

Mutants d'adRP i Alteracions en el Procés de Fotoactivació

IV.2

IV.2.1. MUTANTS G51V I G89D I ALTERACIONS EN EL PROCÉS DE FOTOACTIVACIÓ

Les mutacions G51A i G51V en l'hèlix transmembrana I i la mutació G89D en l'hèlix transmembrana II estan associades a adRP. Les mutacions G51V i G89D varen ser descrites per primera vegada el 1991 [Dryja et al., 1991, Sung et al., 1991a] i la mutació G51A el 1993 [Macke et al., 1993]. Posteriorment, aquestes mutacions varen ser estudiades en el context del plegament i de l'empaquetament de les hèlices transmembrana, conjuntament amb altres mutacions d'adRP en aquestes hèlices [Hwa et al., 1997]. Aquests estudis mostraren que el mutant G51V forma cromòfor igual que la proteïna Wt mentre que els mutants G51A i G89D només el formen parcialment [Hwa et al., 1997]. En el nostre laboratori es varen agafar aquests resultats com a punt de partida per a la caracterització detallada de l'entorn de les Gly-51 i Gly-89 en les hèlices I i II de la rodopsina, analitzant una sèrie de mutants en aquestes posicions [Bosch et al., 2003, capítol IV.1]. Els resultats obtinguts varen posar de manifest la influència estructural i funcional associada al canvi en la mida i/o càrrega de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït en les posicions 51 i 89 de la rodopsina. Es va veure que els mutants G51A, G51V i G51L són inestables tant tèrmicament en fosc com després de la fotoactivació, en comparació amb la proteïna Wt, i que aquesta inestabilitat augmenta amb l'augment de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït. També es pot relacionar la disminució de la capacitat d'aquests mutants per activar la transducina amb l'augment del volum de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït. Possiblement doncs, la introducció d'aquestes mutacions en la posició 51 provoca una alteració en l'empaquetament de les hèlices transmembrana. En la posició 89, hèlix transmembrana II, la mida de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït no és tant important com la càrrega de la cadena lateral introduïda. La Gly-89 formaria una cavitat amb la Gly-90 i una molècula d'aigua, que es troba a una distància de pont d'hidrogen del grup carboxil de la Gly-89 [Okada et al., 2002]. La Gly-90 forma part de la butxaca d'unió al retinal i es troba molt propera a la base de

Schiff. La introducció d'una càrrega en aquesta cavitat podria desestabilitzar l'entorn de la base de Schiff i podria ser un dels elements que influïssin en el mecanisme molecular de l'adRP associada a aquest tipus de mutacions.

El procés de fotoactivació de la rodopsina es pot descriure en tres passos: (1) fotoisomerització *cis-trans* del retinal; (2) relaxació tèrmica del complex retinal-opsina; i (3) equilibri entre les conformacions MetaI i MetaII [Okada et al., 2001]. A temperatura fisiològica existeix un equilibri entre les conformacions MetaI i MetaII, que es troba desplaçat cap a la conformació MetaII degut a la interacció rodopsina-transducina. Recentment, s'ha descrit l'existència d'un equilibri entre conformacions anomenades MetaIa (MetaI clàssica) i un nou fotointermediari MetaIb que seria capaç d'interaccionar amb la transducina però no d'activar-la [Shichida and Morizumi, 2006]. Aquest fotointermediari MetaIb estaria al mateix temps en equilibri amb el fotointermediari actiu MetaII. En aquest estudi es suggereix que l'alteració d'aquest equilibri pot ser una de les causes d'adRP lligada a les mutacions estudiades. Els mutants d'adRP G51V i G89D presenten un fotointermediari alterat d'activació. Aquests fotointermediaris alterats, que semblaria que no presenten capacitat d'activar la transducina, es troben en equilibri amb l'espècie descrita com a conformació activa MetaII. Per tal d'aprofundir en la causa i l'efecte de la formació d'aquests fotointermediaris d'activació s'han combinat les mutacions E134Q i V300G amb la mutació G51V per obtenir els mutants dobles G51V/E134Q i G51V/V300G. El doble mutant G51V/E134Q, que recupera parcialment el fenotip del Wt, presenta una menor formació de fotointermediari alterat i un increment en l'activació de transducina respecte al mutant G51V (71% G51V/E134Q i 18% G51V). El mutant G51V/V300G presenta una formació de fotointermediari alterat d'activació similar al mutant G51V i no presenta augment en l'activació de transducina respecte a la proteïna G51V (16%). Els espectres de FTIR de diferència -entre l'espectre en fosc i l'obtingut després de la il·luminació- dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G mostren que després de la il·luminació es forma un fotointermediari alterat amb una conformació propera a la conformació MetaII amb la base de Schiff protonada. El conjunt d'experiments fets suggereixen que durant el procés de fotoactivació d'aquests mutants es formaria en primera instància el fotointermediari MetaIa (485nm) que decauria al fotointermediari MetaIb (465nm), conformació descrita com a una espècie inactiva en equilibri amb la conformació MetaII. Aquesta conformació hauria sofert

una reorganització estructural respecte a la conformació MetaI clàssica (MetaIa) que l'hauria apropiat conformacionalment al fotointermediari MetaII [Shichida and Morizumi, 2006].

IV.2.2. CARACTERITZACIÓ DELS FOTOINTERMEDIARIS ALTERATS D'ACTIVACIÓ DELS MUTANTS G51V I G89D

Les proteïnes recombinants Wt, G51A, G51V i G89D es varen expressar i immunopurificar amb la finalitat d'estudiar la formació dels fotointermediaris alterats d'activació dels mutants G51V i G89D. Tal i com s'ha descrit prèviament, aquests dos mutants presenten un procés de fotoactivació alterat [Hwa et al., 1997; Bosch et al., 2003]. Després de la il·luminació, les espècies que presenten una $\lambda_{\text{màx}}$ a 502nm i 500nm en foscó, corresponents als mutants G51V i G89D respectivament, no es converteixen en la seva totalitat, tal i com s'observa amb la proteïna Wt, a espècies amb una $\lambda_{\text{màx}}$ a 380nm, descrites com a MetaII. Després de la il·luminació el mutant G51V presenta dues bandes d'absorció, una a 380nm i una altra a 484nm. El mutant G89D també presenta la formació de dues espècies diferents amb absorptions a 380nm i a 490nm després de la fotoactivació (Taula IV.2.1). Els mutants G51V i G89D presenten, doncs, una cascada de fotoactivació diferent a la de la rodopsina Wt.

Proteïna Recombinant	$\lambda_{\text{màx}}$ en foscó	$\lambda_{\text{màx}}$ després d'il·luminar
Wt	500nm	380nm
G51A	500nm	380nm
G51V	502nm	380nm/484nm
G89D	500nm	380nm/490nm
G51A/E134Q	498nm	380nm
G51V/E134Q	501nm	380nm/490nm
V300G	499nm	380nm
G51V/V300G	501nm	380nm/484nm

Taula IV.2.1. $\lambda_{\text{màx}}$ dels diferents mutants de l'estudi en foscó i després de la il·luminació.

També es va mesurar l'estabilitat dels fotontermediaris alterats d'activació dels mutants G51V i G89D seguint el decaïment de la banda d'absorció del fotointermediari en el temps. El fotointermediari que es forma en l'activació del mutant G51V, espècie que absorbeix a 484nm, presenta un $t_{1/2}$ d'uns 11min per aquest procés, mentre que en el cas del fotointermediari alterat que es forma en la fotoactivació del mutant G89D aquest té un $t_{1/2}$ d'uns 25min (Taula IV.2.2). Per tal de saber si aquests fotointermediaris alterats es troben en equilibri amb les espècies que presenten una $\lambda_{m\grave{a}x}$ a 380nm es varen portat a terme diferents experiments en presència de 100 μ M de pèptid G α -HAA (VLEDLKSCGLF). Aquest pèptid conté els residus 340-350 de la subunitat α de la transducina i s'ha descrit que estabilitza eficientment la conformació MetaII [Bartl et al., 2000; Herrmann et al., 2004; Martin et al., 1996]. Els espectres dels mutants G51V i G89D en fosc, després d'il·luminar i acidificar la mostra, en presència de pèptid G α -HAA, es mostren en la Figura IV.2.1.. En presència de pèptid G α -HAA el mutant G51V no presenta formació de fotointermediari alterat d'activació. Després de la il·luminació l'espècie que en fosc absorbeix a 502nm és convertida, en la seva totalitat, a una espècie amb una $\lambda_{m\grave{a}x}$ a 380nm. En el cas del mutant G89D s'observa en presència de pèptid una disminució de la banda corresponent al fotointermediari alterat d'activació. Això ens indica que aquests fotointermediaris alterats que es formen en el procés de fotoactivació dels mutants G51V i G89D es troben en equilibri amb les espècies que presenten una $\lambda_{m\grave{a}x}$ a 380nm, descrites com a espècies actives MetaII.

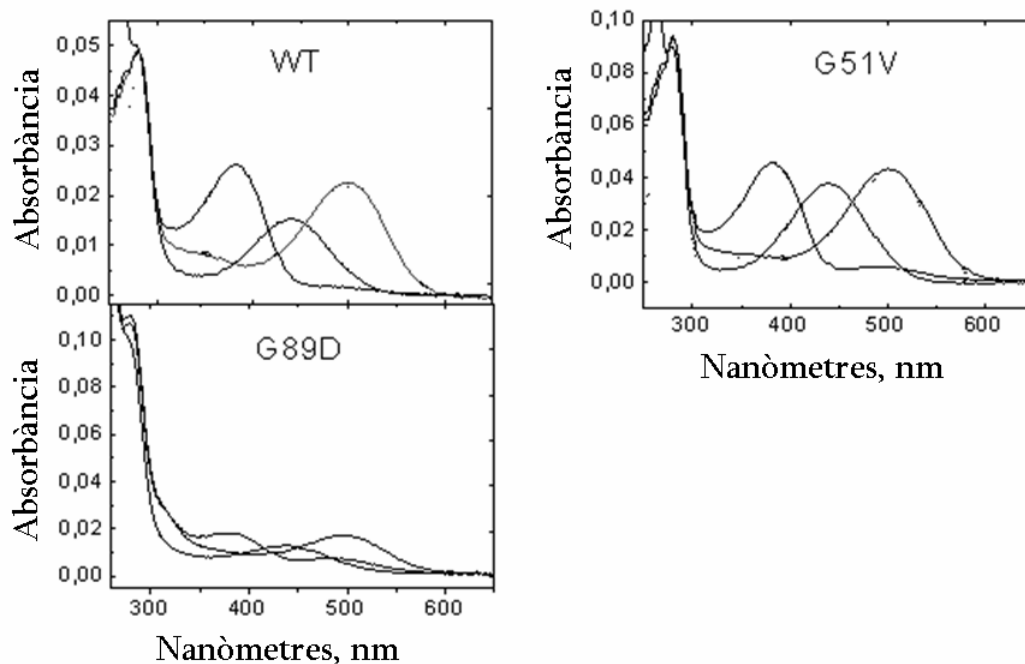


Figura IV.2.1. Espectres d'absorció UV-visible en fosc, després de la il·luminació i posterior acidificació en presència de 100 μ M de pèptid G α -HAA per a les proteïnes Wt, G51V i G89.

Els resultats experimentals d'alliberament de retinal dels mutants G51V i G89D a pH 7.5 i 0.03% DM es poden descriure matemàticament com una funció exponencial de doble component. En les mateixes condicions però en presència de 100µM de pèptid G α -HAA s'observa que els resultats d'alliberament de retinal per aquests mutants es correlacionen millor a una corba exponencial d'una sola component, confirmant l'existència d'un l'equilibri entre les dues espècies que es formen durant el procés de fotoactivació. Si comparem els t_{1/2} d'alliberament de retinal dels mutants G51V i G89D en presència de pèptid G α -HAA amb el t_{1/2} d'alliberament de retinal per a la proteïna Wt, també en presència de pèptid, observem que aquests mutants presenten una conformació activa inestable respecte a la proteïna Wt, que es pot relacionar amb la capacitat alterada d'activació de la transducina (Taula IV.2.2). Així doncs, suposem que en el procés d'activació d'aquests dos mutants es formen dues espècies en equilibri, un fotointermediari alterat i una espècie capaç d'activar la transducina. L'espècie activa dels mutants G51V i G89D és inestable i això explicaria la reduïda capacitat d'aquests mutants d'activar la transducina. La conformació activa del mutant G51V és més inestable que la conformació activa del mutant G89D i la capacitat d'activar la transducina del mutant G51V també és menor que la capacitat d'activar la transducina del mutant G89D (Taula IV.2.2).

Proteïna	t _{1/2} d'alliberament de retinal	t _{1/2} d'alliberament de retinal en presència de pèptid G α	Activació de G α per fluorescència	t _{1/2} del fotointermediari alterat a 20°C
	50mM BTP pH=7,5 0,03%DM	50mM BTP pH=7,5 0,03% DM +100µM pèptid G α	10mM Tris-HCl pH=7,1 100mM NaCl 2mMMgCl2 0,012% DM	10mM BTP pH=6,5 0,03% DM
Wt	12,9min	>83min	1.00	-----
G51A	17,9min	>83min	0,95	-----
G51V	32%2,1 78%38,5	33,4min	0,20	10,9min
G89D	19%2,5 66%23,1	38,1min	0,57	25,3min

Taula IV.2.2. t_{1/2} d'alliberament de retinal en presència i absència de pèptid G α , activació de G α per fluorescència i t_{1/2} del fotointermediari alterat per les proteïnes recombinants Wt, G51A, G51V i G89D.

IV.2.3. CARACTERITZACIÓ DELS MUTANTS G51V/E134Q I G51V/V300G

S'ha proposat que la introducció de la mutació G51V en l'estructura de la rodopsina causaria una reorganització en l'empaquetament de les hèlices transmembrana, implicant canvis en l'entorn de l'Asp-83 i la Val-300 (capítol IV.I.). Els resultats obtinguts pel mutant G51V suggereixen que les interaccions entre aquestes hèlices (I, II i VII) tindrien un paper important en el manteniment de la conformació inactiva del receptor i també en el procés de fotoactivació de la rodopsina, tal i com s'ha proposat prèviament [Lehmann et al., 2006, Okada et al., 2002]. Per tal de clarificar l'efecte de la mutació G51V en l'estructura i en la funcionalitat del receptor s'han construït els dobles mutants G51V/E134Q i G51V/V300G, així com també els mutants G51A/E134Q i V300G. La mutació E134Q del motiu conservat D(E)RY facilita la formació induïda per la llum de la conformació activa MetaII [Zhukovsky et al., 1989], la introducció d'aquesta mutació en l'estructura del mutant G51V podria desplaçar l'equilibri existent entre el fotointermediari alterat i les espècies descrites com a MetaII. Per altra banda, la mutació V300G s'ha introduït en l'estructura del mutant G51V amb la finalitat de revertir l'impediment estèric descrit entre les hèlices I i VII degut a la introducció d'una Val en la posició 51.

Els mutants G51A/E134Q, G51V/E134Q, V300G i G51V/V300G s'han expressat en cèl·lules COS-1 i immunopurificat tal i com es descriu en l'apartat de *Materials i Mètodes*. Els espectres de les proteïnes recombinants en foscor, després de la il·luminació i posterior acidificació es mostren en la Figura IV.2.2.. Els diferents mutants formen cromòfor bàsicament igual que la proteïna Wt, així doncs, les mutacions introduïdes no afecten la regeneració de l'opsina amb l'11-*cis*-retinal. Els mutants G51V/E134Q i G51V/V300G presenten, però, un comportament anòmal en front la il·luminació. Després de la il·luminació d'aquests mutants s'observa la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. Les bandes d'absorció corresponents a aquests fotointermediaris són, però, menors en intensitat que la banda de fotointermediari alterat que es forma en el cas del mutant G51V, indicant que les mutacions introduïdes podrien desplaçar en part l'equilibri existent entre ambdues conformacions. El mutant G51V/E134Q presenta un espectre després de la il·luminació amb dos màxims d'absorció, un a 380nm i un altre a 490nm. En el cas del mutant G51V/V300G els dos màxims d'absorció apareixen a 380nm i a 484nm (Taula IV.2.1).

Per altra banda, els mutants G51A/E134Q i V300G presenten un espectre d'absorció després de la il·luminació igual al de la proteïna Wt, amb un desplaçament del màxim d'absorció a 380nm indicant que aquests mutants segueixen la mateixa cascada de fotoactivació que la proteïna Wt.

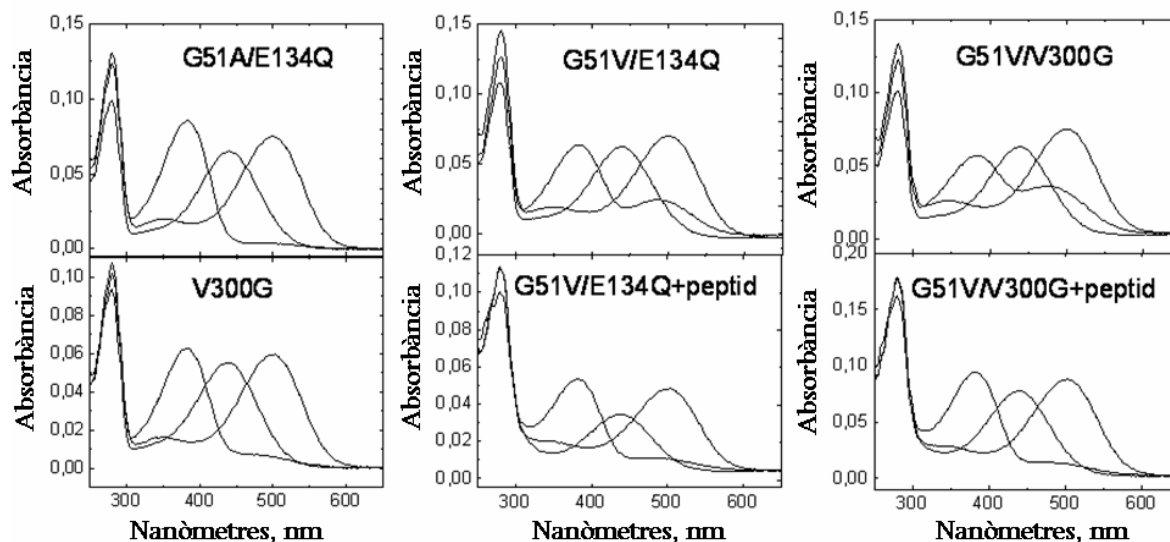


Figura IV.2.2. Espectres d'UV-visible en foscor, després de la il·luminació i després de l'acidificació dels mutants G51A/E134Q, G51V/E134Q, G51V/V300G, V300G. També es mostren els espectres dels mutants G51V/E134Q i G51V/V300G en presència de 100 μ M de pèptid G α -HAA.

S'han realitzat els espectres d'absorció en foscor, després d'il·luminar i acidificar la mostra dels mutants G51V/E134Q i G51V/V300G en presència de 100 μ M de pèptid G α -HAA observant-se la formació d'una única banda a 380nm després de la il·luminació. La banda que correspon al fotointermediari alterat desapareix en presència de pèptid G α -HAA (Figura IV.2.2). Això ens indica que el fotointermediari alterat que es forma durant la fotoactivació d'aquests mutants es troben en equilibri amb l'espècie que absorbeix a 380nm. El $t_{1/2}$ dels processos de decaïment dels fotointermediaris alterats dels mutants G51V/E134Q i G51V/V300G s'han determinat mesurant la disminució de l'absorbància de la banda corresponent al fotointermediari alterat en el temps. El valor de $t_{1/2}$ per al fotointermediari alterat del mutant G51V/E134Q és de 87.9min i el fotointermediari alterat que es forma en el procés de fotoactivació del mutant G51V/V300G presenta un $t_{1/2}$ de 50.3min.

En el procés de decaïment de la banda d'absorció que correspon als fotointermediaris alterats d'activació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G s'observa un desplaçament en màxim d'absorció d'aquesta banda. En la Figura IV.2.3. es mostren els espectres dels mutants G51V, G51V/E134Q, G51V/V300G i V300G just després de la il·luminació de la mostra i al cap de 10min d'il·luminar-la, podent-se observar un desplaçament del màxim d'absorció de 485-490nm a 465-470nm. S'ha descrit l'existència d'un equilibri entre espècies anomenades MetaIa (485nm), MetaI clàssica, i MetaIb (465nm) i també d'un equilibri entre l'espècie MetaIb i la conformació activa MetaII (380nm) [Shichida and Morizumi, 2006]. El que podríem estar observant per aquests mutants és la formació del fotointermediari MetaIa (485nm) a temps inicials després de la il·luminació i el seu pas a MetaIb (465nm) abans de la formació de la forma activa MetaII. Per altra banda també s'han obtingut els espectres d'absorció a diferents temps després de la il·luminació del mutant V300G observant-se la formació d'una banda a 470nm a temps inicials després de la il·luminació, banda que desapareix a temps elevats després de la il·luminació. Aquesta banda podria correspondre a la formació del fotointermediari MetaIII [Heck et al., 2003, Ramon et al. 2003b] (Figura IV.2.3.).

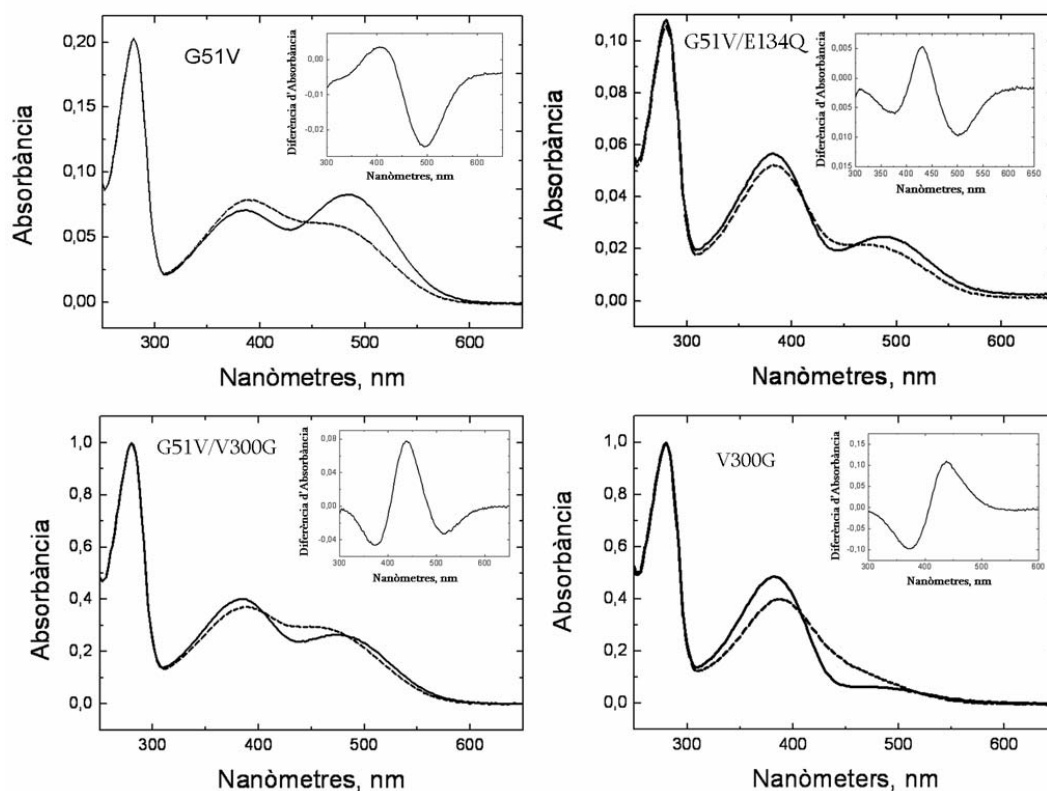


Figura IV.2.3. Espectres d'absorció a temps 0min després de la il·luminació (—) i a 10min després de la il·luminació (- -) dels mutants G51V, G51V/E134Q, G51V/V300G i V300G. Els espectres de diferència entre ambdós espectres es mostren a les corresponents insercions.

Assaig d'activació de transducina—la capacitat dels mutants G51A/E134Q, G51V/E134Q, V300G i G51V/V300G d'activar la transducina s'ha mesurat per espectroscòpia de fluorescència. L'increment de fluorescència a 340nm, que correspon a la corba d'activació, dels diferents mutants es mostra en la Figura IV.2.4. El valor màxim d'activació i la velocitat inicial d'activació de G_t per cada mutant respecte a la proteïna Wt es mostren en la Taula IV.2.3. El mutant G51A/E134Q presenta un màxim d'activació de transducina molt similar a l'obtingut per la proteïna Wt, amb un valor d'activació de 0.98 (1.00 per la proteïna Wt), mentre que el mutant G51V/E134Q presenta un màxim d'activació de 0.76. Els mutants V300G i G51V/V300G presenten una activació màxima reduïda respecte a la rodopsina Wt, amb uns màxims d'activació de 0.58 i 0.16 respectivament (Taula IV.2.3).

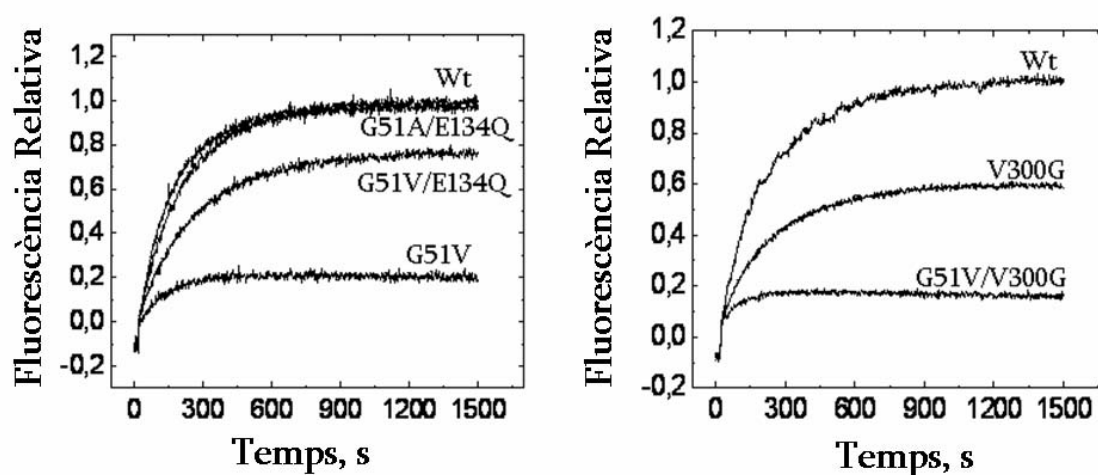


Figura IV.2.4. Corbes d'activació de G_t de les proteïnes Wt, G51V, G51A/E134Q, G51V/E134Q, V300G i G51V/V300G.

Proteïna recombinant	Màxim d'activació de G_t	Velocitat inicial d'activació de G_t	$t_{1/2}$ d'alliberament de retinal
Wt	1.00	1.00	11,6min
G51V	0.18	0.27	32% 2,1min 78% 38,5min
G51A/E134Q	0.98	0.81	----
G51V/E134Q	0.76	0.52	20% 7,7min 80% 28,8 min
V300G	0.58	0.42	45% 2,2min 55% 11,6min
G51V/V300G	0.16	0.19	45% 1,6min 55% 11,6min

Taula IV.2.3. Velocitat inicial d'activació, màxim d'activació de G_t i $t_{1/2}$ d'alliberament de retinal de les proteïnes d'estudi.

S'han determinat les velocitats inicials d'activació de transducina dels diferents mutants utilitzant els 60s inicials de la corba d'activació. El mutant G51A/E134Q encara que presenta una velocitat inicial d'activació reduïda respecte el Wt (0.81) aquesta no és significativa i podem dir que essencialment aquest mutant presenta la mateixa capacitat d'activació de transducina que la proteïna Wt. El mutant G51V/E134Q presenta una velocitat inicial d'activació de 0.52 i el mutant G51V presenta una reducció en la capacitat d'activar la transducina, respecte a la proteïna WT, d'aproximadament el 70% (0.27). La combinació de la mutació E134Q amb la mutació G51V augmenta un 20% la capacitat del receptor d'activar la transducina. En el cas dels mutants en la posició de 300 observem que ambdós presenten una reducció important en l'activació de transducina. El mutant V300G presenta una velocitat inicial d'activació de 0.42 respecte el Wt i el mutant G51V/V300G presenta una velocitat d'activació inicial de 0.19. La introducció de la mutació V300G en l'estructura de la proteïna G51V no millora la capacitat del receptor d'activar la transducina (Taula IV.2.3).

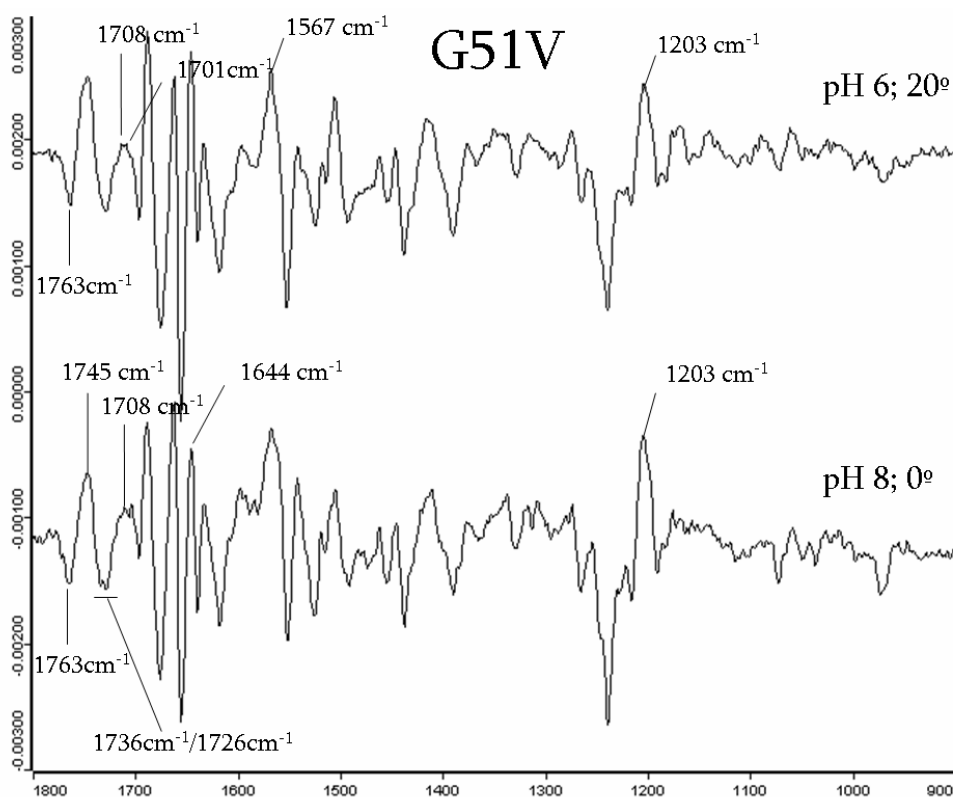
També s'ha mesurat el decaïment de la conformació activa MetaII per espectroscòpia de fluorescència, segons l'augment de fluorescència a 330nm que es produeix degut a l'alliberament del retinal. Els mutants G51V/E134Q, V300G i G51V/V300G presenten una corba exponencial d'alliberament de retinal de dues components, comportament que també s'observa en el cas de la proteïna G51V (Taula IV.2.3). Podem observar una correlació entre el valor màxim activació de transducina i el $t_{1/2}$ de la component d'alliberament ràpida del retinal. Els mutants que presenten un $t_{1/2}$ de la component ràpida més baix, component més inestable, també presenten menys capacitat màxima d'activació de transducina. Així doncs, el mutant G51V/V300G que presenta un percentatge de component d'alliberament ràpida del 45% amb un $t_{1/2}$ de 1.6min és el mutant que presenta una menor activació de G_t (0.16), seguit del mutant G51V amb un 32% de component d'alliberament ràpida i un $t_{1/2}$ de 2.1min. La component inestable del mutant G51V/E134Q representa a 20% de la proteïna total amb un $t_{1/2}$ de 7.7min, l'activació màxima de G_t del mutant és de 0.76 respecte el Wt (1.00).

Es va estudiar el comportament en front la il·luminació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G a diferents pH amb l'objectiu de determinar la influència del pH en la formació dels fotointermediaris alterats d'activació. Les proteïnes recombinants purificades es varen incubar durant tota la nit a 4°C en tampó 10mM BTP, 0.03% DM i a diferents pHs

(5-8). Es va observar que per a tots els pH d'estudi els mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G presentaven la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. Podríem dir que l'equilibri existent entre el fotointermediari alterat i l'espècie que absorbeix a 380nm no es veu gaire alterat pel canvi de pH del medi. De tota manera, el mutant G51V presenta una banda de formació d'intermediari alterat major a pH 6 respecte els altres pH d'estudi. Pel mutant G51V/E134Q la banda que correspon al fotointermediari alterat, a 490nm, és major com més àcid és el pH. I el mutant G51V/V300G presenta la banda corresponent al fotointermediari alterat (484nm) amb major intensitat a pH 8.

Espectroscòpia de FTIR—s'ha utilitzat la tècnica d'espectroscòpia de FTIR amb l'objectiu d'estudiar la conformació dels fotointermediaris alterats d'activació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G. L'espectre de FTIR de diferència del pigment, espectre de la mostra il·luminada menys espectre de la mostra en fosc, ens dóna informació sobre els canvis en la protonació dels aminoàcids, canvis en els ponts d'hidrogen existents, canvis d'estructura secundària, i canvis en la geometria del retinal. Per tal de portar a terme aquests experiments les proteïnes recombinants varen ser reconstituïdes en vesícules lipídiques (50% POPC, 40% POPE, 10% POPS). Els espectres de diferència d'UV-visible, espectre després de la il·luminació menys espectre en fosc en condicions de formació de MetaI (pH 8 i 0°C) i en condicions de formació de MetaII (pH 6 i 20°C), de les mostres reconstituïdes en vesícules mostren la formació dels fotointermediaris alterats d'activació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G (dades que no es mostren). A continuació es varen realitzar els espectres de FTIR de diferència d'aquests mutants reconstituïts en vesícules lipídiques. Els resultats obtinguts mostren que cap dels mutants presenta una conformació clàssica de MetaI o MetaII en les condicions de treball (Figura IV.2.6). Els espectres de FTIR dels diferents mutants presenten bandes típiques de MetaI i MetaII potser com a resultat de la formació d'un fotointermediari amb característiques d'ambdós fotointermediaris. A pH 8 i 0°C, condicions de formació de MetaI, els espectres de FTIR de diferència dels diferents mutants presenten bandes típiques de formació de MetaII, bandes a 1763cm^{-1} , 1745cm^{-1} , 1708cm^{-1} i a 1644cm^{-1} . No obstant això, la presència del doblet $1726\text{cm}^{-1}/1736\text{cm}^{-1}$ indica la presència de característiques conformacionals de MetaI. Pel mutant G51V/V300G s'observa un espectre més clar de formació de MetaI, aquest espectre presenta les bandes característiques de MetaI

1726cm^{-1} , 1736cm^{-1} , 1701cm^{-1} i 1540cm^{-1} . Els espectres de FTIR de diferència a pH 6 i 20°C , condicions de formació de MetaII, mostren també que tots aquests mutants presenten una conformació atípica de MetaII amb la base de Schiff protonada. Aquesta espècie presenta una banda a 1203cm^{-1} assignada a l'estirament de l'enllaç C=N de la base de Schiff protonada i la banda a 1567cm^{-1} degut a la vibració de l'enllaç C=C del retinal. També apareix una banda a 1708cm^{-1} assignada al contraí protonat. En una conformació típica de MetaII aquesta banda apareix a 1713cm^{-1} però degut a la càrrega present encara en la base de Schiff s'observa un desplaçament de la banda a 1708cm^{-1} . En l'espectre apareixen bandes típiques de la conformació MetaII com serien les bandes a 1763cm^{-1} , 1745cm^{-1} , 1708cm^{-1} i a 1644cm^{-1} i també bandes característiques de la conformació MetaI com seria la banda a 1701cm^{-1} , i el doblet $1726\text{cm}^{-1}/1736\text{cm}^{-1}$. Els mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G presenten uns espectres de FTIR de diferència amb característiques de MetaI i MetaII tant en condicions típiques de formació de MetaI com en condicions típiques de formació de MetaII, indicant que possiblement estaríem davant la formació d'un fotointermediari alterat amb característiques conformacionals d'ambdós fotointermediaris (Figura IV.2.6).



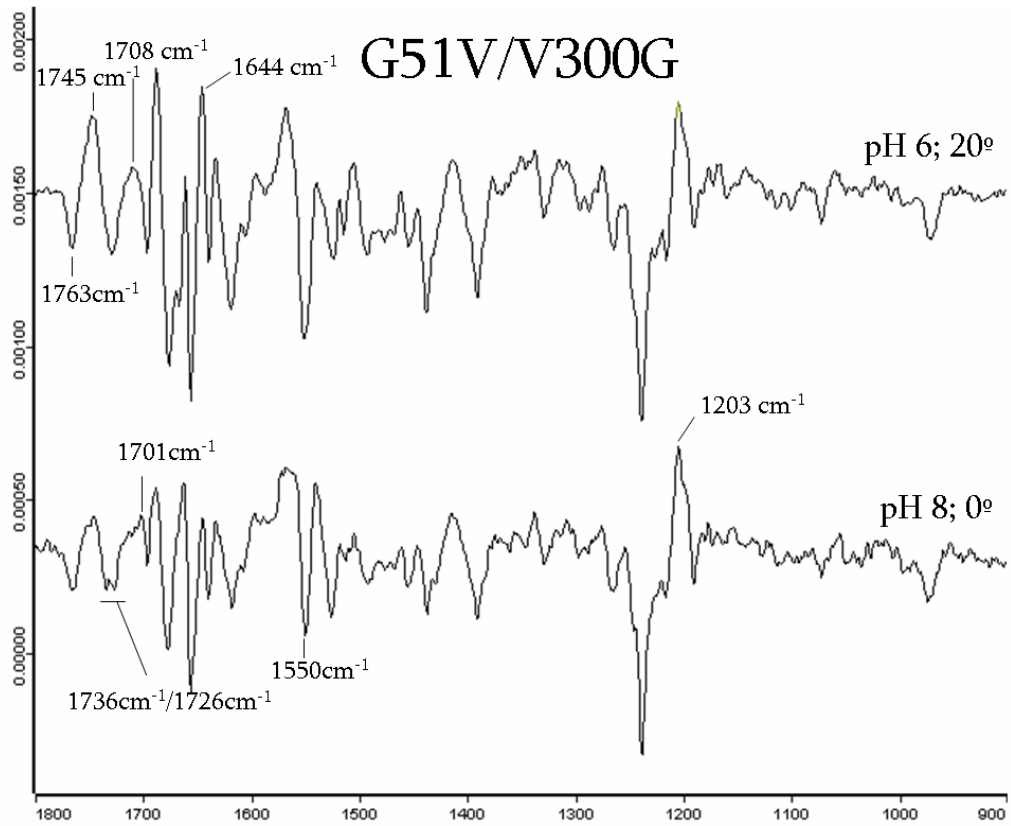
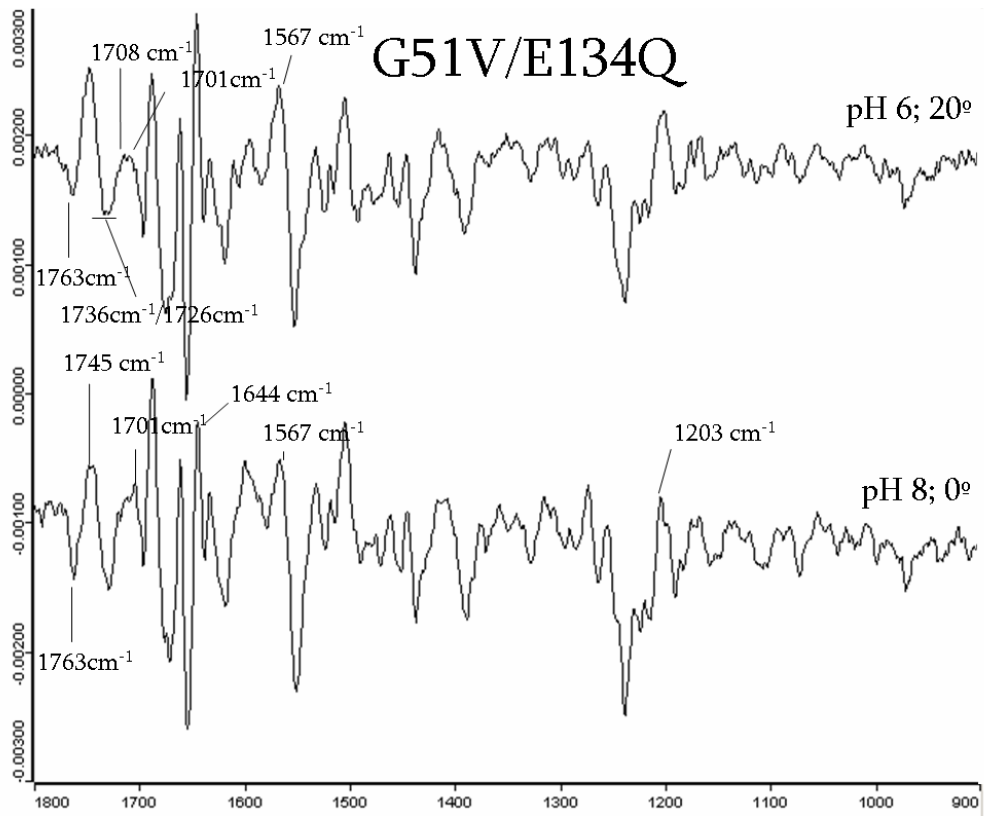


Figura IV.2.6. Espectres de FTIR de diferència a pH 8 i 0°C (condicions de formació de Metal) i pH 6 i 20°C (condicions de formació de MetalII) pels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G.

IV.2.4. DISCUSSIÓ

Els mutants d'adRP G51V i G89D presenten un procés de fotoactivació alterat, amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació que es troba en equilibri amb les espècies que absorbeixen a 380nm, descrites com a MetaII. A més, la conformació activa d'aquests mutants és menys estable que la conformació activa de la proteïna Wt, fet que es pot relacionar amb la capacitat màxima d'activació de transducina. Així doncs, el mutant G51V que presenta una conformació MetaII més inestable que el mutant G89D també presenta menys capacitat d'activar la transducina (0.20 pel G51V i 0.57 pel G89D). Amb la finalitat de conèixer l'efecte de la mutació G51V en l'estructura i funció de la rodopsina s'han introduït les mutacions E134Q i V300G en l'estructura d'aquest mutant. S'ha descrit anteriorment que la mutació E134Q facilita la formació de MetaII induïda per la llum [Zhukovsky et al., 1989]. Si tal i com s'havia hipotetitzat el mutant G51V queda atrapat, durant el procés de fotoactivació, en un fotointermediari alterat d'activació, previ a la MetaII, hauríem d'esperar que la introducció de la mutació E134Q en l'estructura d'aquest mutant revertís parcialment o en la seva totalitat l'efecte causat per la mutació, tal i com succeeix en els nostres experiments. Per altra banda, també s'ha introduït la mutació V300G en l'estructura del mutant G51V amb la finalitat de confirmar la hipòtesi que la introducció d'una Val en la posició 51 causaria un impediment estèric en la Val-300. Els dobles mutants G51V/E134Q i G51V/V300G formen cromòfor igual que la proteïna Wt però presenten, igual que el mutant G51V, un procés de fotoactivació anòmal amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. Aquests dobles mutants presenten però una reducció en la formació del fotointermediari alterat si ho comparem amb el resultat obtingut pel mutant G51V. A més, el mutant G51V/E134Q presenta una millora important en la capacitat d'activar transducina (0.76 G51V/E134Q i 0.18 G51V). Podem dir doncs, que la introducció de la mutació E134Q en l'estructura del mutant G51V no és suficient per revertir l'efecte de la mutació G51V en la seva totalitat però sí que observem un augment important en la funcionalitat del receptor. Contràriament, la introducció de la mutació V300G en l'estructura del mutant G51V no es tradueix en un augment en la funcionalitat del receptor. Així doncs, la introducció d'una Val a la posició 51 probablement no causaria un impediment estèric important en la Val-300 que alterés l'estructura del receptor conduïnt a una conformació inestable que seria la primera causa molecular de l'adRP lligada a aquesta mutació. També es varen estudiar les mutacions

G51A/E134Q i V300G amb la finalitat de conèixer quin era l'efecte de les mutacions introduïdes. El mutant G51A/E134Q presenta un comportament general similar a la proteïna Wt tant en front la il·luminació com en la seva capacitat d'activar la transducina. El mutant V300G però, presenta característiques diferencials respecte a la proteïna Wt amb una alliberació de retinal bifàsica i una activació de G_i reduïda aproximadament un 50% respecte a la proteïna Wt. En aquest cas, l'alliberament de retinal de doble component es pot atribuir a la formació, a temps baixos després de la il·luminació, d'una quantitat important de fotointermediari MetaIII [Heck et al., 2003, Ramon et al. 2003b].

Els fotointermediaris alterats que es formen en el procés de fotoactivació dels mutant G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G s'han estudiat per espectroscòpia FTIR. Els resultats obtinguts indiquen que cap dels mutants presenta, en les diferents condicions de treball, una conformació típica de MetaI o MetaII. Una primera hipòtesi seria que els fotointermediaris alterats que es formen tinguessin una conformació que es coneix com a MetaIIPSB, MetaII amb la base de Schiff protonada [Vogel et al., 2001]. L'espectre de FTIR corresponent a la conformació MetaIIPSB és un espectre de FTIR típic de conformació MetaII però amb bandes que indiquen la presència de la base de Schiff protonada. En el nostre cas però, els espectres de FTIR dels diferents fotointermediaris alterats presenten en la zona d'absorció dels enllaços peptídics coneguda com a Amida I (1600^{-1} - 1700cm^{-1}), característics dels pont d'H presents en l'estructura, diferències importants respecte l'espectre típic de la conformació MetaII, i a més, en els espectres s'observen bandes característiques de la conformació MetaI. Per altra banda, contràriament als resultats obtinguts per nosaltres en el present treball, s'ha descrit que l'equilibri dels estats protonats de la conformació MetaII, l'equilibri MetaIIPBS-MetaII380, depèn del pH i no es veu influenciat pel pèptid $G\alpha$ -HAA, factor aquest últim que té una gran influència en l'equilibri MetaI-MetaII. Així doncs, ens plantegem la possibilitat de que els fotointermediaris que es formen, en equilibri amb la conformació MetaII, siguin conformacions intermèdies entre el que es coneix com a conformacions clàssiques MetaI i MetaII. Podria ser que aquests mutants presentessin la formació inicial del fotointermediari MetaI, reanomenada MetaIa ($\lambda_{\text{max}}=485$), que decauria en el temps a la conformació que es coneix com a MetaIb ($\lambda_{\text{max}}=465\text{nm}$) [Shichida and Morizumi, 2006]. Aquest fotointermediari MetaIb presentaria canvis estructurals respecte a la conformació MetaIa que probablement l'acostarien a la conformació MetaII [Shichida and

Morizumi, 2006]. La introducció d'una Val en la posició 51 faria que el receptor quedés atrapat entre les conformacions clàssiques MetaI i MetaII, possiblement en el fotointermediari MetaIb (Figura IV.2.7).



Figura IV.2.7. Equilibri descrit entre els fotointermediaris de Metarodopsina [Shichida et al., 2006]. Els fotointermediaris MetaIa, MetaIb i MetaII es troben en equilibri i aquest equilibri és desplaçat cap a la forma activa MetaII en presència de G_t.

La introducció de la mutació G51V en l'estructura de la rodopsina probablement implicaria una reorganització de les hèlixes I, II i VII afectant les interaccions entre els aminoàcids implicats en l'equilibri MetaI-MetaII [Breikers et al., 2001; Okada et al., 2002]. L'Asp-83 en l'hèlix II té un paper crucial en la formació de MetaII, mutacions en aquest aminoàcid afecten l'equilibri MetaI-MetaII. També s'ha descrit que durant el procés de fotoactivació les interaccions en l'entorn de l'Asp-83 canvien [Lehmann et al., 2006]. Aquest aminoàcid interacciona amb el motiu conservat NPXXY, en l'hèlix VII, a través d'un grup de molècules d'aigua i amb la Ans-55 -en l'hèlix I- a través de ponts d'hidrogen. La mutació G51V introduiria canvis en l'entorn de l'Asp-83, modificant les interaccions implicades en l'equilibri MetaI-MetaII i fent que aquest equilibri es trobés fortament desplaçat cap a la formació d'un fotointermediari alterat d'activació i no cap a la forma activa MetaII (Figura IV.2.8.). El desplaçament d'aquest equilibri cap al fotointermediari alterat d'activació –que seria inactiu- i la inestabilitat de la conformació activa MetaII dels mutants G51V i G89D podrien ser els defectes moleculars subjacents que disparen el conjunt de processos bioquímics que condueixen en darrer terme a la degeneració de la retina en l'adRP.

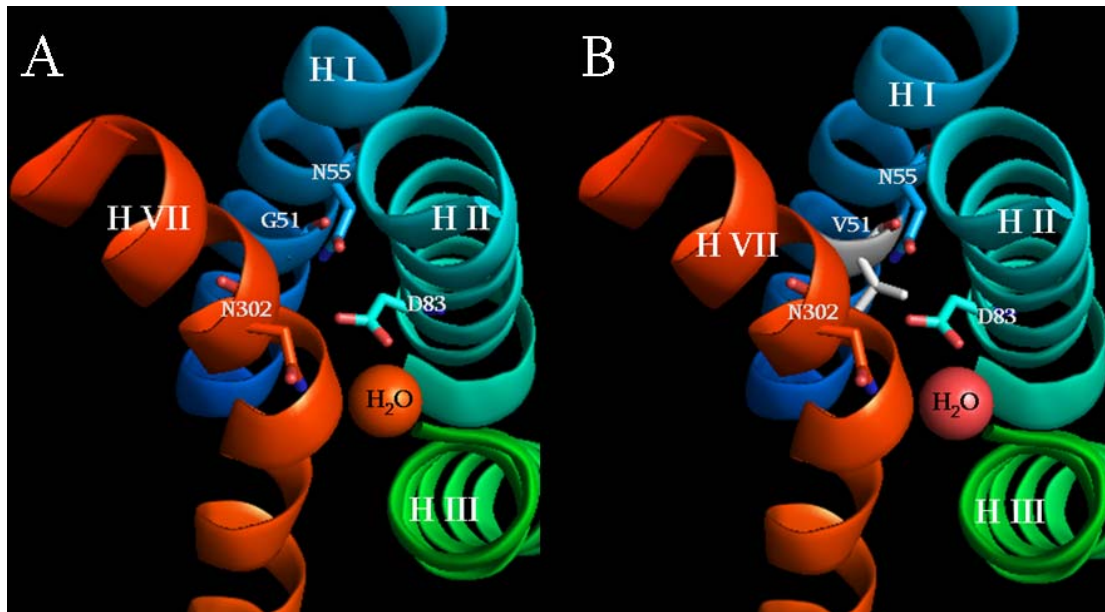


Figura IV.2.8. A. Model de l'estructura de la proteïna Wt centrada en els aminoàcids Asp-83, Asn-55 i Asn-302 implicats en l'equilibri MetaI-MetaII. B. Model del mutant G51V també centrada en els aminoàcids Asp-83, Asn-55 i Asn-302.