

Discussió General

En aquest treball s'han estudiat diferents aspectes de la cascada de fototransducció visual. Des de l'alteració del procés de fotoactivació causat per mutacions associades amb adRP, fins a l'efecte de la introducció d'un grup metil en l'estructura del lligand natural, 11-*cis*-retinal, passant per la determinació dels aminoàcids implicats en el reconeixement i/o activació de la proteïna G_t. Els mutants G51A, G51V i G89D, que causen adRP, s'han analitzat en detall, així com també, diferents mutacions no naturals en les posicions 51 i 89 del receptor amb la finalitat de conèixer el paper estructural i funcional de les hèlices I i II de la rodopsina. La posició 51 forma part del motiu conservat en la superfamília de GPCRs, GXXXN. En aquesta posició s'han estudiat els mutants d'adRP G51A i G51V i el mutant no natural G51L. Aquests mutants presenten, respecte a la proteïna Wt, inestabilitat tèrmica en fosc i després de la fotoactivació. Aquest efecte és més important com més gran és la cadena lateral de l'aminoàcid introduït. A més, les mutacions G51V i G51L presenten un comportament anòmal en front la il·luminació amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. També el volum de la cadena lateral introduïda és pot relacionar amb la capacitat dels diferents mutants d'activar la transducina. Així doncs, el mutant G51L no presenta activació de transducina, el mutant G51V presenta aproximadament un 20% d'activació i el mutant G51A presenta una activació de transducina similar a la de la proteïna Wt (95%). La introducció d'una cadena lateral voluminosa en la posició 51 podria afectar l'empaquetament de les hèlices transmembrana pertorbant les interaccions entre les hèlices I, II i VII, que tindrien un paper important en l'estabilitat de la conformació inactiva i en el pas a la conformació activa, MetaII [Lehmann et al., 2006, Okada et al., 2002]. S'ha especulat que l'impediment estèric introduït per aquestes mutacions podria ser causat pel contacte de l'aminoàcid introduït en la posició 51 amb la Val-300, que resultaria en una pertorbació de la Pro-303 del motiu NPXXY de l'hèlix VII [Abdulaev, 2003; Bosch et al., 2003] (Figura V.1.)

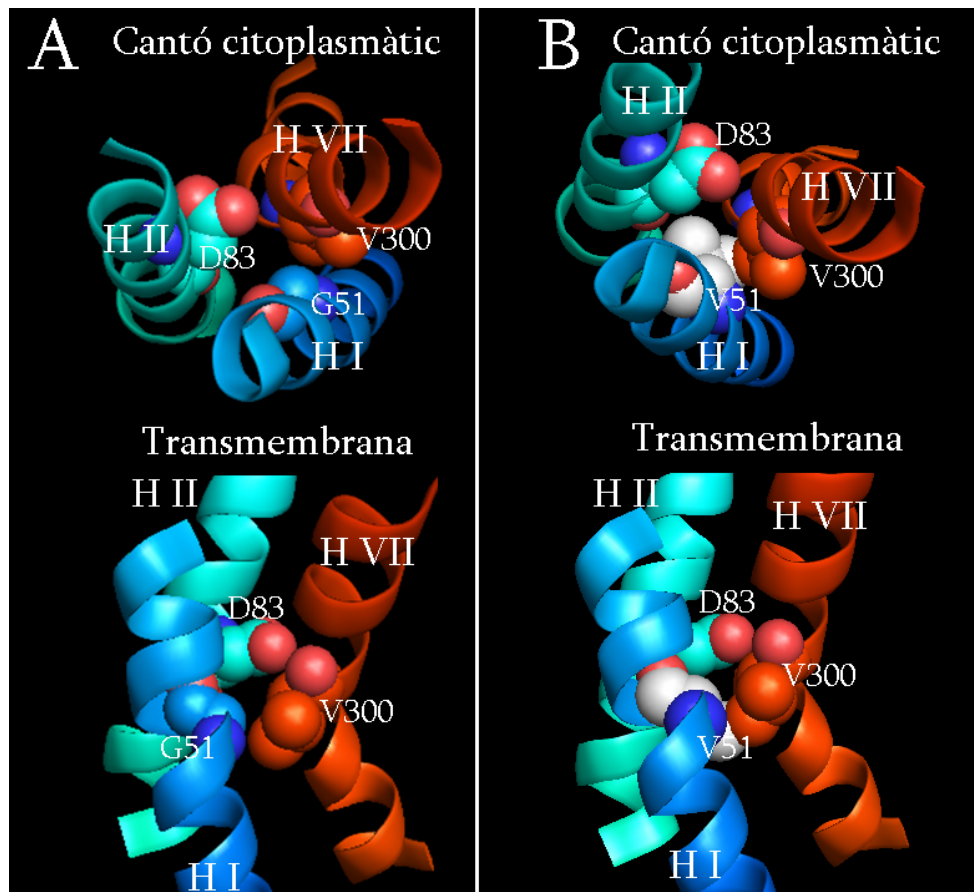


Figura V.1. Model molecular de la rodopsina centrat en les hèlices I, II i VII vist des del cantó citoplasmàtic o des de la transmembrana. A. Model de la rodopsina Wt en el que es mostren la Gly-51, Asp-83 i Val-300. B. Model pel mutant G51V en el que s'observa que la introducció d'una Val en la posició 51 causaria un impediment estèric amb la Val-300 i introduiria modificacions en les interaccions de les hèlices I, II i VII.

En el cas de les mutacions en la posició 89, més que el volum de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït, el que tindria importància seria la càrrega de la cadena lateral de l'aminoàcid intercanviat. El mutant d'adRP G89D presenta un procés de fotoactivació anòmal i una capacitat d'activar la transducina reduïda, del 50%, respecte la proteïna Wt. Sembla que la Gly-89 conjuntament amb la Gly-90 i una molècula d'aigua formen una cavitat propera a la base de Schiff i que la introducció d'una càrrega en aquesta cavitat podria desestabilitzar l'entorn del retinal (Figura V.2.). La introducció d'una Lys en la posició 89 també faria disminuir l'activació de transducina fins un 40%, aproximadament. A més, l'espectre del mutant G89K en foscor presenta dues bandes d'absorció en l'UV-visible, una a 500nm i una altra a 350nm, que corresponen a espècies unides al retinal a través d'una base de Schiff. Amb la finalitat de comprovar si el retinal s'unia a la Lys introduïda en la

posició 89 via base de Schiff no protonada es va construir el doble mutant G89K/K296G. El doble mutant, però, expressat en cèl·lules COS-1 no regenera amb l'11-*cis*-retinal. Així doncs, la banda d'absorció a 350nm, que s'observa en l'espectre de la conformació inactiva del mutant G89K, és deguda a que la presència d'una Lys en la posició 89 introdueix una càrrega positiva en l'entorn de la base de Schiff i afecta la longitud d'ona d'absorció del pigment.

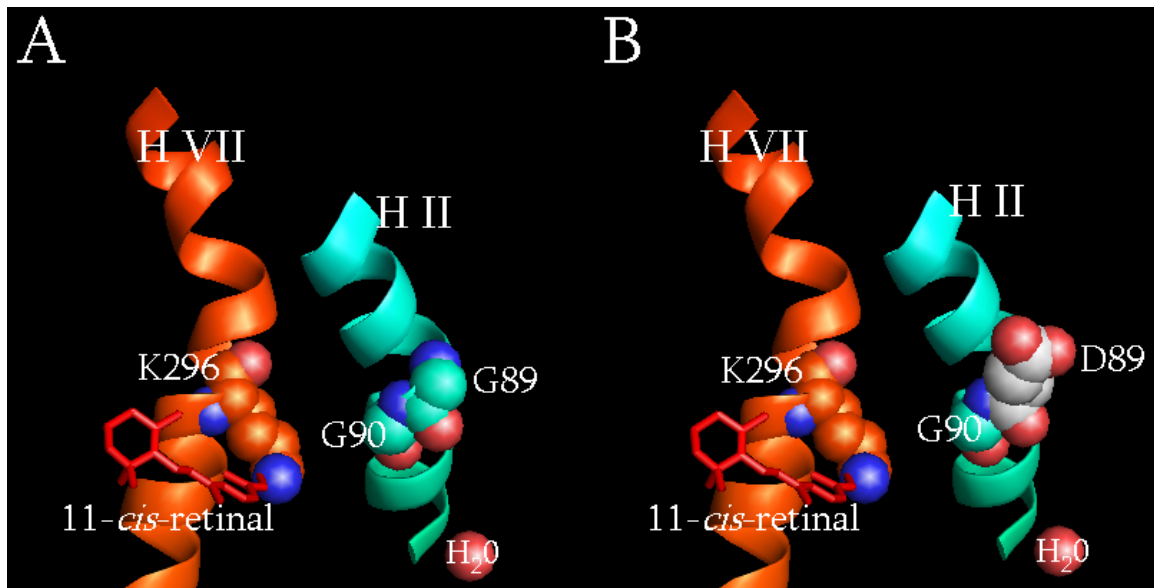


Figura V.2. Model molecular de la rodopsina centrat en l'entorn de la base de Schiff. A. Model de la rodopsina Wt en el que es mostra la Gly-89, Gly-90 conjuntament amb una molècula d'aigua en l'entorn de la base de Schiff. B. Model pel mutant G89D també en l'entorn de la base de Schiff, la introducció d'una càrrega desestabilitzaria la base de Schiff.

Com ja s'ha dit, els mutants d'adRP G51V i G89D presenten un procés de fotoactivació anòmal amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. La formació d'aquest fotointermediari alterat podria ser una de les causes últimes de l'adRP. Per aquest motiu, ens vàrem plantejar aprofundir en l'estudi del procés de fotoactivació d'aquests mutants. Els fotointermediaris alterats que es formen en la fotoactivació dels mutants G51V i G89D són espècies inactives que es troben en equilibri amb el fotointermediari actiu, MetaII. A més, però, les espècies actives dels mutants G51V i G89D són inestables respecte a la conformació activa de la proteïna Wt. Així doncs, el mutant G51V que presenta una conformació activa més inestable presenta també una capacitat menor d'activació de transducina (20% d'activació pel mutant G51V i 50% d'activació pel mutant G89D).

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 [Abdulaev, 2003; Bosch e tal., 2003]. Per tal de clarificar l'efecte de la mutació G51V en l'estructura i en la funcionalitat del receptor es varen construir 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 [Vogel et al., 2006; Bartl et al., 2005; Fahmy et al., 2000; 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 l'espècie activa, MetaII. Per altra banda, la mutació V300G es va 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 dobles mutants G51V/E134Q i G51V/V300G presenten un procés de fotoactivació anòmal, igual que el mutant G51V, però amb una reducció de la formació de fotointermediari alterat respecte aquest mutant. També es va observar que durant el procés de decaïment de la banda corresponent al fotointermediari alterat d'activació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G (bandes a 484nm, a 490nm i a 484nm, respectivament) es veu la formació d'un altre fotointermediari ($\lambda_{\text{màx}}=470-465$) abans de passar a l'espècie activa que absorbeix a 380nm. S'ha proposat recentment l'existència d'un equilibri entre l'espècie MetaI -reanomenada MetaIa ($\lambda_{\text{màx}}=485\text{nm}$)-, i un fotointermediari MetaIb ($\lambda_{\text{màx}}=465\text{nm}$), que al mateix temps en troba en equilibri amb l'espècie activa MetaII ($\lambda_{\text{màx}}=380\text{nm}$) [Shichida and Morizumi, 2006]. Així doncs, durant el procés de fotoactivació d'aquests mutants podríem estar observant una alteració de l'equilibri existent entre aquestes conformacions, amb la formació a temps inicials després de la il·luminació del fotointermediari MetaIa i el seu pas posterior al fotointermediari MetaIb.

També es va determinar l'estabilitat de la conformació activa, MetaII, dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G, segons l'alliberament de retinal, així com la capacitat d'aquests mutants per activar la transducina. Els mutants G51V/E134Q, V300G i G51V/V300G presenten una corba exponencial d'alliberament de retinal de dues components, una component d'alliberament ràpid i una component d'alliberament lent. Per

aquests mutants podem observar una correlació entre el valor màxim activació de transducina i el $t_{1/2}$ de la component ràpida d'alliberament de 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 ràpida d'alliberament del 45% amb un $t_{1/2}$ de 1.6min és el mutant que presenta una menor activació de G_t (16%), seguit del mutant G51V amb un 32% de component ràpida d'alliberament 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 transducina del mutant és de 76% respecte el Wt (100%). La introducció de la mutació E134Q en l'estructura del mutant G51V no és suficient per revertir l'efecte introduït per la mutació G51V però sí que recupera en part la funcionalitat del receptor. Pel contrari, la introducció de la mutació V300G en l'estructura del mutant G51V no es tradueix en un augment en la funcionalitat del receptor.

Per tal de determinar la conformació dels fotointermediaris alterats que es formen en el procés d'activació dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G es varen realitzar els espectres de FTIR de diferència -espectre després de la il·luminació menys espectre en fosc- pels diferents mutants. En les diferents condicions de treball, condicions de formació de MetaI (pH 8; 0°C) i condicions de formació de MetaII (pH 6; 20°C), no s'observa per cap dels mutants un espectre de FTIR de diferència típic de les conformacions MetaI i MetaII, sinó que s'obtenen uns espectres amb bandes característiques d'ambdós fotointermediaris però amb diferències importants en la zona d'absorció dels enllaços peptídics, coneguda com Amida I. El conjunt d'experiments realitzats per aquests mutants permeten proposar que estaríem observant la formació inicial, a temps curts després de la il·luminació, del fotointermediari MetaIa i el seu pas a la conformació MetaIb, fotointermediari en equilibri amb la forma activa que presentaria un canvi conformacional respecte la MetaIa que l'aproparia al fotointermediari actiu, MetaII. La introducció d'aquestes mutacions provocaria canvis en les interaccions entre les hèlices I, II i VII responsables del manteniment de la conformació inactiva i de l'equilibri entre les conformacions MetaI i MetaII [Breikers et al., 2001; Okada et al., 2002]. L'Asp-83 en l'hèlix II té un paper crucial en l'equilibri MetaI-MetaII. 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, hèlix I, a

través de ponts d'hidrogen. La mutació G51V introduiria canvis en l'entorn de l'Asp-83 (Figura V.1.), modificant les interaccions implicades en l'equilibri MetaI-MetaII i fent que aquest equilibri es trobés desplaçat cap a la formació d'un fotointermediari alterat d'activació (Figura V.3.). La xarxa electrostàtica implicada en l'equilibri MetaI-MetaII podria ser més complexa del que està descrit fins el moment, implicant altres aminoàcids d'aquestes hèlices I, II i VII. L'alteració d'aquesta xarxa electrostàtica afectaria el procés d'activació del receptor, amb canvis en l'estabilitat dels fotointermediaris d'activació.

Per altra banda, també s'ha caracteritzat el receptor rodopsina regenerat amb l'anàleg sintètic 11-*cis*-7-metilretinal per tal d'elucidar si en la isomerització del cromòfor de 11-*cis* a tot-*trans* té lloc el gir de l'anell, de C6-C7-*s-cis* a C6-C7-*s-trans*, i quin seria l'efecte d'aquest gir en el procés de fototransducció visual [Albeck et al., 1989; Jang et al., 2001]. La proteïna Wt regenerada amb l'anàleg 11-*cis*-7-metilretinal (7-metil-Rho) forma cromòfor de forma similar a la proteïna Wt regenerada amb 11-*cis*-retinal (Rho) però amb un desplaçament de la $\lambda_{\text{màx}}$ a 490nm. A més, la proteïna 7-metil-Rho presenta un procés de fotoactivació anòmal amb la formació de dues bandes d'absorció després de la il·luminació, una a 373nm i una altra a 467nm. Ambdues espècies que es formen estarien unides a través d'una base de Schiff al retinal, ja que, en l'acidificació de la mostra s'observa la formació d'una sola banda a 427nm. El receptor 7-metil-Rho no presenta reactivitat en front la hidroxilamina, indicant que aquest mutant tindria una estructura compacte entorn de la base de Schiff. L'estabilitat tèrmica, però, de la proteïna 7-metil-Rho en foscó és menor que la de la proteïna Rho ($t_{1/2}$ =4.6min i $t_{1/2}$ =13.1min, respectivament). També s'ha observat que la banda que es forma en el procés de fotoactivació de la 7-metil-Rho a 465nm, que correspon al fotointermediari alterat d'activació, decau amb el temps a una espècie que absorbeix a 485nm. Aquesta última espècie, però, és estable i no s'observa el seu decaïment en el temps (temps<150min) a l'espècie que absorbeix a 380nm, MetaII. Amb la finalitat d'aprofundir en el comportament del receptor regenerat amb 11-*cis*-7-metilretinal es va caracteritzar el mutant E134Q regenerat també amb aquest anàleg sintètic (7-metil-E134Q). Tal i com ja s'ha comentat, aquesta mutació mimetitzava l'estat protonat de la rodopsina fotoactivada i facilita la formació de l'estat actiu MetaII [Vogel et al., 2006; Bartl et al., 2005; Fahmy et al., 2000; Zhukovsky et al., 1989]. La proteïna 7-metil-E134Q forma cromòfor amb una $\lambda_{\text{màx}}$ a 490nm i presenta un procés de fotoactivació anòmal, amb la formació de

dues bandes d'absorció, una a 373nm i una altra a 485nm. Per tal de saber si els fotointermediaris alterats que es formen en el procés de fotoactivació de les proteïnes 7-metil-rho i 7-metil-E134Q es troben en equilibri amb les espècies que absorbeixen a 373nm es varen portar a terme una sèrie d'experiments en presència de pèptid G α -HAA [Bartl et al., 2000; Herrmann et al., 2004; Martin et al., 1996]. En el cas del mutant 7-metil-E134Q la presència de 100 μ M de pèptid fa que després de la fotoactivació només es formi l'espècie que absorbeix a 373nm. Pel contrari, en presència de 100 μ M de pèptid G α -HAA el fotointermediari que es forma per la proteïna 7-metil-Rho no es desplaça a l'espècie que absorbeix a 373nm, sinó que fa falta una concentració major de pèptid (1mM) per tal de poder desplaçar l'equilibri existent entre ambdues conformacions. Així doncs, els fotointermediaris que es formen en el procés d'activació d'aquestes dues proteïnes es troben en equilibri amb les espècies que absorbeixen a 373nm. En el cas del receptor 7-metil-Rho aquest equilibri estaria fortament desplaçat cap al fotointermediari alterat d'activació i per això faria falta una concentració major de pèptid per tal de desplaçar l'equilibri cap a la conformació activa. En el cas de la proteïna 7-metil-E134Q l'equilibri es desplaçaria amb menys concentració de pèptid G α -HAA, ja que la mutació E134Q facilita *per se* el pas a la conformació MetaII. Els resultats experimentals obtinguts ens fan pensar que la introducció d'un grup metil en el C7 del retinal fa que el receptor quedi atrapat durant el procés de fotoactivació en la conformació MetaIa ($\lambda_{\text{màx}}=485\text{nm}$) [Shichida and Morizumi, 2006] (Figura V.3.).

També es va determinar la capacitat de les proteïnes 7-metil-rho i 7-metil-E134Q d'activar la transducina. La velocitat inicial d'activació de transducina d'ambdues proteïnes és pràcticament igual a la velocitat inicial d'activació de la proteïna Wt regenerada amb 11-*cis*-retinal. La capacitat màxima d'activació d'aquests receptors, però, es veu reduïda en un 50%, que podria correspondre a la quantitat de proteïna que hauria passat a la conformació activa, espècies que absorbeixen a 373nm, després de la fotoactivació. Les proteïnes 7-metil-rho i 7-metil-E134Q presenten un equilibri entre el fotointermediari alterat i la conformació activa MetaII fortament desplaçat cap al fotointermediari alterat. Podria ser que en les condicions experimentals d'activació de transducina (250nM transducina) no tingués lloc el desplaçament d'aquest equilibri a la conformació activa del receptor. La capacitat màxima de les proteïnes 7-metil-rho i 7-metil-E134Q d'activar la transducina, un 50% d'activació de

transducina respecte a la proteïna Rho, correspondria al percentatge de proteïna que hauria passat a la conformació activa, conformació activa estable amb una capacitat d'activació de transducina similar a la conformació MetaII de la proteïna Wt regenerada amb 11-*cis*-retinal.

Segons els experiments de modelització molecular fets per Arnau Cordoní en el grup del Prof. J.J. Pérez (Secció de Barcelona, Departament d'Enginyeria Química, UPC), la introducció d'un grup metil en el C7 tindria una influència directe sobre la Met-207. Això és interessant ja que s'ha vist que la Met-207 interacciona amb l'anell β -ionona del retinal en el fotointermediari MetaII [Saam et al, 2002; Crocker et al., 2006]. La introducció d'un grup metil en el C7 del retinal provocaria una reorientació de l'anell β -ionona que causaria canvis d'orientació o moviments en els aminoàcids Leu-125, Phe-212, Trp-265 i Glu-122. Aquests canvis, però, són molt subtils i es podria dir que la cavitat d'unió al lligand podria acomodar aquest anàleg igual que el lligand natural, 11-*cis*-retinal. Un cop el retinal, però, ha passat a la seva conformació tot-*trans* l'anell de β -ionona es veu obligat a ocupar altres sub-cavitats, degut al seu pas a una conformació tipus "L" (conformació tipus "U" en 11-*cis*). Les simulacions fetes amb les proteïnes Rho i la 7-metil-Rho amb el retinal en conformació tot-*trans* suggereixen un canvi de localització del l'anell β -ionona en la proteïna 7-metil-Rho degut al grup metil en el C7 del retinal [Bosch et al., 2006]. En la Rho, l'anell β -ionona interacciona després de la fotoactivació amb els residus Glu-122, Cys-167, His-211, Thr-118, Ile-189 i Met-207. En el cas de la proteïna 7-metil-Rho la diferència més important que s'observa és que l'anell β -ionona és troba en el costat oposat de la Met-207, respecte la proteïna Rho. El grup metil del C7 del retinal en fosc es troba proper a la Met-207 i al Glu-122 mentre que després de la il·luminació se situaria a prop de la Thr-118 i la Met-207 (Figura IV.3.7). Així, la introducció d'un grup metil en el C7 del retinal afectaria el pas a la conformació activa MetaII, atrapant el receptor en un fotointermediari previ a l'estat actiu. És interessant constatar que s'ha descrit que la mutació M207R causa adRP [Farrar et al., 1992]. A més, en un estudi teòric recent, basat en simulacions de mecànica quàntica, s'ha proposat que la M207R presentaria un procés de fotoactivació anòmal [Padron-Garcia et al., 2004]. Actualment en el nostre laboratori s'està estudiant el mutant natural d'adRP M207R conjuntament amb altres mutants en aquesta posició (M207A, M207G, M207C) per tal d'elucidar el paper d'aquest residu en la unió del retinal i en el

procés de fotoactivació del receptor. Un altre experiment interessant a portar terme seria la caracterització de la proteïna Wt regenerada amb l'anàleg 11-*cis*-7-etilretinal amb la finalitat d'aprofundir en l'estudi de la interacció entre la opsina i el retinal.

Així doncs, els mutants d'adRP G51V i G89D i la proteïna Wt regenerada amb l'anàleg 11-*cis*-7-metilretinal presenten un procés de fotoactivació anòmal, amb la formació d'un fotointmediari alterat d'activació. Proposem que la formació d'aquests fotointmediaris alterats seria conseqüència de l'alteració de l'equilibri existent entre les conformacions MetaI i MetaII. Com ja ha estat proposat prèviament [Shichida and Morizumi, 2006], aquest equilibri seria més complex i hi hauria, en principi, tres espècies en equilibri; MetaIa (485nm), MetaIb (465nm) i MetaII (380nm) (Figura V.3.). En el cas dels mutants d'adRP l'equilibri es trobaria desplaçat cap al fotointmediari MetaIb (465nm) i en el cas de les proteïnes regenerades amb 11-*cis*-7-metilretinal aquest equilibri es trobaria desplaçat cap al fotointmediari MetaIa (485nm). El fet de que, en el cas de les proteïnes regenerades amb 11-*cis*-7-metilretinal, l'equilibri estigués desplaçat a la conformació MetaIa faria més difícil la formació de l'espècia activa MetaII, tal i com es pot deduir dels resultats experimentals obtinguts. Un esquema dels possibles equilibris entre aquestes conformacions es mostra a la Figura V.3.

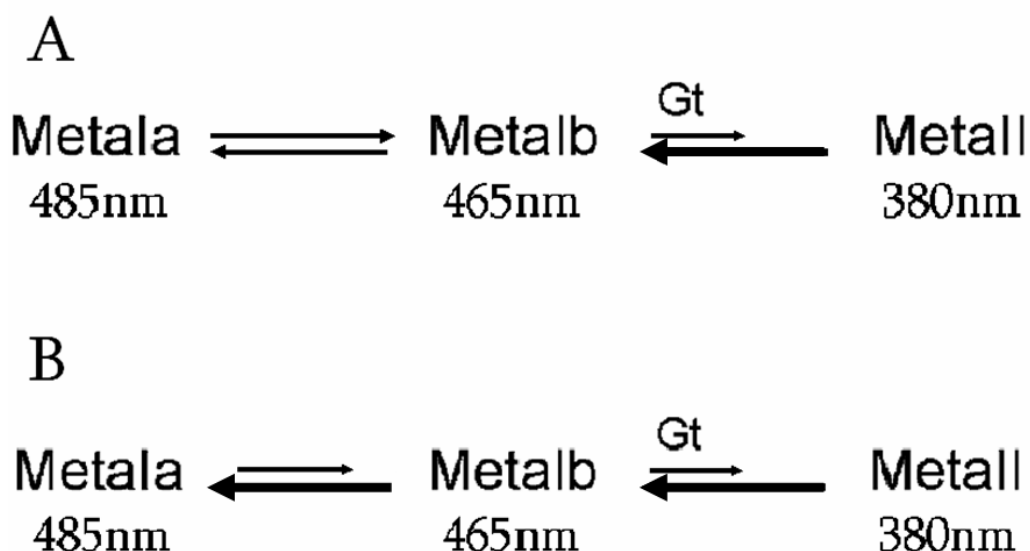


Figura V.3. Equilibri existent proposat per Shichida i Morizumi (2006) entre les conformacions MetaIa, MetaIb i MetaII, modificat segons els resultats experimentals obtinguts. A. Equilibris existents entre les conformacions MetaIa, MetaIb i MetaII pels mutants d'adRP G51V i G89D. B. Equilibris existents entre les conformacions MetaIa, MetaIb i MetaII pels receptors regenerats amb 11-*cis*-7-metilretinal.

Per altra banda, també s'ha volgut determinar quins aminoàcids de les nanses C-II i C-III del receptor podrien estar implicats en el reconeixement i/o activació de la proteïna G_t . Es varen construir diferents mutants rodopsina-M3 muscarínic en les nanses C-II i C-III de la rodopsina amb la finalitat de provocar un canvi d'especificitat del receptor de la transducina a la proteïna G_q . Els diferents mutants rodopsina-M3 de les nanses C-II i C-III presenten formació de cromòfor igual que la rodopsina Wt i també presenten el mateix comportament en front la il·luminació i acidificació que la proteïna Wt, suggerint que aquests mutants segueixen la mateixa cascada de fotoactivació que el receptor Wt. Els mutants V138S, AALS, V227Y/AALS, VVA i VKVA (Taula IV.4.1.) presenten una disminució important en la capacitat d'activar la transducina respecte a la proteïna Wt, indicant que aquests aminoàcids estarien implicats en la interacció i/o activació de la transducina. També s'ha determinat la capacitat dels diferents mutants d'aquestes nanses d'activar la proteïna G_q , proteïna G del receptor muscarínic M3. Cap dels mutants estudiats presenta, però, un augment significatiu d'activació de proteïna G_q respecte la rodopsina Wt. Les mutacions introduïdes en l'estructura del receptor rodopsina no serien suficients per canviar l'especificitat de reconeixement de proteïna G del receptor. Si que podem concloure, però, que els aminoàcids hidrofòbics de les nanses C-II i C-III serien claus per a la interacció rodopsina-proteïna G. En concret, els aminoàcids Val-138, Val-227, Val-250, Val-254 i Ile-255 dels extrems N-terminal i C-terminal de les nanses C-II i C-III de la rodopsina serien claus pel reconeixement i/o activació de la transducina. Durant el procés de fotoactivació de la rodopsina, degut al moviment de les hèlices, s'exposarien aminoàcids hidrofòbics dels extrems citoplasmàtics d'aquestes que jugarien un paper important en la interacció amb la transducina.