix la cadena carbonada provoca un augment en la longitud d'ona per que varia l'entorn de l'anell aromàtic. A mesura que aquesta cadena carbonada presenta distorsions, aquestes es veuen reflectides en els espectres en UV-Vis. L'isòmer tot-*trans*-retinal, que presenta el valor més alt de longitud d'ona, presenta una cadena carbonada sense cap distorsió. En contraposició, el 9-*cis*-retinal és el que presenta el valor de longitud d'ona de màxima absorbància més baix que s'explicaria per que la cadena carbonada presenta la distorsió en *cis* més propera i això provoca que es reflecteixi amb una longitud d'ona més propera a la de la β -ionona. Finalment, l'11-*cis*-retinal, presenta una distorsió més llunyana i una longitud d'ona entre el del tot-*trans*-retinal i el 9-*cis*-retinal. En el 13-*cis*-retinal, un altre isòmer de retinal, amb el doble enllaç a l'extrem de la cadena hidrocarbonada, el màxim de longitud d'ona es troba entre el tot-*trans*-retinal i l'11-*cis*-retinal (Garwin i Saari, 2000). Aquestes diferències entre els isòmers ja s'havien estudiat anteriorment per diferents tècniques d'anàlisi com són la cromatografia en capa prima on els isòmers donaven lleugeres diferències de Rf però es podien establir dos grups, el del tot-*trans*-retinal per una banda que és el que es desplaçaria més lent (0.29) per la placa i el dels isòmers *cis* per l'altra, essent el més ràpid el 13-*cis* (0.48), després l'11-*cis* (0.46) i finalment el 9-*cis* (0.40) (Futterman i Rollins, 1973).

Un cop resuspesos els retinal, es regeneren els mutants amb tot-*trans*-retinal seguint el protocol **III.2.4** i s'han obtingut els espectres de la figura **4.50** i en la taula **4.21** es mostren els valors de longitud d'ona de màxima d'absorbància d'aquests espectres.

Rodopsina	$\lambda_{\text{màx}}$ (nm)	Abs$_{\lambda_{\text{màx}}}$	Ratio
WT	485	0.022	2.8
E134Q/E247A	381/485	0.016/0.013	3.9/4.8
E134Q/E247Q	381/485	0.010/0.018	6.1/3.4

Taula **4.21**: Ratios dels espectres de WT, E134Q/E247A i E134Q/E247Q regenerats amb tot-*trans*-retinal purificats en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM i realitzats a 20°C.

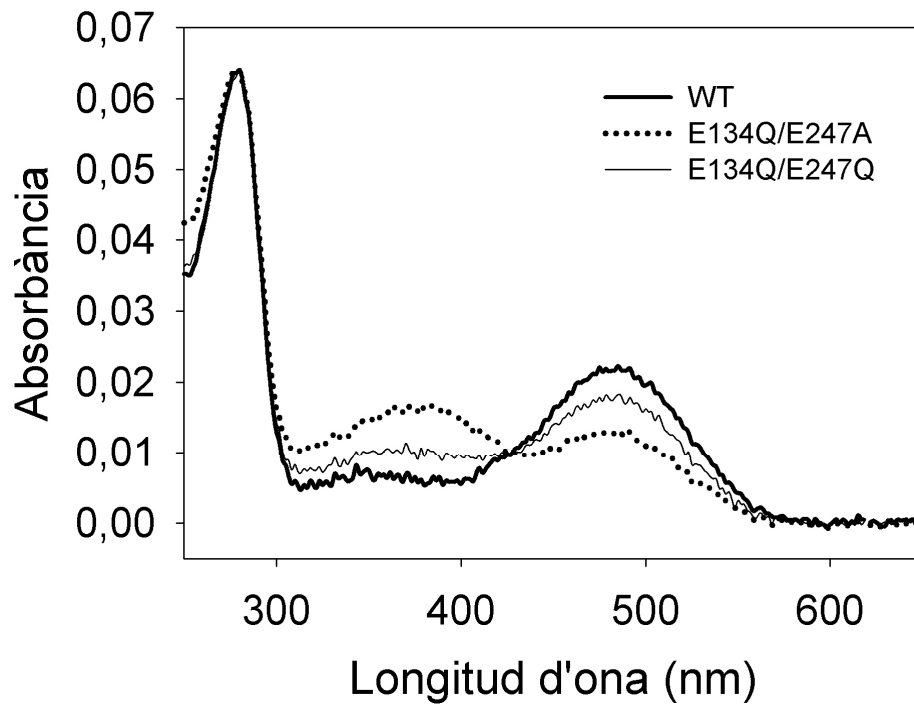


Fig. 4.50: Espectres de rodopsina WT, E134Q/E247A i E134Q/E247Q regenerats amb tot-*trans*-retinal purificats en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM a 20°C.

En la figura 4.50 s'observa que el WT presenta un únic pic a 485 nm, mentre que els dobles mutants presenten dues bandes, una a 485 i una a 381, on el doble mutant E134Q/E247A unit al tot-*trans*-retinal forma una espècie majoritària a longitud d'ona 381 nm i el E134Q/E247Q a 485 nm. S'ha descrit que alguns mutants regenerats i purificats amb tot-*trans*-retinal, com el del contraïó de la base de Schiff E113Q, poden formar cromòfor presentant dos pics de màxima absorbància, un a 380 i l'altre a 490 (Sakmar *et al.*, 1989). En aquest cas, els nostres resultats mostren les bandes a 381 i a 485. La banda a 381 correspondria a que el tot-*trans*-retinal estaria unit per base de Schiff desprotonada i la banda a 485 correspon a unió per base de Schiff protonada. Com s'ha afirmat anteriorment, el retinal en la seva forma tot-*trans* no s'uneix al WT per tant, aquest resultat significaria que el WT s'ha unit a algun contaminant de tot-*trans*-retinal, com el cas del 9-*cis*-retinal, que s'uneix a opsina WT formant un espectre d'absorció amb màxim d'absorbància a 485 nm (Fig. 4.51).

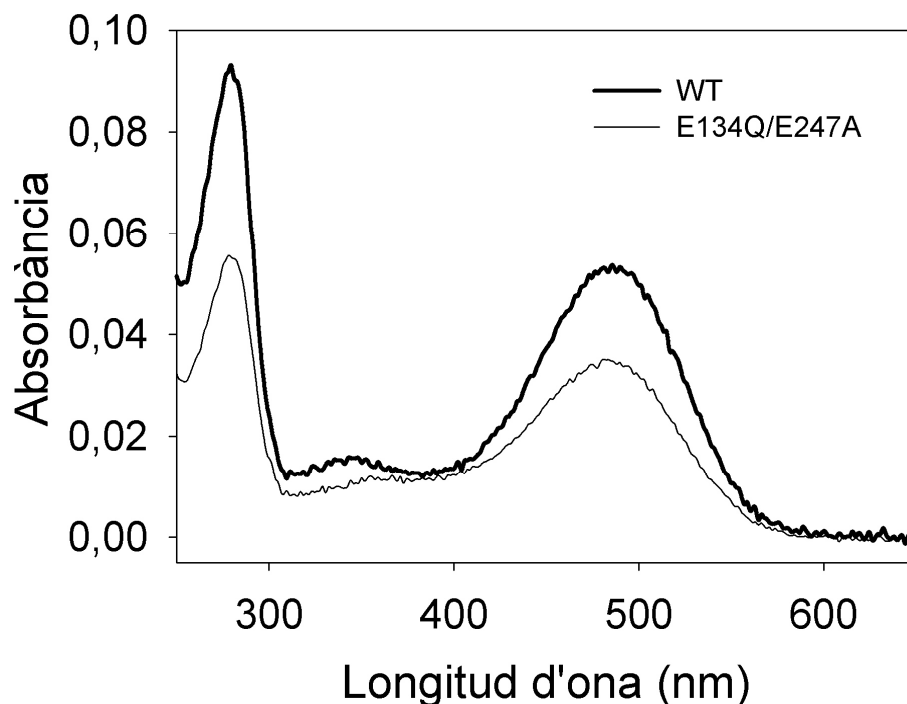


Fig. 4.51: Espectres de rodopsina WT i E134Q/E247A en foscor regenerats amb 9-*cis*-retinal en Na_2HPO_4 2mM pH=6, DM i 0.05%DM a 20°C.

Aquesta figura mostra que el WT s'uneix al 9-*cis*-retinal i en l'espectre presenta un màxim d'absorbància a 485 nm. Això explicaria la banda observada en el WT regenerat amb tot-*trans*-retinal i indicaria que tot i que el 9-*cis*-retinal es troba en un 2% en la mostra de tot-*trans*-retinal utilitzada per la regeneració pot unir-se al WT i que té alta especificitat per l'opsina recombinant.

Per estudiar si el tot-*trans*-retinal pot unir-se als mutants, s'ha regenerat el mutant E134Q/E247A amb una nova mostra del retinal i l'espectre que s'ha obtingut es mostra en la figura 4.52. En aquest cas no s'obté la banda a 485 observada anteriorment, però sí la banda a 381 nm. Si s'acidifica la mostra s'observa la banda característica a 440 nm, tot i que amb un cert desplaçament cap a longituds d'ona més baixes. El pic màxim es localitza en 420nm, i a 440nm la quantitat d'absorbància és el 77% de l'absorbància a 380nm en la mostra en foscor, per tant gran part de la proteïna s'uneix covalentment per base de Schiff desprotonada al tot-*trans*-retinal. Aquest comportament també s'ha observat en els mutants senzills M257A i M257Y i el doble mutant G121L/M257A (Han i Sakmar, 2000).

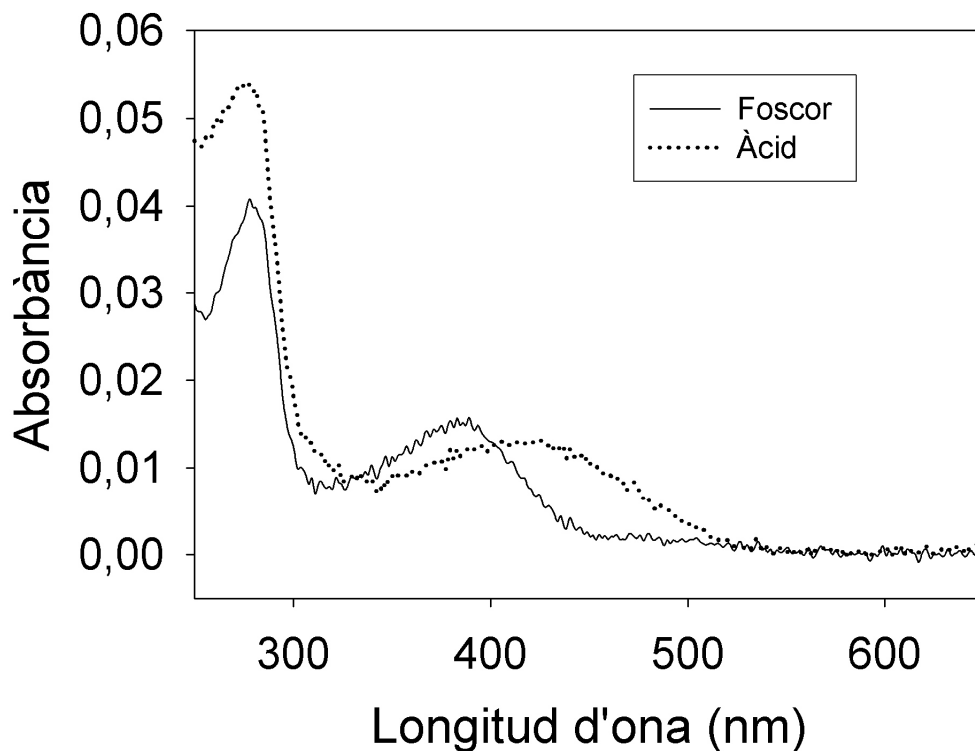


Fig. 4.52: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot-*trans*-retinal en foscor i acidificada amb H₂SO₄ 2N realitzats en Na₂HPO₄ 2mM pH=6.0, DM i 0.05%DM a 20°C.

S'ha descrit que l'opsina té tres llocs en que es pot unir el retinal. El lloc d'entrada on la capacitat d'aquest permet encabir 11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal, el lloc actiu que seria pròpiament el de la butxaca del retinal, i el lloc de sortida que permet encabir el tot-*trans*-retinal (Schädel *et al.*, 2003). Anteriorment ja s'havia observat que el tot-*trans*-retinal podria unir-se en dos llocs d'unió. Un lloc d'unió covalent i un lloc no covalent (Jäger *et al.*, 1996). El lloc d'unió covalent seria el mateix en que s'uneix el 11-*cis*-retinal. El lloc d'unió no covalent estaria localitzat en la regió citoplasmàtica i seria altament dependent del pH.

En aquest mutant observem que la unió és covalent però per base de Schiff desprotonada, i segons els antecedents indicaria que s'uneix a la butxaca de retinal. Tot i així, no es descartaria que es pogués unir covalentment en algun residu de la part citoplasmàtica considerant que s'uneix a un mutant afectat en aquesta regió. Per estudiar si existeix la unió covalent a la regió citoplasmàtica dependent del pH, s'ha regenerat el doble mutant amb tot-*trans*-retinal i s'ha purificat a diferents pH i els resultats es mostren en les figures 4.53 i 4.54.

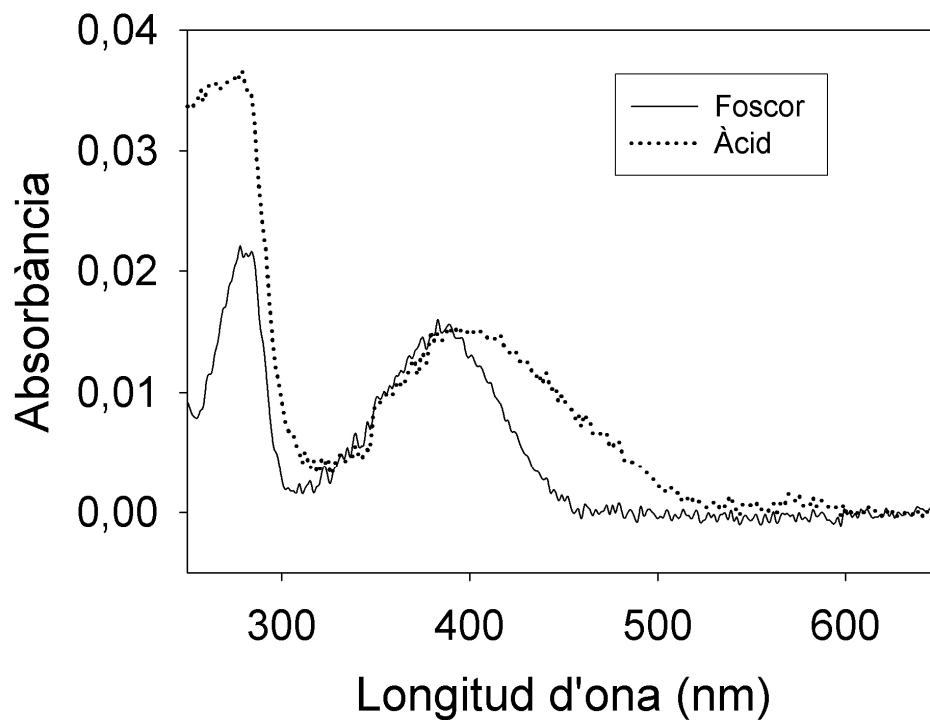


Fig. 4.53: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot-*trans*-retinal i acidificada amb H₂SO₄ 2N en Na₂HPO₄ 2mM pH=8, DM i 0.05%DM a 20°C.

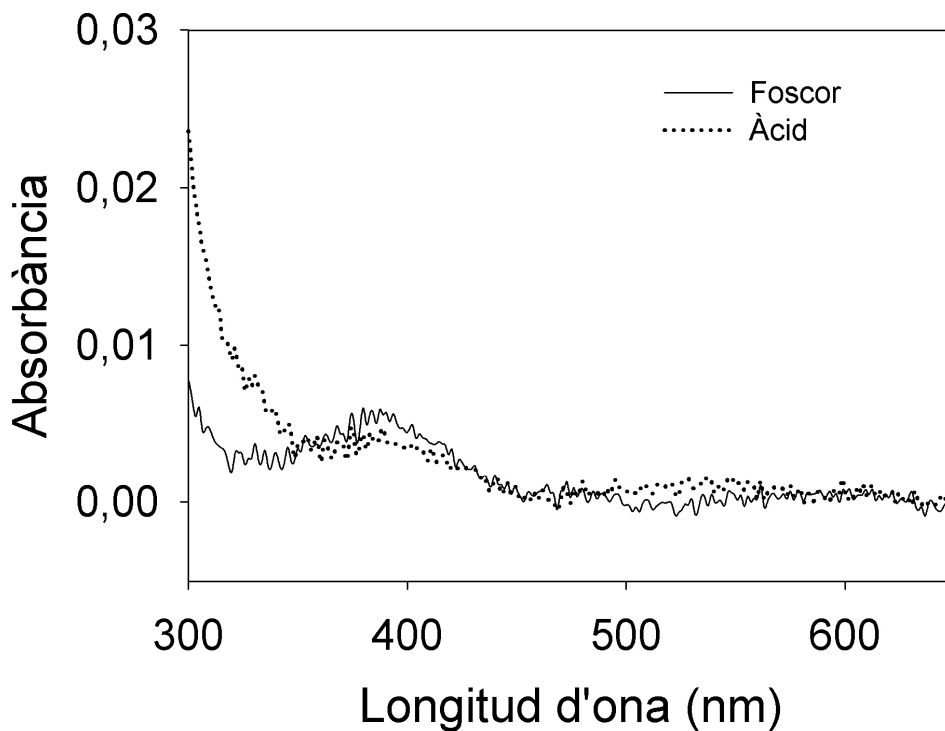


Fig. 4.54: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot-*trans*-retinal en foscor i acidificat amb H₂SO₄ 2N en Na₂HPO₄ 2mM pH=4.0, DM + 0.05%DM i realitzats a 20°C.

Aquests espectres mostren que la unió del tot-*trans*-retinal és dependent del pH per que a pH=4.0 i pH=8.0 no es forma la base de Schiff, que si s'ha observat en l'espectre a pH=6.0 de la figura 4.52.

Un possible lloc d'unió del tot-*trans*-retinal, si efectivament s'unís a la part citoplasmàtica, seria proper o dins l'àrea d'influència a la zona on s'han realitzat aquests mutants ja que E134Q/E247A i E134Q/E247Q poden unir-se en diferent mesura al tot-*trans*-retinal (Fig. 4.50).

S'ha descrit que el retinal pot situar-se a tres cavitats de la rodopsina (Fig. 4.55). Concretament el tot-*trans*-retinal pot localitzar-se en 2 possibles llocs. Un d'ells, l'anomenat lloc II, és a la part citoplasmàtica de la proteïna i molt propera a E247 (Shädel *et al.* 2003).

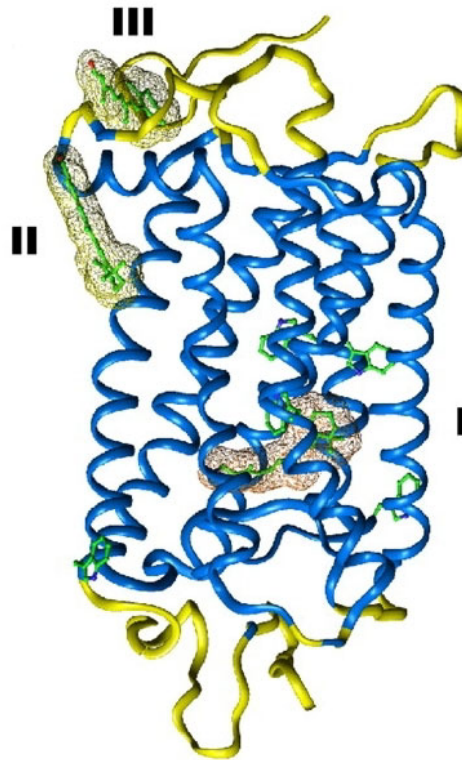


Fig. 4.55: Estructura tridimensional de rodopsina on es mostren les posicions d'unió del tot-*trans*-retinal i el 11-*cis*-retinal. I; butxaca de retinal pròpiament dita; II i III; possibles punts d'unió de tot-*trans*-retinal (Schadel *et al.*, 2003).

Aquest lloc II forma una cavitat que permet encabir tant l'11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal o tots dos alhora i se l'anomena lloc d'entrada. Aquest punt es

troba molt proper als aminoàcids A235, E249, K311 i D330, tal i com es pot observar en la figura 4.56.

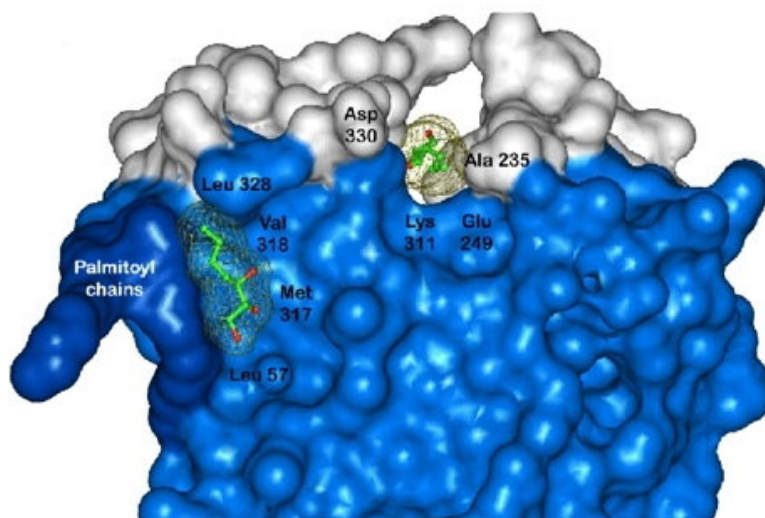


Fig. 4.56: Detall del putatiu lloc II proposat per ser el lloc d'entrada del retinal (Schadel *et al.*, 2003).

En aquest punt trobem l'aminoàcid E249, molt proper a E247, de manera que qualsevol mutació d'E247, com l'E247Q però sobretot la disminució del volum de la cadena lateral en E247A podria provocar una distorsió en aquesta zona, com un petit apropament entre les hèlices 3 i 6 donant lloc a que l'E249 s'allunyi d'aquesta zona permetent que el tot-*trans*-retinal s'acomodi en el lloc de manera més estable arribant a formar una base de Schiff amb lisines de la zona com per exemple K311.

L'altre lloc, el III, que forma una cavitat en que només permetria encabir el tot-*trans*-retinal, s'ha especulat en ser un possible punt de sortida del tot-*trans*-retinal un cop s'ha format l'estadi MetaII i s'allibera el retinal. Aquest lloc està format per entre d'altres aminoàcids, K325, N326, E332, T336 i E341, tal i com es pot observar en la figura 4.57.

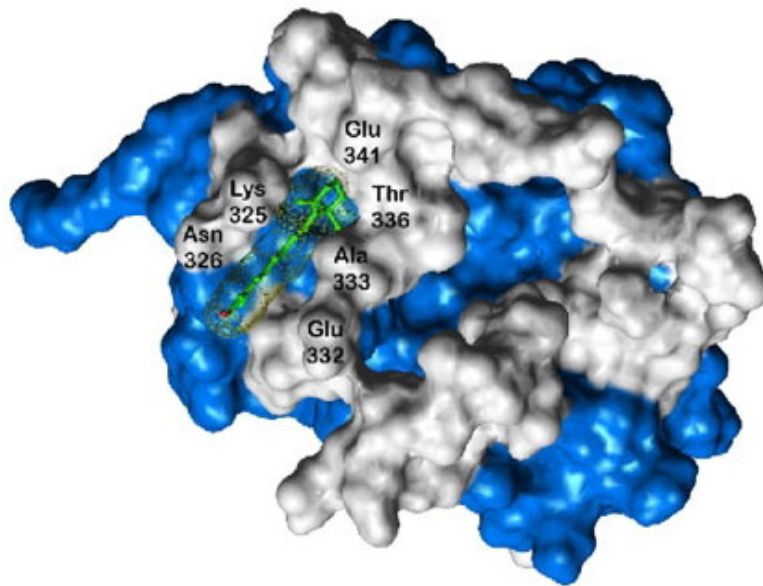


Fig. 4.57: Lloc III, que s'ha especulat per ser el lloc de sortida del tot-*trans*-retinal.

Aquesta cavitat està molt allunyada de la regió dels mutants i semblaria que les petites reorganitzacions estructural puguin produir les mutacions no afectarien aquella zona (Fig. 4.58).

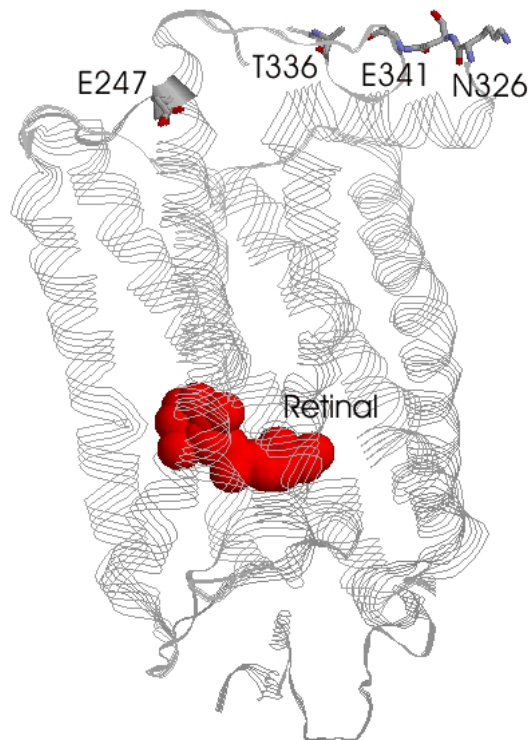


Fig. 4.58: Estructura tridimensional de la rodopsina on es mostren algunes de les posicions que flanquegen la cavitat III, la posició d'E247 i la butxaca d'unió del 11-*cis*-retinal.

Per tant, sembla que el possible punt d'unió del tot-trans-retinal seria l'anomenat lloc II, o lloc d'entrada del retinal tot i que no es descartaria el lloc d'unió del 11-*cis*-retinal.

IV.3.-Extrapolació dels resultats obtinguts amb la rodopsina a la superfamília de GPCR.

Els resultats obtinguts tant amb rodopsina de ROS com amb els mutants ens permeten aprofundir en el coneixement de l'estructura i l'estabilitat d'aquest receptor i extrapolar-ho als altres membres de la superfamília de GPCR.

Un dels aspectes estudiats és l'efecte de la temperatura en la isomerització de l'11-*cis*-retinal, el lligand natural de rodopsina. S'ha observat que la temperatura provoca la isomerització de l'11-*cis*-retinal a tot-*trans*-retinal quan aquest es troba unit a rodopsina però no quan es troba lliure en solució. Aquest resultat demostraria l'estreta unió entre el lligand i el receptor ja que canvis en els aminoàcids que formen part de la butxaca del retinal promouen la seva isomerització. La inestabilitat tèrmica observada en rodopsina seria comparable a l'efecte de determinades mutacions que causen una molt baixa estabilitat tèrmica i a més a més activitat constitutiva de la proteïna, com en el cas de T94I causant de CNC. En els GPCR s'ha observat que l'activitat constitutiva va relacionada amb mutacions que relaxen la seva estructura terciària i que alhora disminueixen la seva estabilitat tèrmica, com en el cas del receptor α_{1b} -adrenèrgic (Chen *et al.*, 2002). Per tant, els resultats obtinguts tindrien implicacions en l'estabilitat de les diferents conformacions dels GPCR que podrien ser rellevants pel mecanisme molecular de les malalties causades per mutacions en aquest tipus de receptors.

D'altra banda, l'estudi sobre la influència dels cations, concretament el zenc, en la rodopsina ens posa de manifest la importància d'aquest catió en l'estabilitat del receptor. El zenc produeix un efecte desestabilitzador en la conformació inactiva, activa i en l'intermediari MetaIII de rodopsina. Aquest efecte però s'ha vist només quan el zenc s'afegeix després de la seva síntesi i plegament. En canvi, quan s'afegeix zenc en baixes concentracions (10 μ M) mentre la proteïna s'està sintetitzant, s'observa un efecte estabilitzador (Stojanovic *et al.*, 2004).

Aquest efecte, que és específic del zenc, i el fet que s'hagi trobat zenc en l'estructura tridimensional de rodopsina, determinarien que aquest catió juga un paper rellevant en l'estabilitat d'aquest receptor. En la superfamília de GPCR s'ha vist que el zenc modula l'activitat de diversos receptors com els purinoceptors (Coddou *et al.*, 2003), els receptors de la melanocortina (Holst i Schwartz, 2003; Lagerstrom *et al.*, 2003), el receptor P2X (Vorobjev *et al.*, 2003) i els receptors metabotròpics (Francesconi i Duvoisin, 2004). Aquests resultats indicarien que el zenc és un catió important no només en el cas de rodopsina, sinó també en la resta de membres de la superfamília i podria jugar un paper important en les teràpies de malalties causades en aquests receptors, com és el cas de rodopsina, que s'utilitza en la teràpia d'RP (Berson, 2000).

Els GPCR són receptors de membrana i per tant el seu entorn lipídic condiciona tant la seva estabilitat com la seva funcionalitat. En aquest treball, s'ha modificat l'entorn de rodopsina variant la concentració de DM, el detergent utilitzat en la seva purificació, i s'ha observat que a elevades concentracions desestabilitza la conformació activa però promou la formació del fotointermediari MetaIII i que l'activitat de rodopsina és òptima a una concentració de 0.01%DM, el que ens indicaria que és important establir unes condicions experimentals i a més a més que el detergent juga un paper important en l'equilibri entre els diferents intermediaris (Vogel *et al.*, 2004). Recentment s'ha vist que el DM també condiciona l'equilibri entre la formació del dímer i el monòmer, i que ambdós estats poden activar a la proteïna G (Jastrzebska *et al.*, 2004). En altres membres de la superfamília, s'ha observat que la concentració de detergent modula la unió al lligand, com en el receptor de la serotonina (Pucadyil i Chattopadhyay, 2004) o l'activació del receptor, com el cas d'un tipus de purinoceptor (Courageot *et al.*, 2004). Tots aquests resultats mostrarien que és important establir unes condicions d'estudi concretes pel que fa a la concentració de detergent i també que l'entorn lipídic modula la funcionalitat dels receptors, que en alguns depèn de l'equilibri monòmer-oligòmer (Breit *et al.*, 2004; Kroeger *et al.*, 2003).

El coneixement aprofundit de la rodopsina no només es basa en l'estudi de la influència de factors externs sinó també cal estudiar quins efectes produeixen mutacions puntuals en l'estabilitat i l'activitat del receptor. Els GPCR actuen en diverses funcions de l'organisme i presenten mutacions associades a diferents

malalties, per exemple en la rodopsina o en el receptor de la hormona tirotròpica (Parma *et al.*, 1993). A partir de la mutació T94I, causant de CNC, s'ha descrit que aquesta posició té un paper important en l'estabilització de la base de Schiff (Janz i Farrens, 2004) i que pot afectar a l'estabilitat de les conformacions inactiva i activa de la rodopsina. La baixa estabilitat de rodopsina a 37°C i l'elevada estabilitat de la MetaII juntament amb l'activitat constitutiva (Gross *et al.*, 2003) ens mostren l'efecte que es produeix si es modifiquen residus propers del lloc d'unió del cromòfor. Aquests resultats podrien tenir influència en la resta de membres de la superfamília, sobretot en aquells que uneixen el lligand a l'interior de la proteïna, com els de la subfamília 1A dels GPCR (Bockaert *et al.*, 1999).

També s'ha estudiat la influència de la mutació en un aminoàcid de la primera hèlix i causant de l'RP, la L46R. Els resultats obtinguts mostren que l'hèlix 1 és important per a l'estabilitat de la rodopsina. La mutació impedeix que la proteïna arribi a la membrana i això indicaria que substituir un aminoàcid apolar, com la Leu, per un polar i a més a més carregat positivament, com la Arg, és altament desestabilitzador per la proteïna. A més a més considerant que és un aminoàcid encarat a la membrana, aquest podria jugar un paper molt important tant en l'estabilitat del monòmer com en la formació del dímer. Aquest efecte podria estendre's en la resta de receptors no només pel que fa a l'estabilitat del monòmer sinó també per aquells receptors on la dimerització o l'oligomerització és crucial per a la seva activitat.

L'activació dels GPCR implica un moviment coordinat de les hèlixes 3 i 6 modificant determinats enllaços iònics presents en la seva part citoplasmàtica. En alguns GPCR, en aquesta xarxa es troben implicats els aminoàcids D(E)3.49-R3.50 de l'hèlix 3 i E6.30 i/o en algun cas l'aminoàcid 6.34 de l'hèlix 6. S'ha descrit que l'enllaç 3.49 i 6.30 és important pel manteniment de la xarxa electrostàtica d'aquesta regió, com en el cas del receptor β_2 -adrenèrgic (Ballesteros *et al.*, 2001) però en d'altres receptors s'ha vist que l'enllaç es manté entre 3.49 i 6.34 com en el cas del receptor μ -opioid (Huang *et al.*, 2001). Això és degut a que en el β_2 -adrenèrgic en posició 6.34 i en el μ -opioid en posició 6.30 presenten una Leu. En canvi en rodopsina, s'ha observat que ambdues posicions jugarien un paper important en el manteniment de la xarxa. Els resultats presentats en aquest treball mostren que en rodopsina 6.30 és

important per mantenir l'estabilitat de la xarxa amb 3.49 però que li cal la posició 6.34 per a reforçar aquest enllaç (particularment pel grup hidroxil de la T251). Això indicaria que pel manteniment de l'estabilitat dels receptors és important una interacció electrostàtica dels aminoàcids descrits. També seria important per a l'estructura i funcionalitat de determinats receptors com el receptor de la 5-hidroxitriptamina_{1B} (Pauwels *et al.*, 1999) i el de l' α_{2A} -adrenèrgic (Ren *et al.*, 1993), que presenten un Glu en la posició 6.30 i una Thr en 6.34, com rodopsina. En aquests casos, però no s'ha descrit la importància de la posició 6.34 en la xarxa electrostàtica entre les hèlices 3 i 6.