

INFORME CIENTÍFICO DEL PROYECTO

Modificación del plegamiento y función de opsinas mutadas mediante factores celulares como nueva estrategia terapéutica para enfermedades degenerativas de la retina

Investigador principal: Pere Garriga Solé

Facultad de Óptica y Optometría de Terrassa

Universitat Politècnica de Catalunya

Edifici Gaia Rambla Sant Nebridi 22 08222 Terrassa

Resumen

Las mutaciones en la rodopsina son la principal causa de retinosis pigmentaria (RP) autosómica dominante. Estas mutaciones pueden clasificarse según sus propiedades bioquímicas y celulares. Por ejemplo las de tipo II son las más comunes y causan mal plegamiento estructural de la proteína. El plegamiento, la degradación y la agregación de algunas de estas rodopsinas mutadas pueden ser modificados mediante fármacos y chaperonas moleculares. Asimismo, mutaciones en las opsinas de las células fotorreceptoras como causan distrofia de conos y bastones. El principal objetivo de este proyecto es entender el(los) mecanismo(s) molecular(es) del mal plegamiento de la rodopsina, de las opsinas de los conos, inducido por mutaciones genéticas y verificar la hipótesis de que algunos fármacos y chaperonas moleculares pueden afectar el destino de las opsinas mutadas. Se determinará el efecto de mutaciones de RP y de distrofia de conos y bastones en la estructura y función de las proteínas mutadas expresadas en cultivos celulares. Se utilizarán retinales sintéticos y zinc como dos de los factores para modular la expresión y el plegamiento de las opsinas mutadas. Se utilizarán modelos celulares establecidos para determinar el efecto de fármacos inductores de chaperonas moleculares como agentes frente a las propiedades tóxicas de ganancia de función de las opsinas mutadas. Finalmente, se estudiarán las chaperonas que pueden modular el plegamiento, la degradación y el destino celular y la función de las opsinas mutadas mediante la sobreexpresión y RNAi.

Estos estudios aumentarán nuestros conocimientos sobre la biología celular retiniana fundamental y sobre la biología de los receptores acoplados a proteínas G, superfamilia a la que pertenecen la rodopsina y los pigmentos de los conos, en particular. Aún más importante será el hecho de que los resultados obtenidos deberán ayudar a desarrollar nuevos tratamientos para la RP así como para la distrofia de conos y bastones causadas por mutaciones en los pigmentos visuales de las células fotorreceptoras de la retina.

Objetivos

Los objetivos específicos de este proyecto se estudiarán mediante un amplio espectro de métodos experimentales y teóricos en un enfoque multidisciplinar. Los mecanismos celulares y moleculares que producen distrofias de conos y bastones y muerte celular en la retina se abordarán mediante una serie de tareas altamente complementarias. Se expresarán heterológicamente en cultivos celulares proteínas (rodopsina, opsinas de conos y transducina de conos) con mutaciones que causan las enfermedades degenerativas de la retina como la RP y la distrofia de conos y bastones, y se analizarán las propiedades de las proteínas mutadas en comparación con la proteína *wild type* nativa (WT), incluyendo la investigación de su interacción con la membrana lipídica y con otras proteínas del sistema de fototransducción visual. También se estudiará los mecanismos apoptóticos que son los responsables de la muerte celular retiniana. Se analizará el papel del Zn^{2+} y de retinoides en el proceso de plegamiento de los pigmentos visuales mutados, y el potencial efecto estabilizador de estos factores en la obtención de la conformación correctamente plegada de estas proteínas. Se analizará la aparición y evolución de los agregados celulares formados como consecuencia de las mutaciones y el mal plegamiento de estos receptores visuales. El conocimiento de la formación de agregados, y su control mediante factores celulares, y su relación con el proceso degradativo vía sistema ubiquitina-proteasoma, deberá permitir el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de estas enfermedades visuales.

Los *objetivos específicos* del proyecto de investigación que se han conseguido son:

Determinar el efecto de mutaciones en genes asociados con la RP y la distrofia de conos y bastones en la estructura (plegamiento), estabilidad (degradación e inestabilidad conformacional) y función (activación e inactivación del proceso de fototransducción visual). Construir modelos moleculares de los pigmentos mutados y la proteína G en sistemas de membrana modelo para analizar la conformación de éstas mediante dinámica molecular.

Determinar las propiedades estructurales de las proteínas mutadas inmunopurificadas mediante técnicas espectroscópicas (UV-vis y fluorescencia) y radioactivas: regeneración de cromóforo, estabilidad térmica, estabilidad y formación del estado activo y activación de proteína G.

Determinar, en cultivos celulares apropiados, el efecto de retinales y otros fármacos, en el proceso de plegamiento y agregación de rodopsinas mutadas.

Resultados obtenidos

A continuación se suman algunos de los resultados más destacados obtenidos así como su relevancia. Gran parte de estos resultados han sido publicados en revistas científicas internacionales (véase listado de publicaciones al final del informe).

En este proyecto se han caracterizado mutaciones específicas en rodopsina causantes de RP mediante técnicas espectroscópicas y funcionales. Algunas de estas mutaciones, como N55K y M39R han sido mutaciones descubiertas por primera vez en pacientes del Moorfield's Eye Hospital de Londres por nuestros colaboradores clínicos del Institute of Ophthalmology de dicha ciudad. Estas mutaciones se han caracterizado clínicamente como correspondientes a RP sectorial que es aquel tipo de RP que afecta solamente una región de la retina, habitualmente el cuadrante inferior. No obstante, en el caso de la mutación M39R podría no tratarse de una mutación RP sectorial genuina ya que parecía afectar diversas regiones de la retina en un patrón que no correspondería a RP sectorial (Figura 1). Se ha determinado el fenotipo molecular y bioquímico de dichas mutaciones sobreexpresadas en células COS-1. Estas rodopsinas mutadas, purificadas mediante inmunocromatografía, presentan una baja estabilidad térmica y un comportamiento anómalo frente a la luz (Figura 2).

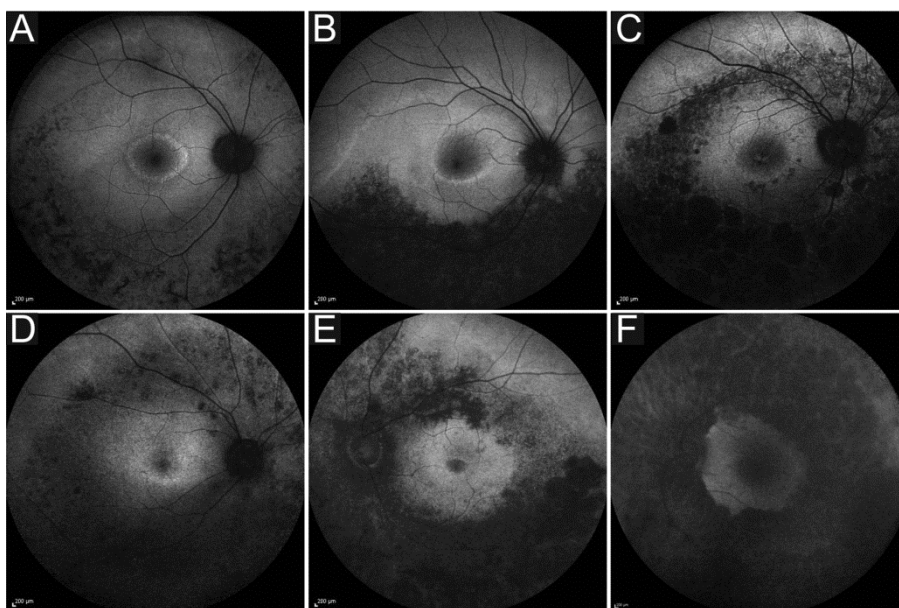


Figura 1. *Diferentes fenotipos clínicos de diferentes pacientes afectados por retinosis pigmentaria causada por las mutaciones N55K y M39R. Nótese la distinta distribución de la pigmentación anómala que le da el nombre de retinosis pigmentaria sectorial.*

La baja estabilidad conformacional (térmica y química) de estas proteínas mutadas es una de las características más destacadas desde el punto de vista molecular. Asimismo, el comportamiento anómalo frente a la iluminación podría ser una de las causas moleculares del fenotipo clínico observado ya que la iluminación de la retina

puede ser diferente en diferentes zonas de la misma. Se ha correlacionado el comportamiento experimental con aspectos estructurales de la rodopsina mediante análisis por modelización molecular.

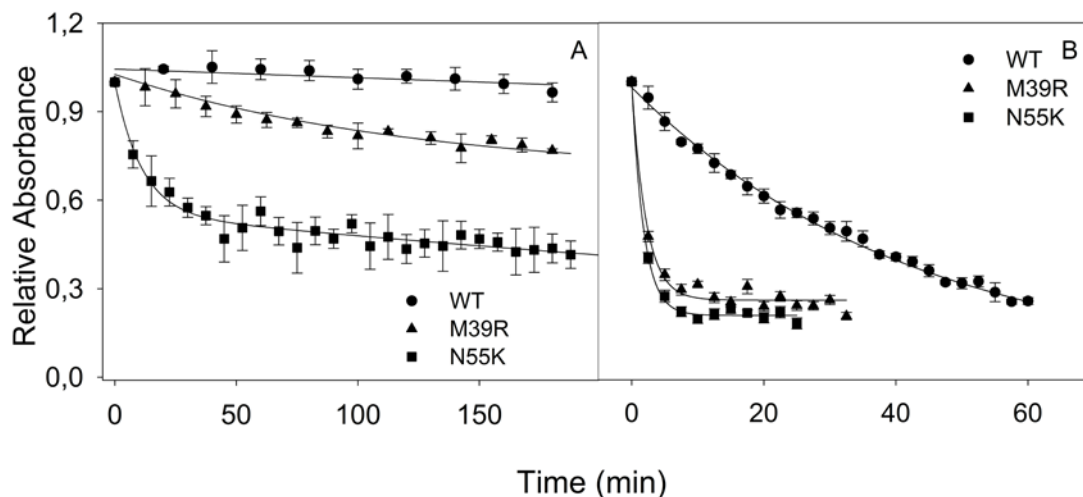


Figura 2. Estabilidad térmica (A) y química (B) de las rodopsinas mutadas.

Por otra parte, se han determinado los mecanismos moleculares de la chaperona hsp90 en el plegamiento de las opsinas mutadas asociadas a RP, como la P23H y R135L. La mutación P23H es la primera que se encontró asociada a RP y la mutación R135L afecta el aminoácido R135L que forma parte del triplete D(E)RY ampliamente conservado en la superfamilia de GPCRs y uno de los sitios estructurales claves para la unión y activación de la proteína G transducina. La expresión y tráfico de la rodopsina mutada R135L ha podido ser manipulada farmacológicamente mediante 9-cis-retinal y otras moléculas como 4-PBA y 17-AAG (Figure 3).

Se ha visto que el inhibidor de la chaperona Hsp90, el HSP990, aumentaba la función visual y retrasaba la degeneración retiniana en un modelo de rata transgénica con la mutación P23H. Este efecto se ha asociado con la inducción de la expresión de proteínas “heat-shock” y la reducción de la agregación de la rodopsina. En el caso del efecto de esta inhibición sobre la opsina mutada R135L, que se encuentra hiperfosforilada, se une a la arrestina y disrumpe el tráfico vesicular. La inhibición de Hsp90 redujo la acumulación intracelular de R135L y eliminó la unión de arrestina. Este efecto requirió de la maduración y función de la rodopsina quinasa (GRK1). Más importante aún, la inhibición de Hsp90 restauró la localización de la opsina R135L a niveles del fenotipo WT in vivo en retina de rata.

Estos resultados sugieren que la chaperona Hsp90 representa una posible diana terapéutica para diferentes tipos de RP asociados a mutaciones en rodopsina, pero también podría indicar que una inhibición sostenida de Hsp90 podría tener un efecto adverso sobre la función visual.

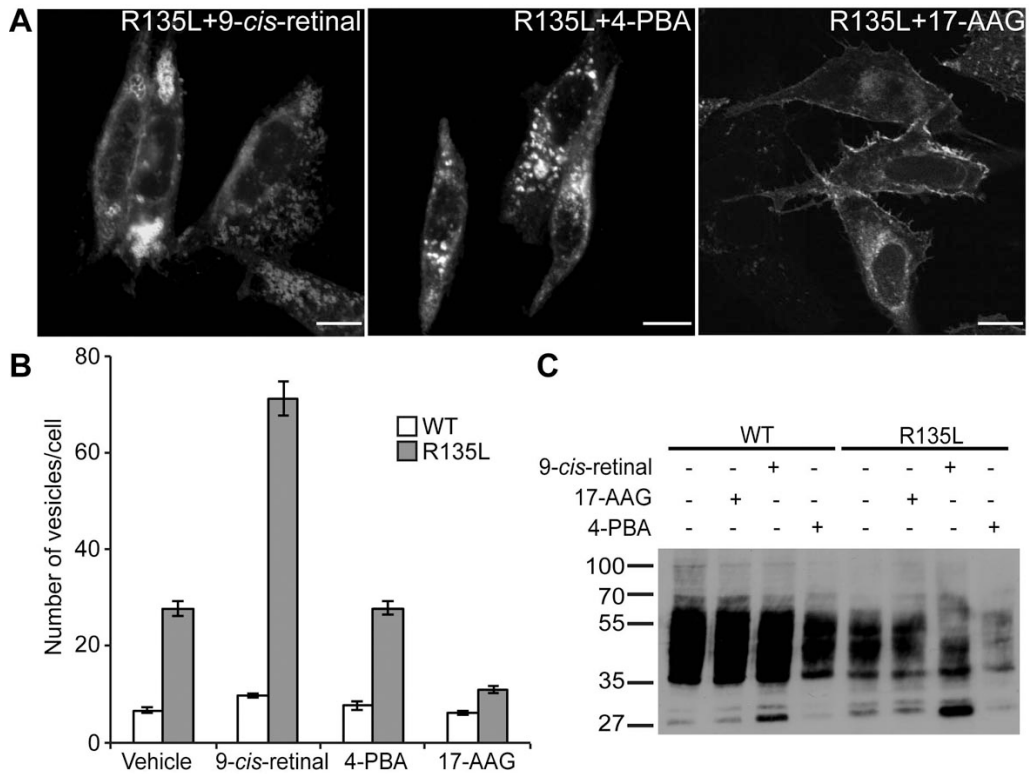


Figura 3. Efecto del 9-cis-retinal y otros fármacos sobre la expresión del mutante de rodopsina R135L asociado a RP.

En el transcurso del proyecto se han estudiado las opsinas de los conos, y comparado con la rodopsina de los bastones a nivel estructural y funcional. En particular se ha visto que existen mecanismos específicos de regeneración con estos retinales en las opsinas de los conos y sus mutantes (Figuras 4 y 5).

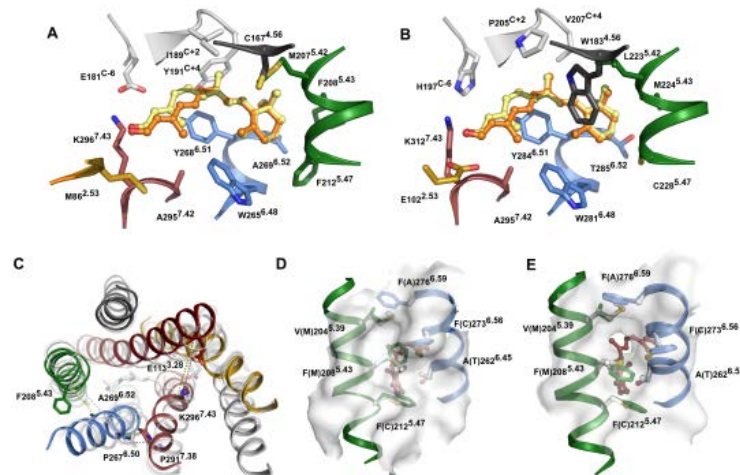


Figura 4. Modelos moleculares de los sitios de unión del retinal para la rodopsina y la opsina de conos rojos.

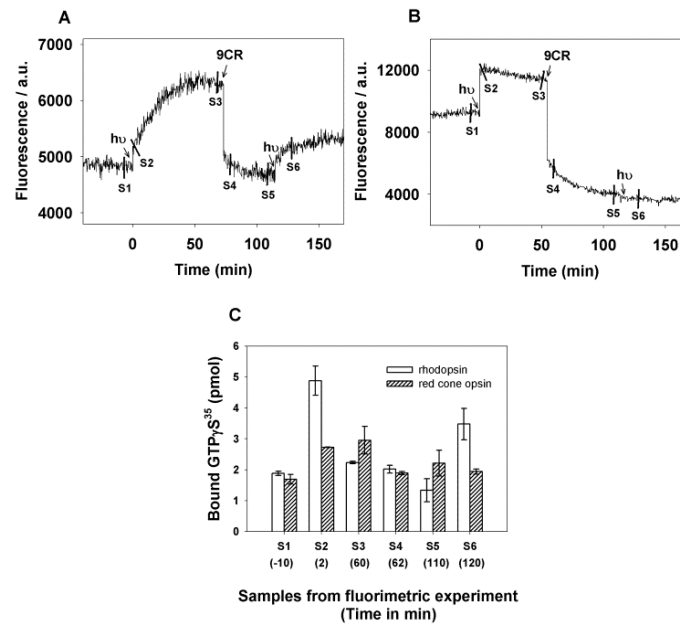


Figura 5. Comparación entre la funcionalidad de la rodopsina de bastones y la opsina de conos rojos mediante ensayos de fluorescencia (A y B) y de unión de ligando radiactivo.

También se ha podido estabilizar mutaciones asociadas a RP, en particular las mutaciones G90V en la hélice II de la rodopsina y la mutación N55K en la hélice I, *in vitro* mediante la utilización de bicelas y lípidos específicos como el DHA (ácido docosohexaenoico) (Figura 6 y 7).

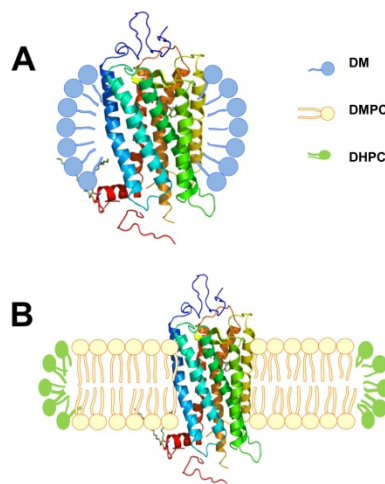


Figura 6. Esquema de los sistemas de detergente (A) y bicelas (B) utilizados para el estudio de las propiedades de las rodopsinas mutadas G90V y N55K asociadas a RP.

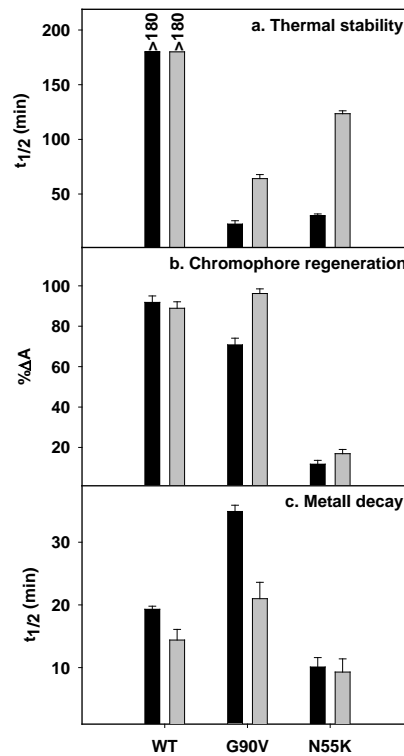


Figure 7. La utilización de las bicelas permite estabilizar las mutaciones y mejorar su regeneración con el retinal.

Finalmente, se ha visto que algunos aminoácidos implicados en mutaciones asociadas a RP son sitios de gran importancia en la evolución de las opsinas de los mamíferos lo cual abre nuevas expectativas en el estudio de la evolución molecular de los pigmentos visuales y del proceso de la visión en general (Figuras 8-10).

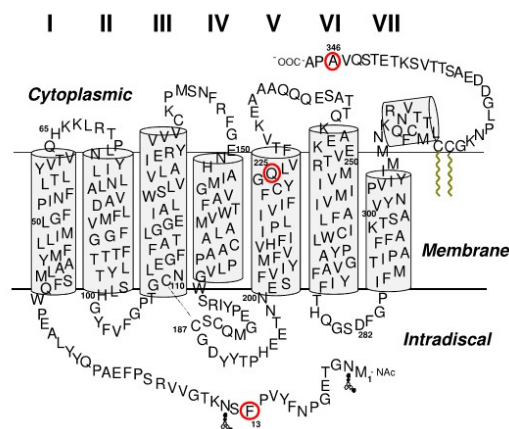


Figura 8. Los aminoácidos en las posiciones 13, 225 y 346 de la rodopsina son sitios muy importantes en la evolución de la proteína y su mutación puede tener efectos patológicos.

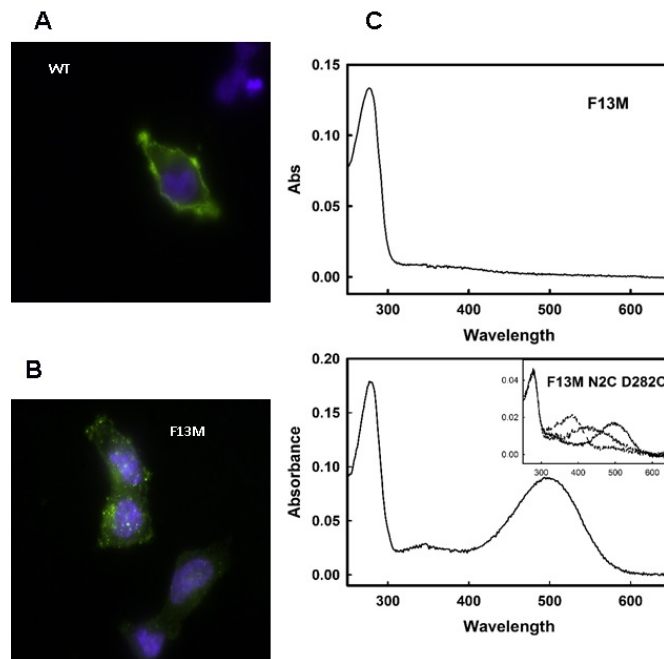


Figura 9. La mutación F13M provoca un mal plegamiento de la opsina, cuyo plegamiento correcto puede ser recuperados mediante la introducción de un puente disulfuro extra en la estructura de la rodopsina.

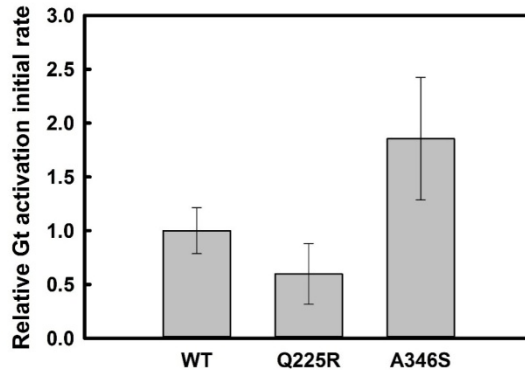


Figura 10. Diferencias en la funcionalidad (capacidad de activación de proteína G) de los mutantes R225Q y A346L indicando que estos aminoácidos son clave en la evolución molecular de la rodopsina y en la visión de los vertebrados.

La mutación A346L está asociada a RP y por tanto refuerza la importancia de la posición A346 en el extremo C-terminal de la opsina como aminoácido clave, no sólo en la evolución de las opsinas de vertebrados, sino en la estructura y correcta funcionalidad de la rodopsina.

Publicaciones científicas

1. Fernández-Sampedro M, Invergo BM, Ramon E, Bertranpetit J, Garriga P. Functional role of positively selected amino acid substitutions in mammalian rhodopsin evolution. *Scientific Reports*, 6:21570 (2016).
2. Garriga P, Peralvarez-Marin A. Optogenetics comes of age: novel inhibitory light-gated anionic channels allow efficient silencing of neural function. *ChemBioChem*. 17, 204-206 (2016)
3. Herrera-Hernández MG, Ramon E, Garriga P. Molecular mechanisms of retinal toxicity induced by light and chemical damage. *Advances in Molecular Toxicology* **9**, 215-258 (2015)
4. Srinivasan S, Cordoní A, Ramon E, Garriga P. Beyond spectral tuning: human cone visual pigments adopt different transient conformations for chromophore regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015 Sep 19. [Epub ahead of print]
5. Dong X, Ramon E, Herrera-Hernández MG, Garriga P. Phospholipid Bicelles Improve the Conformational Stability of Rhodopsin Mutants Associated with Retinitis Pigmentosa. *Biochemistry* **54**, 4795-4804 (2015)
6. Ramon E., Cordoní A, Aguilà M., Moore AL., Webster AR., Cheetham ME and Garriga P. Differential light-induced responses in sectorial inherited retinal degeneration. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 35918-35928 (2014)
7. Morillo M, Toledo D, Pérez JJ, Ramon E, Garriga P. Mercury-induced dark-state instability and photobleaching alterations of the visual G-protein coupled receptor rhodopsin. *Chemical Research in Toxicology* **27**, 219-222 (2014)
8. Srinivasan S, Ramon E, Cordoní A, and Garriga P. Binding specificity of retinal analogs to photoactivated visual pigments suggest mechanism for fine-tuning GPCR-ligand interactions. *Chemistry and Biology*, **21**, 369-378 (2014)
9. Aguilà M, Bevilacqua D, McCulley C, Schwarz N, Athanasiou D, Kanuga N, Novoselov S, Lange CAK, Ali R, Bainbridge JW, Gias C, Coffey PJ, Garriga P, and Cheetham ME. Hsp90 inhibition protects against inherited retinal degeneration. *Human Molecular Genetics* **23**, 2164-2175 (2013)
10. Sánchez-Martín MJ, Ramon E, Torrent-Burgues J and Garriga P. Improved Conformational Stability of the Visual G-protein Coupled Receptor Rhodopsin by Specific Interaction with Docosaheptaenoic Acid Phospholipid. *ChemBioChem* **14**, 639-644 (2013)

Producción científica, **global del proyecto**

Nº de artículos generados en revistas: 10

Nº de comunicaciones en congresos nacionales: 12

Nº de comunicaciones en congresos internacionales: 3

Existen aún dos artículos científicos derivados del proyecto en preparación para su envío a revistas internacionales.