

El Receptor Visual de la Retina: la Rodopsina

I.1

I.1.1. RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G

Els receptors acoblats a proteïna G (*G-protein coupled receptor*, GPCR) són proteïnes integrals de membrana que constitueixen una de les famílies més extenses de proteïnes transductores de senyal, i participen en una gran varietat de processos fisiològics. S'ha descrit que mutacions en aquests receptors són responsables d'un gran nombre de patologies, des de la degeneració de les cèl·lules de la retina en el cas del fotoreceptor visual rodopsina [Garriga and Manyosa, 2002; Rattner et al., 1999; Dryja and Li, 1995; Jacobson et al., 1991] a la pubertat precoç o obesitat hereditària en el cas del receptor de la lutropina i del receptor β_3 -adrenèrgic respectivament [Themmen and Verhoef-Post, 2002; Strosberg et al., 1997]. Aquests tipus de receptors són àmpliament estudiats per la utilitat com a possibles dianes farmacològiques: en l'actualitat s'estima que el 50% dels fàrmacs en estudi van dirigits a membres de la superfamília de GPCRs [Drews et al., 2000].

Actualment, aproximadament 9.000 seqüències primàries de diferents GPCRs són accessibles en bases de dades públiques, així com també ho són un gran nombre de mutacions naturals descrites en aquests receptors. També hi ha informació sobre la interacció dels lligands amb els diferents GPCRs. Així, podem trobar més de 30.000 combinacions lligand-receptor en aquestes bases de dades. La gran quantitat d'aquest tipus d'informació contrasta amb la poca informació estructural de que es disposa pels diferents GPCRs. Actualment només es coneix l'estructura cristal·lina -determinada mitjançant difracció de raigs-X- de la rodopsina bovina [Palczewski et al., 2000], degut a la dificultat que comporta l'obtenció de l'estructura tridimensional a resolució atòmica de les proteïnes de membrana degut principalment a la dificultat en poder cristal·litzar aquest tipus de proteïnes. Aquest fet ha portat a realitzar models moleculars, basats en l'estructura

crystal·lina de la rodopsina, per a la resta de GPCRs amb l'objectiu de facilitar els estudis estructurals [Klabunde and Hessler, 2002].

I.1.1.1. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS DELS GPCRs

Els GPCRs presenten una estructura molecular comú. Estan formats per 7 hèlices transmembrana (I-VII), tres nanses periplàsmiques (II-III, IV-V i VI-VII), tres nanses citosòliques (I-II, III-IV i V-VI), un domini N-terminal periplàsmic (N) i un domini C-terminal citosòlic (C) (Figura I.1.1).

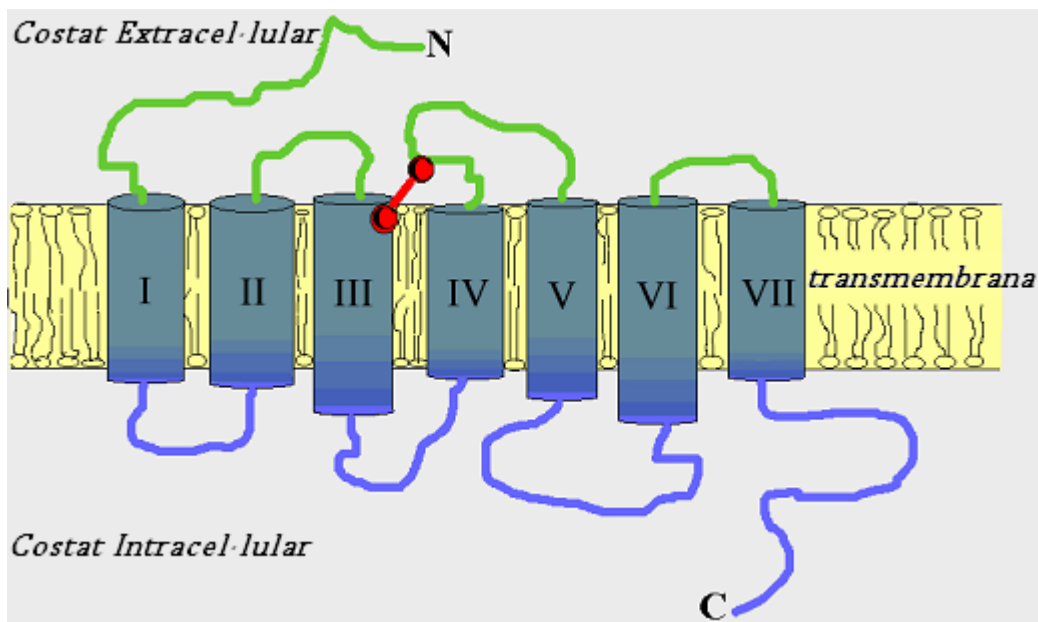


Figura I.1.1. Representació esquemàtica d'un GPCR model. Els receptors consten de 7 segments transmembrana i nanses extracel·lulars i citoplasmàtiques que els connecten. Les longituds dels segments transmembrana, així com les de les nanses s'han representat d'acord amb el que es coneix del receptor prototípic rodopsina [Palczewski et al., 2000]. L'extrem N-terminal d'aquests receptors es troba en el domini extracel·lular mentre que l'extrem C-terminal és citoplasmàtic. Es representa, en l'esquema, el pont disulfur característic d'aquesta superfamília de receptors, entre la Cys localitzada en l'hèlix III i una altre Cys localitzada en la nansa extracel·lular II (E-II).

Els GPCRs s'agrupen segons l'homologia de seqüència en tres famílies diferents [Gether et al., 2000]. La família A inclou els receptors que presenten una elevada homologia amb la rodopsina i el receptor β_2 -adrenèrgic. Aquesta família és la més extensa i presenta com a característica diferencial un extrem N-terminal curt i una sèrie d'aminoàcids altament conservats en les hèlices transmembrana. Trets distintius d'aquesta família són el pont

disulfur que connecta l'hèlix III amb la segona nansa extracel·lular (E-II), i unes Cys palmitoilades properes a l'extrem N-terminal que es troben ancorades a la membrana formant així una quarta nansa citoplasmàtica. Els receptors de la família B presenten elevada homologia al receptor de la secretina i al receptor del glucagó. Presenten un extrem N-terminal llarg amb Cys conservades que podrien formar una sèrie de ponts disulfur. També s'ha descrit en alguns membres d'aquesta família el pont disulfur que connecta l'hèlix III amb la nansa E-II. La família C presenta homologia al receptor GABA. Els receptors d'aquesta família presenten generalment extrems N-terminals llargs, de 600-700 aminoàcids, que s'estructuren com a domini separat d'unió al lligand. Una altra característica d'aquesta família és la presència d'una nansa citoplasmàtica III (C-III) molt curta i altament conservada.

I.1.1.2. MECANISME D'ACTIVACIÓ I DE TRANSDUCCIÓ DE SENYAL DELS GPCRs

Els diferents membres de la superfamília de GPCRs són responsables d'una gran varietat de processos cel·lulars, que van des del control de l'activitat d'enzims o de canals iònics, fins al transport de vesícules, passant per tots els processos implicats en la neurotransmissió. Aquests receptors responen a una gran varietat d'estímuls com podrien ser senyals sensorials (llum en el cas de la rodopsina), hormones i neurotransmissors que actuen unint-se al receptor (Figura I.1.2).

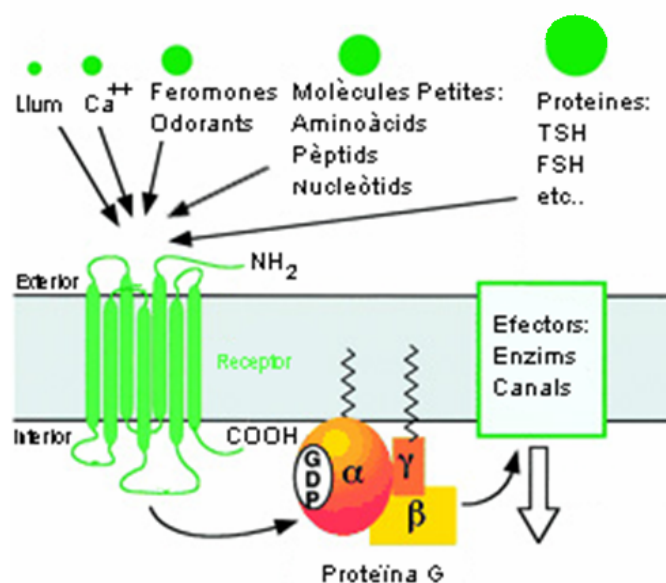


Figura I.1.2. Esquema de funcionament d'un GPCR, el lligand s'uneix al receptor que un cop activat interaccionarà amb la proteïna G desencadenant-se així la resposta cel·lular [Bockaert and Pin, 1999].

La unió del lligand al receptor provocarà un canvi conformacional en aquest que li permetrà la interacció amb la proteïna G. Generalment, aquest canvi conformacional afecta la conformació de les nanses C-II i C-III del receptor, que presenten un paper important en el reconeixement i en l'activació de la proteïna G. La proteïna G, proteïna heterotrimèrica unida a GDP, està constituïda per les tres subunitats α , β i γ . La subunitat α , que presenta activitat GTPasa intrínseca, reconeix per una regió el receptor i per l'altra un efector capaç de desencadenar un seguit de reaccions intracel·lulars. El complex de les subunitats β i γ actua regulant l'activitat de la subunitat α , tot i que també s'hi ha associat altres funcions, com per exemple que el complex β - γ s'uneix a la rodopsina inhibint la fosforilació del receptor per rodopsina quinasa quan el sistema s'il·lumina, impedit així la seva inactivació [Kelleher and Johnson, 1988]. Els GPCRs poden unir-se a diferents tipus de proteïnes G, que són de diferent tipus en funció de la subunitat α que les constitueixen. Pels mamífers s'ha descrit 20 tipus diferents de subunitats α , 4 de β i 7 de γ [Alberts et al., 1994]. L'activació de la proteïna G es traduirà, doncs, en la inhibició o l'estimulació en la producció de segon missatger, desencadenant-se així la resposta cel·lular. La inactivació dels GPCRs es realitza mitjançant quinases que els fosforilen, en el cas de la rodopsina es tracta de la rodopsina quinasa [Kelleher and Johnson, 1990], o bé per la internalització dels receptors, entre altres mecanismes [Alberts et al., 1994].

I.1.2. LA RODOPSINA

I.1.2.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La rodopsina és el membre més estudiat de la superfamília de GPCRs. És l'únic receptor de la superfamília del qual s'ha resolt l'estructura mitjançant difracció de raigs-X, a una resolució de 2.8Å i 2.6Å, per aquest motiu és utilitzat com a prototip per als GPCRs [Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001].

La rodopsina però, té característiques estructurals úniques dins la superfamília. El seu lligand, l'11-*cis*-retinal, es troba unit mitjançant un enllaç covalent, actuant d'agonista invers, a la proteïna opsina. L'11-*cis*-retinal s'isomeritza, per acció de la llum, a tot-*trans*-retinal, i aquest canvi es transmet a la part citoplasmàtica del receptor permetent l'activació de la proteïna G_t (transducina). L'activació de la transducina desencadenarà una cascada de reaccions

enzimàtiques que permetran la transformació del senyal lluminós en un senyal elèctric, que es transmetrà pel nervi òptic fins al cervell.

I.1.2.2. LOCALITZACIÓ

La rodopsina es localitza en una de les tres capes cel·lulars que formen els ulls dels vertebrats, concretament a la més interna que s'anomena retina (Figura I.1.3).

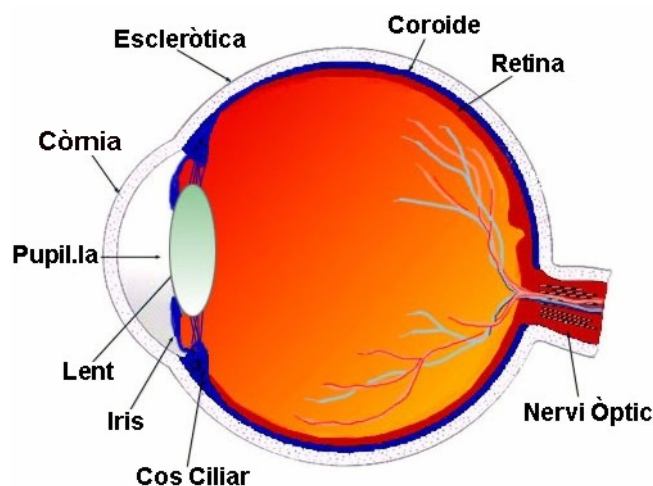


Figura I.1.3. Secció del fons de l'ull on es poden observar les tres capes cel·lulars que revesteixen l'ull des de l'exterior a l'interior; escleròtica, coroide i retina.

La retina revesteix la part interna de l'ull, i està formada per diversos tipus de cèl·lules on s'hi inclouen les cèl·lules de l'epiteli pigmentari, les cèl·lules fotoreceptores que són les responsables de la captació de la llum, les cèl·lules de Müller, les cèl·lules horitzontals, les cèl·lules bipolars, les cèl·lules amacrines i finalment les cèl·lules ganglionars els axons de les quals formaran el nervi òptic (Figura I.1.4). La retina conté dos tipus de cèl·lules fotoreceptores, els cons i els bastons. Cadascuna d'elles conté un pigment que absorbeix a un interval de longitud d'ona específic i genera un impuls nerviós relacionat amb la quantitat de llum absorbida. Aquest mecanisme implica una seqüència d'esdeveniments fotoquímics, bioquímics i eletrofisiològics mitjançant els quals l'absorció d'un fotó en la cèl·lula genera una resposta elèctrica que pot ser detectada a nivell de connexió sinàptica.

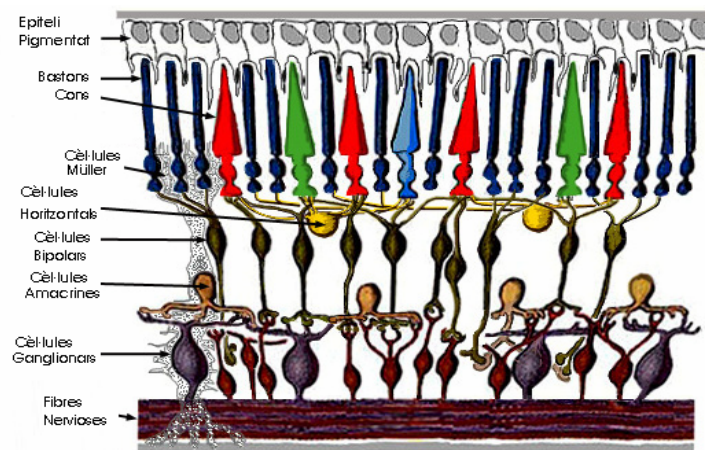


Figura I.1.4. Esquema de l'organització de la retina. En blau fosc es troben representats els bastons i els tres diferents tipus de cèl·lules que estan representades en vermell, verd i blau clar.

Els cons són les cèl·lules responsables de la visió fotòpica és a dir, en condicions d'alta intensitat lumínica. Hi ha tres tipus de cons, cadascun d'ells té un rang diferent de longitud d'ona de manera que la combinació dels tres permet la visió en color tricromàtica normal dels humans. Els bastons actuen en condicions de baixa intensitat lumínica i monocromàtica, l'anomenada visió escotòpica. En els discs d'aquests bastons hi trobem la proteïna responsable de la fototransducció visual: la rodopsina.

Les cèl·lules bastó estan constituïdes per dues parts, el segment intern i el segment extern. El segment intern conté els orgànuls cel·lulars necessaris per a la supervivència de la cèl·lula com podrien ser el nucli i mitocondris, entre d'altres. El segment extern (*rod outer segment*, ROS) presenta una estructura membranosa de discs aplanats generats a partir del cil·lium, regió que separa el segment extern de l'intern. Concretament, la rodopsina es localitza en la membrana dels discs dels ROS, representant un 85% de la proteïna total dels discs i un 60% de la proteïna total en membrana [Molday, 1998]. (Figura I.1.5)

La síntesi de l'apoproteïna opsina té lloc, doncs, en el segment intern de la cèl·lula bastó. En el reticle endoplasmàtic i en el Golgi tindrà lloc la maduració de la proteïna abans de ser transportada vectorialment al ROS. Les modificacions postranscripcionals inclouen una doble palmitoilació, l'acetilació de l'N-terminal, la glicosilació de dos residus asparagina (Asn-2 i Asn-

15) amb dos grups $(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_3$, i la formació d'un pont disulfur entre la Cys-110 i la Cys-187.

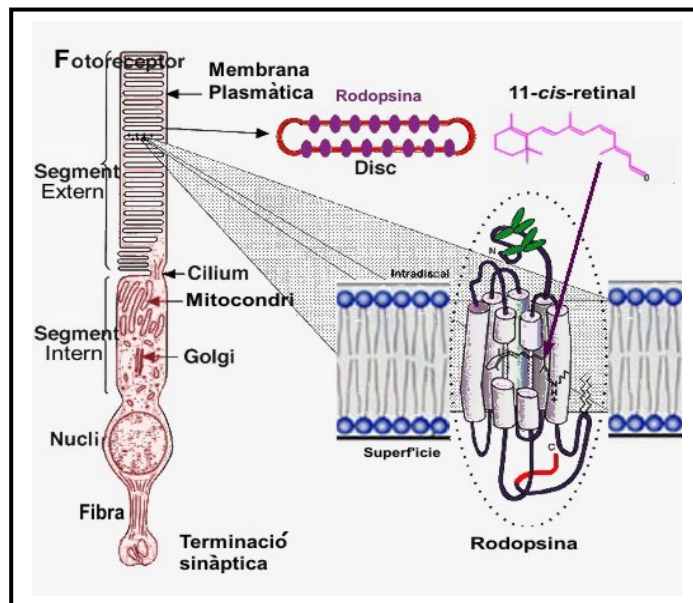


Figura I.1.5. Representació esquemàtica de la cèl·lula bastó. Ampliació dels discs dels segments externs i de la rodopsina a nivell de la seva membrana. Es poden observar les 7 hèlixes transmembrana de la rodopsina i l'11-*cis*-retinal dins la butxaca d'unió al lligand.

L'extrem C-terminal de la proteïna és essencial per a la interacció de l'opsina amb les proteïnes encarregades del seu transport a través de vesícules. El motiu de sortida del C-terminal de l'opsina, el pentapeptid senyal QVAPA, permet la unió a la proteïna reguladora del transport ARF4 [Sung et al., 1994; Tam et al., 2000; Deretic et al., 1998] mentre que la proteïna rab8 es troba implicada en el reconeixement de les membranes del post-Golgi que contenen la rodopsina i que seran transportades al ROS [Moritz et al., 2001].

I.1.2.3. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS DE LA RODOPSINA

La rodopsina està constituïda per dues parts, una part proteica formada per l'apoproteïna opsina i una part cromofòrica, l'11-*cis*-retinal. La unió entre ambdues parts es realitza mitjançant un enllaç tipus base de Schiff protonada entre el grup aldehid del retinal i el grup amino de la

cadena lateral de la Lys-296 en la setena hèlix de la rodopsina. La càrrega positiva d'aquest enllaç es troba contrarestada en la proteïna per un aminoàcid proper carregat negativament, que en el cas de la rodopsina humana i de la rodopsina bovina és el Glu-113 en l'hèlix III [Sakmar et al., 1989; Nathans, 1990] (Figura I.1.6).

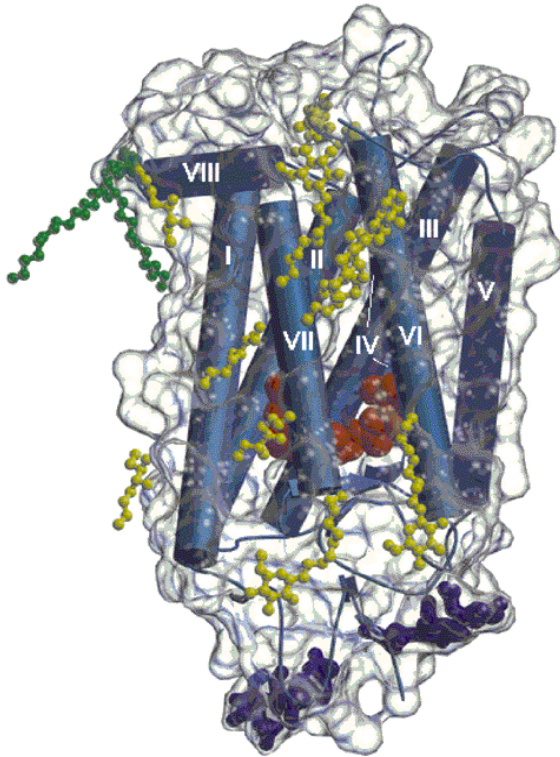


Figura I.1.6. Estructura tridimensional de la rodopsina basada en el model PDB 1F88 [Palczewski et al., 2000]. S'observen les 7 hèlixes transmembrana i la vuitena hèlix intracel·lular amb cilindres blaus. Els fulls- β es mostren com a fletxes blaves. Les nanses que connecten les hèlixes es mostren amb llaços blaus. L'embolcall transparent de la figura representa la superfície de la molècula. En color vermell podem veure el lligand, l'11-*cis*-retinal, dins la seva butxaca i en color blau més intens les N-glicosilacions presents a l'extrem N-terminal de la rodopsina. En verd els grups palmitoil units a les Cys-322 i Cys-323. En groc molècules hidrofòbiques properes a la superfície de la proteïna.

L'opsina està constituïda per 348 aminoàcids que es troben distribuïts en tres dominis; l'extracel·lular, l'intracel·lular i el transmembranal, i té un pes molecular aparent d'aproximadament 40.000Da.

DOMINI TRANSMEMBRANAL

La rodopsina es plega en una estructura de 7 hèlixes transmembrana formant al seu interior una cavitat d'unió per al lligand, la butxaca d'unió del retinal (Figura I.1.6). Les hèlixes- α transmembrana presenten longituds d'entre 22 i 34 aminoàcids. Són hèlixes- α no regulars, 6 de les 7 hèlixes presenten torsions i conformacions específiques. Aquest fet sol ser una característica diferencial entre els GPCRs i altres proteïnes de 7 hèlixes transmembrana, com podria ser la bacteriorodopsina [Schertler et al., 1993; Unger et al., 1997]. L'anàlisi detallada indica que les distorsions de les hèlixes transmembrana es produeixen en residus de Gly i Pro, i que són de diferents angles respecte a la superfície de la membrana [Palczewski

et al., 2000; Filipek et al., 2003a; Riek et al., 2001; Visiers et al., 2000]. De l'estructura cristal·lina podem determinar que les hèlices I, IV, VI i VII presenten torsió en el residu de Pro present en l'hèlix, ja que les característiques de la cadena lateral del residu de Pro provoquen el trencament del patró de ponts d'hidrogen de les hèlices- α . La torsió present en l'hèlix VI és la més important i és provocada per la Pro-267, aminoàcid altament conservat en la superfamília de GPCRs [Palczewski et al., 2000]. En l'hèlix II, la torsió que s'observa és conseqüència de la introducció d'un residu més en la volta d'hèlix. Les dues Gly adjacents, Gly-89 i Gly-90, que es troben altament conservades en la majoria de GPCRs, permeten una estructura hèlix- π , degut a la flexibilitat conformacional dels residus de Gly.

L'hèlix I té una longitud de 44Å, presenta una orientació de 25° respecte el pla de la membrana i una torsió respecte l'hèlix- α clàssica de 12°, degut a la Pro-53. Aquesta hèlix forma múltiples ponts d'hidrogen amb l'hèlix II i l'hèlix VII, i sembla ser que no interacciona amb les hèlices III-VI (Figura I.1.7). L'hèlix II presenta una torsió respecte la membrana similar a la de l'hèlix I, de 25°, amb una desviació de 30° respecte l'hèlix- α ideal en la regió de les Gly-89 i Gly-90, com ja s'ha comentat anteriorment. Degut a aquesta desviació l'aminoàcid Gly-90 queda molt proper al Glu-113, contrarió de la base de Schiff. Aquesta hèlix forma múltiples ponts d'hidrogen amb les hèlices I, III, IV i VII. L'hèlix III és l'hèlix més llarga amb 48Å i la que presenta una major desviació respecte de la normal a la membrana, 33°. Presenta dues petites torsions internes, una a l'alçada de les Gly-120 i Gly-121 i l'altra a la de la Ser-127, encara que aquesta sembla no ser conseqüència de la seqüència de l'hèlix sinó de l'empaquetament d'aquesta l'hèlix respecte les altres. El fet de presentar una orientació de 33° respecte la membrana fa que aquesta hèlix III estigui en contacte amb les hèlices II, IV, V i VII. L'hèlix IV és la més curta i pràcticament es troba perpendicular a la membrana, presenta però una torsió important respecte l'hèlix ideal en les Pro-170 i Pro-171. S'ha hipotetitzat que aquesta hèlix està involucrada en el manteniment de la conformació inactiva del receptor a través de les interaccions amb les hèlices II, III i V. L'hèlix V té una longitud de 35Å i presenta una orientació respecte la membrana de 26°. Presenta dues torsions internes de 25° i 15° en els residus Phe-203 i His-211 sense aparent correlació amb la seqüència. Aquesta hèlix forma enllaços d'hidrogen amb les hèlices III i IV.

L'hèlix VI requereix una atenció especial ja que el moviment d'aquesta hèlix sembla clau per a l'activació del receptor [Gerber et al., 2001]. L'hèlix VI és la segona en llargada i presenta la torsió més important respecte l'hèlix- α clàssica, de 36° , degut a la Pro-267. El fet que només presenti interacció per ponts d'hidrogen amb l'hèlix VII li permet el moviment relatiu a tota la resta d'hèlices, important en el procés d'activació. En contrast amb les altres hèlices aquesta hèlix presenta interacció amb les hèlices II, III i V a través d'interaccions de van der Waals. L'hèlix VII presenta una distorsió considerable al voltant del lloc d'unió al retinal, la Lys-296, conté la Pro-291 i la Pro-303 del motiu altament conservat NPXXY, motiu que participa en la interacció amb l'hèlix VI. Aquesta hèlix, que conté el retinal, es troba situada al mig de la macroestructura que forma la proteïna i interacciona amb totes les hèlices a excepció de les hèlices IV i V [Teller et al., 2001].

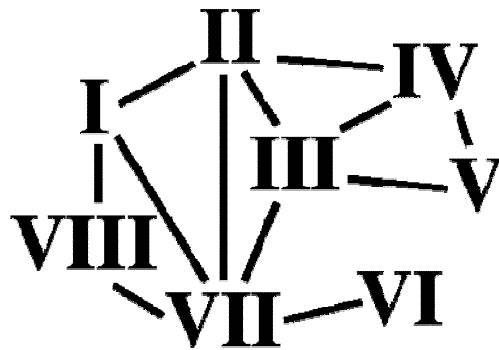


Figura I.1.7. Esquema de connexions entre les hèlices de la rodopsina a través de ponts d'hidrogen.

Les torsions en les hèlices, i els girs associats a aquestes torsions, són elements estructurals molt importants, juguen un paper decisiu en el canvi conformacional associat a l'activació dels GPCRs [Visiers et al., 2000]. En les torsions, el patró d'enllaços d'hidrogen es troba alterat, i s'ha proposat que els canvis conformacionals de l'activació de la rodopsina podrien tenir lloc en aquestes torsions ja que comportarien en efecte entàlpic menor [Filipek et al., 2003a].

S'ha descrit un nombre important de residus conservats en les estructures hèlix- α dels GPCRs. El paper d'aquests aminoàcids conservats en les interaccions entre hèlices, en

diversos aspectes de les relacions estructura-funció, com ara en l'activació del receptor, en la unió al lligand, entre altres, ha estat i és objecte d'estudi [Fillipek et al., 2003b]. L'anàlisi d'aquests residus altament conservats, a més, ens permet la identificació i la comparació dels residus transmembrana dels diferents GPCRs. A continuació es descriuen una sèrie d'aminoàcids conservats en les hèlices utilitzant el sistema de numeració proposat per Ballesteros i Weinstein [Ballesteros and Weinstein, 1995].

L'hèlix I es caracteritza per una Asn conservada, N1.50, que es troba precedida en molts GPCRs per la G1.49. En un estudi recent fet sobre 270 membres de la família A dels GPCR [Mirzadegan et al., 2003, mateixa referència que fem servir per a totes les comparacions] mostra que la N1.50 és invariable entre aquests receptors i la conservació de la G1.49 és del 68%. En l'hèlix II el residu més característic és el D2.50 amb un 94% de conservació, i també els aminoàcids L2.56 i A2.57 es troben en la majoria de GPCRs.

Un motiu altament conservat en els GPCRs és el triplet DRY, que es troba en l'extrem citoplasmàtic de la hèlix III. Aquest correspon als aminoàcids D3.49, R3.50 i Y3.51, que podem trobar en altres GPCRs com a E/D R Y/W (les freqüències respectives de conservació d'aquests residus són del 86%, 96% i 83% respectivament [Mirzadegan et al., 2003]). En el cas de la rodopsina el motiu és ERY. El residu R3.50 es troba unit per enllaç de pont d'hidrogen al residu 3.49 i a un o dos residus de l'hèlix VI [Ballesteros et al., 1998], que en el cas de la rodopsina són els residus E6.30 i T6.34. S'ha descrit que el trencament d'aquesta xarxa de connexions electrostàtiques mitjançant mutacions fa que el receptor presenti activitat constitutiva degut al moviment d'allunyament de l'hèlix III respecte a l'hèlix VI, procés que mimetitzava el mecanisme descrit per a l'activació del receptor [Fillipek et al., 2003a; Ramon et al. In Press]. En l'hèlix III també hi trobem els aminoàcids conservats L3.43 i C3.25 (Cys conservada un 90%). Aquesta C3.25 conjuntament amb una Cys present a la nansa E-II formen un pont disulfur altament conservat en la majoria de GPCRs. En la rodopsina també hi trobem en aquesta hèlix l'aminoàcid Glu-113 que actua com a contraió de la càrrega positiva del nitrogen de la base de Schiff protonada.

El W4.50, que es troba situat al centre de l'hèlix IV, és el residu més conservat de l'hèlix i el que la caracteritza. En l'hèlix V el residu més conservat és la Y5.58 (77%), però la P5.50 és

l'aminoàcid de referència en el sistema de numeració utilitzat per tal de facilitar la identificació dels residus transmembrana en la família de GPCRs.

En l'hèlix VI trobem el fragment transmembrana més conservat entre els GPCRs, amb els aminoàcids F6.44 (89%), C6.47, W6.48 (90%) i P6.50. A l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix també hi trobem uns aminoàcids bàsics conservats R/K, en les posicions 6.32 i 6.35 respectivament. En molts GPCRs també s'ha descrit un aminoàcid àcid en la posició 6.30.

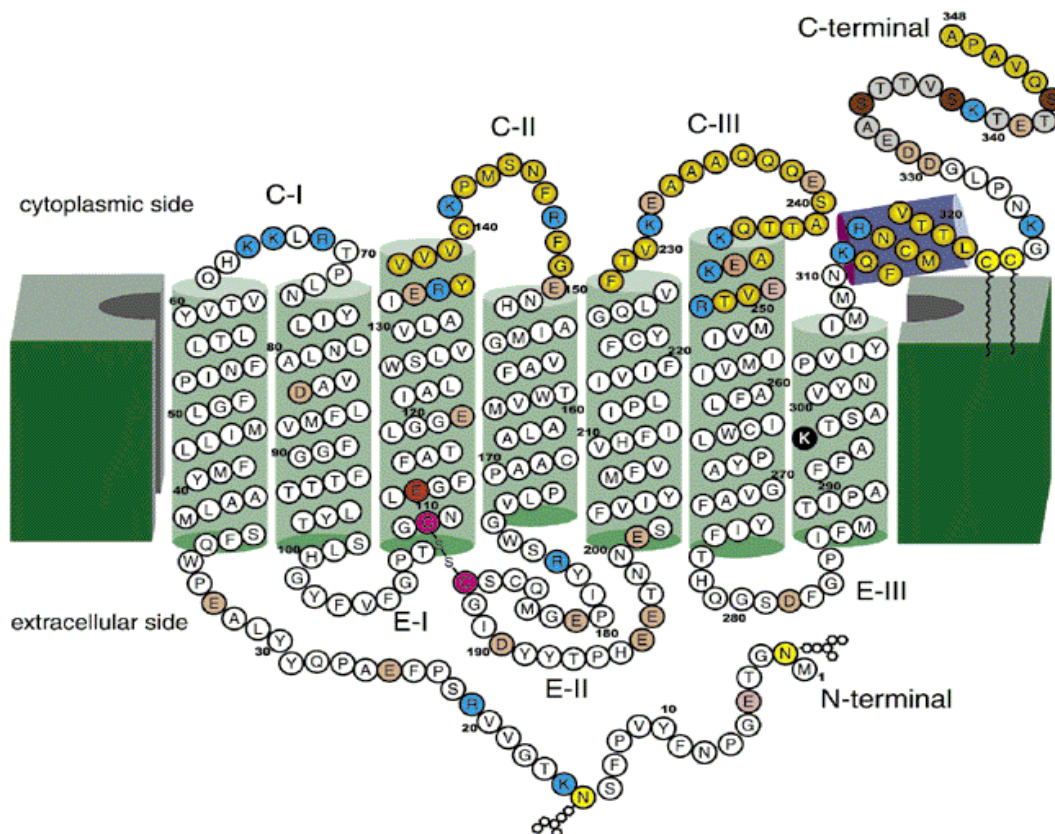


Figura I.1.8. Estructura secundària de l'apoproteïna opsina. Es poden observar les 7 hèlixes transmembrana i la vuitena hèlix paral·lela a la bicapa lipídica. En l'extrem N-terminal es representen les N-glicosilacions en el residu Asn-2 i Ans-15 [Fukuda et al., 1982]. També observem el pont disulfur entre la Cys de l'hèlix III i la Cys present en el E-II, altament conservat en la família de GPCRs [Karnik et al., 1988; Ridge et al., 1995; Davidson et al., 1994]. Les palmitoilacions en les Cys del domini C-terminal que permeten el seu ancoratge a la membrana lipídica [O'Brien and Zatz, 1984] també estan representades. L'aminoàcid 296, en negre, corresponent a la Lys-296 que uneix el retinal a través d'una base de Schiff protonada. El Glu-113, color vermell, actua de contraió d'aquesta base de Schiff. Els aminoàcids àcids es representen en color taronja i els bàsics en color blau. Els aminoàcids de les nanses C-II i C-III i del C-terminal implicats en el reconeixement de la transducina es representen en groc igual que els 5 aminoàcids del C-terminal responsables del transport vectorial de la proteïna. Els aminoàcids fosforilables de l'extrem C-terminal estan representats en marró.

Finalment en l'hèlix VII hi trobem el motiu altament conservat NPXXY, amb la P7.50 (96%) com a residu de referència. No s'ha definit una funció clara per aquest motiu que es troba en el C-terminal de l'hèlix però se li atribueix un paper estructural important en el manteniment de la conformació inactiva del receptor [Fritze et al., 2003]. En el receptor rodopsina també hi trobem en aquesta hèlix la Lys-296 que uneix, a través d'una base de Schiff protonada, el cromòfor 11-*cis*-retinal.

REGIÓ EXTRACEL·LULAR

La regió extracel·lular està formada per tres nanses que connecten les hèlices II-III, IV-V, VI-VII i per l'extrem N-terminal de la proteïna. En la nansa E-II, nansa que connecta les hèlices IV i V, cal destacar la presència de la Cys-187 que forma un pont disulfur amb la Cys-110. S'ha descrit que aquest pont disulfur té un paper important en el manteniment de l'estabilitat de la conformació inactiva [Davidson et al., 1994; Karnik et al., 1988; Ridge et al., 1995]. També en aquesta nansa cal destacar l'estructura de full- β , dels residus 173-198, que s'estén al llarg de la cadena de poliè del cromòfor 11-*cis*-retinal, estabilitzant el lligand dins el domini transmembrana. Aquesta nansa E-II presenta diferent longitud en els diferents GPCR al igual que diferents motius estructurals en la regió del full- β . En l'extrem N-terminal de la rodopsina hi trobem dues Asn glicosilades (aminoàcids 2 i 15). S'ha descrit que mutacions en Asn-2 no alteren ni el plegament, ni el transport cel·lular, ni la funció del receptor, però que mutacions en la posició Asn-15 si que afecten el plegament, el transport fins a la membrana i l'activació de la proteïna G [Kaushal et al., 1994a].

REGIÓ INTRACEL·LULAR

La regió intracel·lular està formada per quatre nanses. Les nanses que uneixen les hèlices I-II, III-IV, V-VI i una quarta nansa que es forma degut a que les Cys-322 i Cys-323 palmitoilades es troben ancorades a la membrana [Konig et al., 1989]. Aquesta quarta nansa intracel·lular s'estructura com una vuitena hèlix- α paral·lela a la membrana. S'ha descrit que les nanses C-II i C-III i el domini C-terminal, també citoplasmàtic, participen en la unió i/o activació de la proteïna G [Yamashita et al., 2000] i que l'extrem N-terminal de la quarta nansa modularia la unió a la proteïna G [Marin et al., 2000]. En l'extrem C-terminal hi trobem residus de Ser/Thr fosforilables que són claus per a la inactivació del receptor [McDowell et al., 1993]. S'ha descrit

però que *in vivo* la fosforilació seria principalment sobre els residus Ser-334, Ser-338 i Ser-343 [Ohguro et al., 1995]

CAVITAT D'UNIÓ AL RETINAL

Una de les característiques específiques de la rodopsina és que presenta el seu lligand, l'11-*cis*-retinal, unit de forma covalent a la forma inactiva de la rodopsina. La unió és a través d'una base de Schiff protonada entre el grup aldehid del retinal i el grup amino de la cadena lateral de la Lys-296. L'11-*cis*-retinal, derivat de la vitamina A, és el responsable de l'absorció de la llum, i com a resultat d'aquesta absorció de radiació electromagnètica es produeix la isomerització d'aquest a tot-*trans*-retinal.

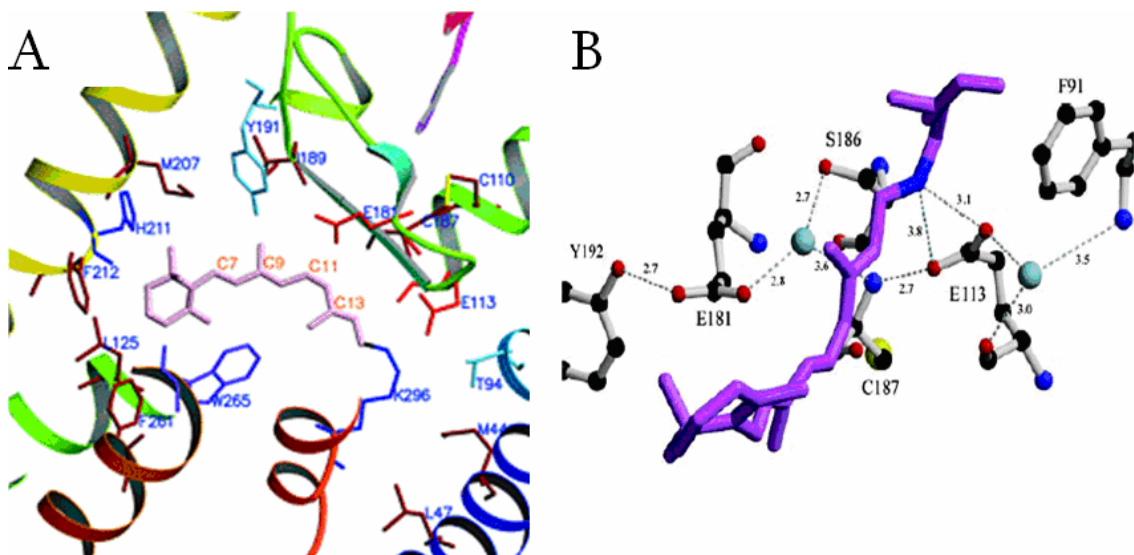


Figura I.1.9. A. Detall de la butxaca del retinal, on es veuen els diferents aminoàcids implicats en l'estabilització del retinal i en la transferència del canvi conformacional –que es produeix després de la seva isomerització– a la proteïna [Palczewski et al., 2000] B. Esquema dels ponts d'hidrogen propers a la base de Schiff, tenint en compte les molècules d'aigua descrites dins la cavitat d'unió al retinal [Okada et al., 2002].

La isomerització del cromòfor es tradueix en un canvi conformacional de la proteïna, que es transmet al domini citoplasmàtic d'aquesta, on tindrà lloc la interacció amb les diferents proteïnes de la cascada de fototransducció visual. Diverses cadenes laterals hidrofòbiques envolten la cavitat d'unió del retinal, tals com les cadenes laterals dels aminoàcids Phe-212, Phe-261 i Trp-265, que envolten el grup β -ionona i la regió 11-*cis* del cromòfor. També hi trobem, però, aminoàcids polars en la cavitat d'unió del retinal: això implica un cost

energètic que incideix en l'estabilitat de la proteïna suggerint que aquests aminoàcids tenen una implicació estructural i/o funcional important. Un d'aquests aminoàcids és el Glu-113 que serveix de contraió de la base de Schiff protonada entre el retinal i el grup ϵ -amino de la Lys-296 [Sakmar et al., 1989; Jager et al., 1994a]. Els aminoàcids que s'ha descrit que formen la butxaca del retinal són Met-44, Leu-47, Thr-94, Ala-117, The-118, Gly-121, Glu-122, Glu-181, Met-207, His-211, Phe-212, Phe-261, Tyr-268, Ala-269, Trp-265, Phe-293, Ala-295 i Lys-296 [Palczewski et al., 2000] (Figura I.1.9).

També s'ha descrit la presència de molècules d'aigua en l'estructura cristal·lina de la rodopsina i el seu paper en la unió i estabilització del lligand [Okada et al., 2002; Pardo et al., 2006]. En concret s'han descrit set molècules d'aigua en el segment transmembrana de la rodopsina. Un primer conjunt de tres molècules d'aigua es troba en contacte amb el residu N302, del motiu NPXXY de l'hèlix VII, i amb el Asp-83 de l'hèlix II. S'ha descrit que la xarxa de ponts d'hidrogen que es forma entre residus de l'hèlix II i l'hèlix VII conjuntament amb la molècula d'aigua podria determinar el pKa de l'equilibri entre la forma activa Metarodopsina II (MetaII) i el fotointermediari Metarodopsina I (MetaI) [Breikers et al., 2001]. Hi ha dues altres molècules d'aigua que es troben molt properes a la base de Schiff. Una d'aquestes dues molècules es troba entre les cadenes laterals dels aminoàcids Glu-181, Ser-186 i el contraió de la base de Schiff, Glu-113, i s'ha proposat que aquesta molècula d'aigua podria tenir un paper clau en la transferència del contraió del Glu-113 en l'estat fonamental de la rodopsina al Glu-181 en la conformació MetaI [Yan et al., 2003].

L'altra molècula apareix a l'entorn del Glu-113 i la base de Schiff protonada. S'ha proposat que aquesta molècula d'aigua podria estabilitzar el pont salí entre el contraió i la base de Schiff protonada (Figura I.1.9). El paper proposat per aquesta molècula d'aigua és consistent amb els resultats obtinguts en estudis previs, on la introducció de la mutació E113D no elimina el seu paper com a contraió de la base de Schiff [Jager et al., 1994a]. L'existència d'aquesta molècula d'aigua permet que l'intercanvi d'un àcid glutàmic per un àcid aspàrtic, que comporta una reducció en la longitud de la cadena lateral de l'aminoàcid, no trenqui el pont salí entre la càrrega positiva de la base de Schiff i el seu contraió.

Una altra molècula d'aigua s'ha descrit entre les hèlices VI i VII, i finalment una darrera es proposa que podria facilitar la interacció de les parts més citoplasmàtiques de les hèlices I i II.

La presència de cations en el domini transmembrana i en particular en la cavitat d'unió al lligand pot jugar un paper rellevant en l'estructura i/o funció de la rodopsina. En particular cal destacar la presència d'ions Zn^{2+} en l'estructura cristal·lina de la rodopsina [Palczewski et al., 2000; Okada et al., 2002]. L'efecte del zinc en l'estabilitat de la rodopsina i en la seva regeneració ha estat analitzat prèviament [Del Valle et al., 2003].

I.1.2.4. FOTOINTERMEDIARIS D'ACTIVACIÓ

L'absorció d'un fotó per part de la rodopsina permet la fotoisomerització del doble enllaç *cis* C11-C12 del cromòfor a tot-*trans*-retinal. Aquesta reacció, una de les reaccions fotoquímiques més ràpides de la naturalesa, precedeix la formació, passant per diferents fotointermediaris d'activació, d'un estat estable a temperatura ambient capaç d'activar la transducina, anomenat Metarodopsina II (MetaII). Els diferents fotointermediaris d'activació que es formen fins a arribar a l'estat activat només són estables a baixa temperatura i poden ser detectats espectroscòpicament ja que presenten diferents màxims d'absorció en la regió del visible (Figura I.1.10).

Podem distingir tres fases en el procés d'activació del receptor: (1) la isomerització *cis-trans* induïda per la llum; (2) La relaxació tèrmica del complex retinal-rodopsina; i (3) un últim equilibri entre els fotointermediaris Metarodopsina, que es veu influenciat per la interacció rodopsina-transducina [Okada et al., 2001].

Dues parts de l'energia d'absorció d'un fotó (238kJmol^{-1}) s'emmagatzemen en el cromòfor isomeritzat, és a dir en el complex tot-*trans*-retinal/opsina, que portarà al receptor de la conformació 11-*cis*-retinal/opsina, via Fotorodopsina, a la conformació Batorodopsina. La isomerització del cromòfor sembla tenir lloc degut a la rotació del doble enllaç C11-C12 del retinal, apropant la cadena poliènica a la cadena lateral de la Ser-188. Aquest impediment estèric restringeix el grau de rotació del cromòfor obtenint-se el que es coneix com a

conformació tot-*trans* distorsionada. En la fase de relaxació, durant la transició de Batorodopsina a Lumirodopsina, aquesta distorsió s'eliminarà degut a la recol·locació del grup β -ionona del retinal [Okada et al., 2001].

El fotointermediari MetaII és l'estat capaç d'interaccionar i activar la transducina. A temperatura fisiològica existeix un equilibri entre la conformació MetaI i l'estat activat MetaII. Aquest equilibri però, es troba desplaçat cap a la conformació MetaII degut a la presència de transducina. La formació de MetaII a partir del seu predecessor el fotointermediari MetaI va acompanyada d'un desplaçament important en el màxim d'absorció al visible, del trencament del pont salí entre el Glu-113 i la base de Schiff protonada i del moviment de les hèlices transmembrana [Sakmar, 1998; Cohen et al., 1993; Farrens et al., 1996]. Tots aquests canvis tenen lloc en un interval de mil·lisegons.

S'ha descrit també la formació *in vitro* del fotointermediari Metarodopsina III (MetaIII), que podria actuar com a forma d'emmagatzematge de tot-*trans*-retinal [Heck et al., 2003]. *In vivo*, però, la conformació MetaIII pràcticament no es forma degut a la presència de la transducina, que també desplaça l'equilibri a la conformació activa MetaII.

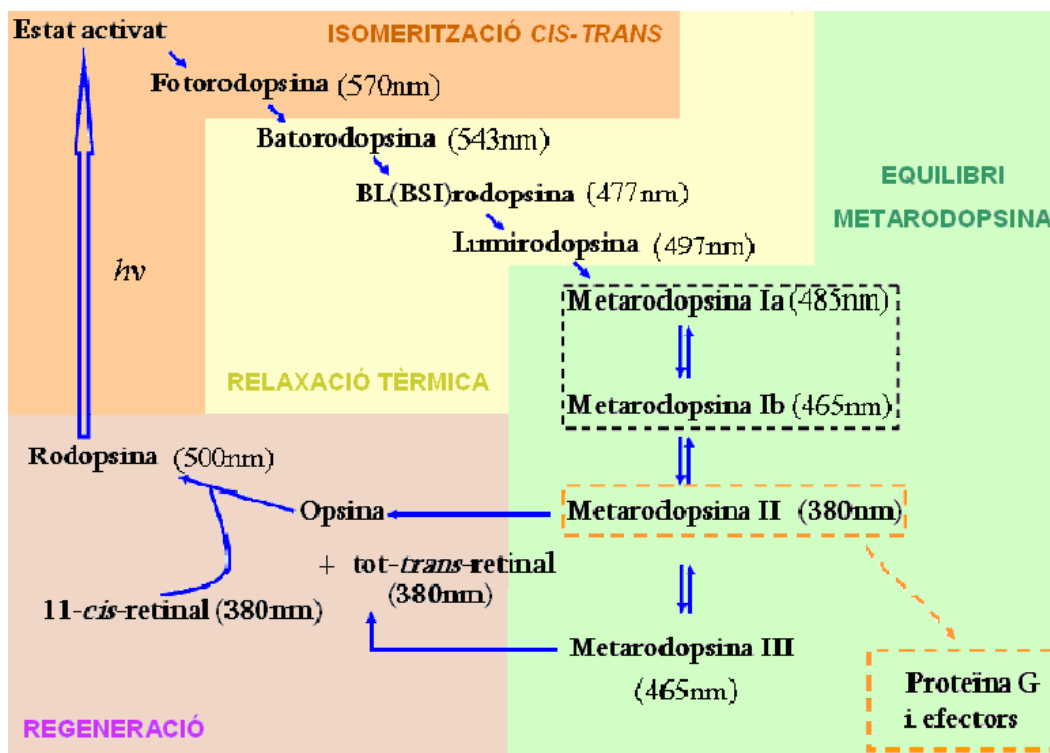


Figura I.1.10. Esquema que es proposa actualment sobre els diferents fotointermediaris que es formen fins a arribar a l'estat activat MetaII i les longituds d'ona a les quals absorbeix cada fotointermediari.

Recentment s'ha proposat l'existència de dos fotointermediaris que podrien interaccionar amb la transducina [Shichida and Morizumi, 2006]. L'intercanvi de GDP-GTP en la transducina s'ha descrit amb tres passos: (i) la unió de la proteïna fotoactivada a la transducina-GDP, (ii) la dissociació del GDP del complex rodopsina-transducina, -deixant la G_t no unida a nucleòtid-, i (iii) la unió de GTP a la transducina. S'ha descrit que el complex MetaII- G_t és dóna amb la forma G_t no unida a nucleòtid, indicant que el complex és troba entre els passos (ii) i (iii). És probable doncs, que la conformació que s'uneix a la transducina-GDP sigui un precursor de la forma MetaII. S'ha identificat una conformació pròxima al que es coneix clàssicament com a intermediari MetaI amb una $\lambda_{m\grave{a}x}$ de 465nm [Tachibanaki et al., 1997]. Els autors anomenen la conformació MetaI clàssica com a MetaIa i el nou fotointermediari com a MetaIb. La conformació MetaIb presenta la base de Schiff protonada i interacciona amb la transducina però no pot induir l'intercanvi de GDP-GTP (Figura I.1.11) [Tachibanaki et al., 1998].

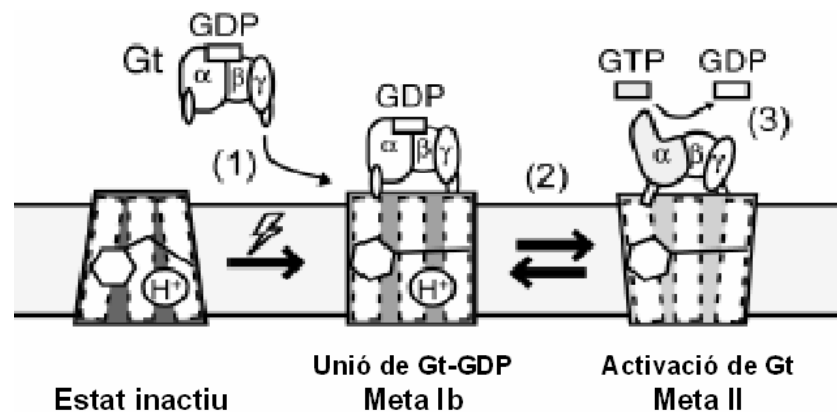


Figura I.1.11. Model d'interacció rodopsina-transducina proposat per Shichida and Morizumi, 2006.

En aquest treball s'estudia la implicació de fotointermediaris alterats d'activació en les bases moleculars de la Retinosi Pigmentària (RP). Les mutacions introduïdes podrien alterar la cascada de fotointermediaris d'activació causant en últim terme RP, en concret s'estudiarà la formació d'un fotointermediari alterat per a les mutacions d'adRP G51V i G89D.

I.1.2.5. MECANISME D'ACTIVACIÓ DE LA RODOPSINA

Hi ha diferents estudis fets sobre l'activació dels GPCRs, no es clar, però, que els estudis fets per a un GPCR concret aportin informació per a tots els GPCRs o si existeix variació d'aquests processos. En qualsevol cas, en els estudis fets fins el moment, no hi ha senyals evidents de diferències importants entre ells i de que es necessitin esquemes radicalment diferents per a l'activació dels diferents GPCRs [Gether et al., 2002; Meng and Bourne, 2001].

En particular, s'ha proposat un possible mecanisme d'activació comú per a la família A dels GPCRs en concordança amb les dades experimentals obtingudes per al procés d'activació de la rodopsina [Hubbell et al., 2003; Okada et al., 2001; Meng and Bourne, 2001]. El moviment de les hèlices transmembrana és un component important en el canvi conformacional que acompanya la transició de l'estat inactiu a l'estat actiu. En concret, s'ha descrit el moviment del C-terminal de l'hèlix VI, seguint una rotació en sentit de les agulles del rellotge, que l'allunya del nucli de la regió transmembrana. Aquest moviment de l'hèlix VI va acompanyat del moviment, encara que menys significatiu, de les hèlices transmembrana II, III i VII relatiu al nucli transmembranal. Així doncs, a través d'aquest moviment de les hèlices el receptor s'expandeix, s'obre l'estructura en el costat citoplasmàtic de la membrana, i es crea un lloc d'unió a la proteïna G. La creació d'aquest lloc d'unió també implicaria el moviment de les nanses C-II i C-III [Acharya et al., 1997; Arimoto et al., 2001].

En el cas de la rodopsina la formació de l'estat actiu, MetaII, a partir de l'estat predecessor MetaI es degut al trencament del pont salí entre la base de Schiff i el seu contraió i del moviment de les hèlices transmembrana. La translocació del protó de la base de Schiff protonada al contraió Glu-113 té lloc quan la distància i la orientació són òptimes, això ens indica que hi ha hagut canvis conformacionals. La transferència d'aquest protó destrueix un punt clau de l'estabilització de l'estat fonamental. La formació de MetaII va lligada també a la captació d'un protó del citoplasma, que probablement involucra la protonació de l'aminoàcid conservat Glu-134 [Arnis and Hofmann, 1993; Fahmy et al., 2000; Sheer et al., 1997], que forma part del motiu altament conservat D/ERY. El Glu-134 forma un pont salí

amb l'Arg-135, la qual sembla interaccionar també amb els residus Glu-247 i Thr-251 en la hèlix VI. La protonació del residu 134 desestabilitzaria la xarxa d'interaccions provocant un moviment de les hèlices transmembrana, també descrit pel receptor β_1 -adrenèrgic [Sheer et al., 1997] i pel receptor de la trombina [Siebert et al., 1999]. S'ha descrit que el mutant E134Q presenta activitat constitutiva, l'eliminació de la càrrega negativa en la posició 134 elimina la captació d'un protó del medi però no la transferència de protó al Glu-113 [Cohen et al., 1993; Arnis et al., 1994].

Les nanses C-II i C-III i el domini C-terminal intracel·lular són claus per a la iniciació i la terminació de la transducció del senyal (llocs de reconeixement i activació de la proteïna G). Els dominis C-III més llargs (100-240 aminoàcids) es troben en receptors que s'uneixen a les proteïnes G_i , G_o , G_q (muscarínic i α -adrenèrgic). Aquests receptors actuen en diferents tipus cel·lulars i s'uneixen a múltiples proteïnes G i efectors, i el fet de tenir una nansa C-III llarga podria ajudar a mantenir la fidelitat a una ruta de senyalització específica. Mentre que en aquells receptors com la rodopsina i els β -adrenèrgics, d'especificitat més concreta, les nanses C-III són curtes (20-50 aminoàcids), ja que no requeriran d'aquestes possibilitats de regulació addicional.

També ha estat objecte d'estudi en aquesta tesi el mecanisme d'activació dels GPCRs. S'han mutat aminoàcids de les nanses C-II i C-III de la rodopsina pels aminoàcids corresponents del receptor muscarínic M3. Els receptors muscarínics pertanyen a la família A dels GPCRs, com la rodopsina. Els diferents subtipus de receptors muscarínics (M1-M5) s'expressen de forma diferencial en els teixits i es troben associats a diferents tipus de proteïnes G i a diferents sistemes de segons missatgers. Els receptors muscarínics M1, M3 i M5 s'associen principalment a proteïnes G del tipus G_q/G_{11} , que estimulen la hidròlisi del fosfoinositol mitjançant la fosfolipasa C, produïnt en un increment de les concentracions dels segons missatgers inositol trifosfat i diacilglicerol. Els mutants rodopsina-M3 muscarínic construïts ens han d'ajudar a determinar els aminoàcids implicats en l'especificitat de reconeixement de proteïna G. L'objectiu final era construir una proteïna que s'activés per la llum i la resposta cel·lular fos via G_q/G_{11} .

I.1.2.6. MECANISME DE TRANSDUCCIÓ DE SENYAL

Un cop la rodopsina ha estat fotoactivada aquesta interacciona amb la transducina, desencadenant-se així la cascada de reaccions enzimàtiques que constitueixen el mecanisme de transducció del senyal. En concret, la rodopsina interacciona amb la subunitat α de la transducina permetent l'alliberació de les subunitats β i γ , subunitats de bloqueig i ancoratge a la membrana. En la subunitat α de la transducina, que presenta activitat GTPàsica, es produirà el bescanvi d'una molècula de GDP, que es troba a l'interior de la α -transducina, per una molècula de GTP present en el medi. Això provocarà un canvi conformacional que permetrà la interacció d'aquesta subunitat amb la fosfodiesterasa, enzim que hidrolitza de forma molt eficient el GMPc a GMP. La fotoactivació de la rodopsina per un sol fotó provocarà l'activació d'aproximadament 500 molècules de transducina provocant un descens sensible dels nivells citosòlics de GMPc. Aquest segon missatger controla els canals catiónics de la cèl·lula. En baixar els nivells citosòlics de GMPc, els canals catiónics de la cèl·lula es tancaran i es donarà la hiperpolarització de la membrana plasmàtica i com a conseqüència es crearà l'impuls nerviós responsable de la visió (Figura I.1.12) [Molday, 1998].

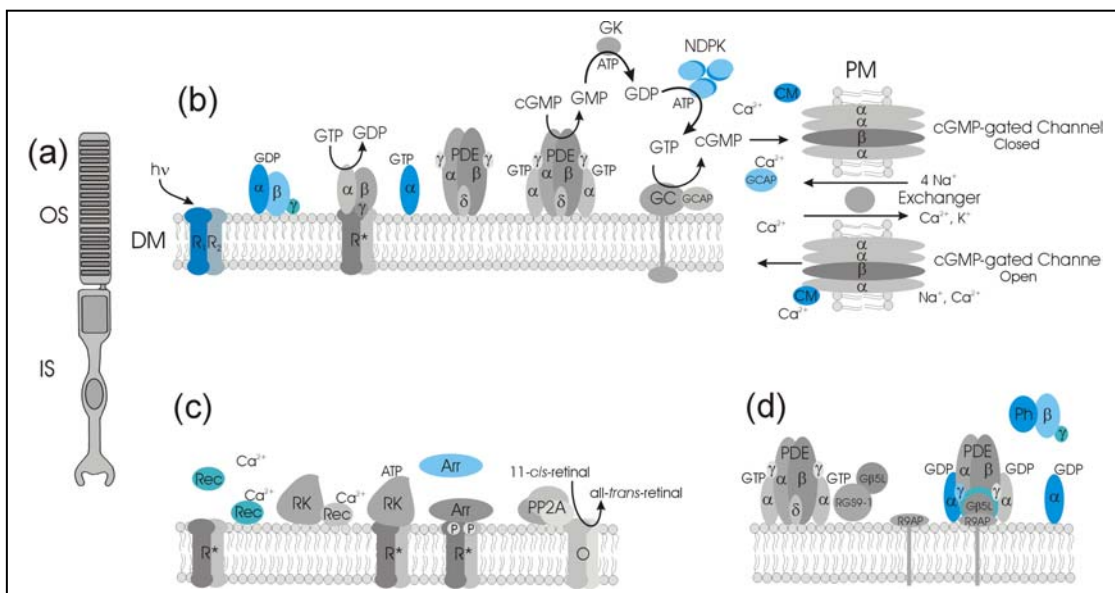


Figura I.1.12. Cascada de fototransducció visual. Les conformacions actives es representen amb un *. a) Cèl·lula bastó; b) Cascada de transducció del senyal en la fotoactivació de la rodopsina c) Mecanisme d'inactivació de la rodopsina activada d) Mecanisme d'inactivació de $G\alpha$ -GTP

La inactivació de la rodopsina activada es produeix a conseqüència de la fosforilació de l'extrem C-terminal mitjançant l'enzim rodopsina quinasa. Aquesta fosforilació redueix l'afinitat de la rodopsina per la transducina [Mitchell et al., 1992] i a més provoca la unió de la proteïna anomenada S-antigen o arrestina, que forma part de la família d'arrestines responsables de la regulació de l'activitat dels GPCRs. La unió d'aquesta arrestina bloqueja estèricament la possible unió de la G_t [Nicolas et al., 2000]. Els principals punts d'unió entre la rodopsina i l'arrestina inclouen els aminoàcids Ser-251 i Ser-252 de l'arrestina i els aminoàcids 340-348 de la rodopsina [Smith et al., 2004].

Recentment s'ha descrit l'estructura com a dímer de la rodopsina en la determinació de la seva estructura cristal·lina [Fotiadis et al., 2003a]. Es pensa que la dimerització podria ser un fenomen universal per a la modulació de la funció dels receptors GPCRs. L'estudi portat a terme per Liang Y et al., mitjançant la tècnica de AFM [Liang et al., 2003], ens aporta més detalls de la dimerització de la rodopsina i conceptes implicats en la dimerització del receptor. La interacció de la rodopsina amb la transducina té dos aspectes a destacar (i) la mida de la superfície citoplasmàtica de la rodopsina és massa petita per unir les diferents subunitats de la proteïna G i (ii) la cooperativitat per aquesta interacció. El model d'interacció 1:1 (rodopsina: transducina) no és compatible amb els estudis experimentals, mentre que el dímer de rodopsina donaria una plataforma adequada per a la unió de les diferents subunitats de la transducina, compatible amb la cooperativitat de la interacció. Per altra banda, l'arrestina presenta una estructura biapartida amb dos dominis estructurals homòlegs de 7 barrils- β , formant dues cavitats d'unió a la rodopsina diferents separades per 3.8nm. Les càrregues positives que presenta el dímer de rodopsina anul·larien la càrrega negativa de l'arrestina. Així, un monòmer d'arrestina s'uniria a un dímer de rodopsina, desensibilitzant dues molècules de rodopsina i impeding la unió de la transducina. Recentment s'ha descrit la formació de dímers en rodopsina recombinant expressada en cèl·lules COS-1 i s'han identificat els aminoàcids implicats en la interfase del dímer [Kota et al., 2006]

I.1.2.7. CICLE VISUAL DELS RETINOIDES

La vitamina A és essencial per a la visió. L'isòmer 11-*cis* de l'aldehid de la vitamina A (11-*cis*-retinal) és el cromòfor, el component que absorbeix la llum, en els pigments visuals de

les cèl·lules con i bastó de la retina. El pas inicial, com ja s'ha explicat, de la transducció visual és la isomerització, induïda per la llum, de l'11-*cis*-retinal a la configuració tot-*trans*. Posteriorment, el tot-*trans*-retinal es dissocia de l'opsina deixant la cavitat d'unió lliure, permetent la regeneració d'aquesta a través de la unió d'una altra molècula d'11-*cis*-retinal.

L'isòmer 11-*cis* es troba gairebé exclusivament en els teixits oculars. La formació de l'isòmer implica una seqüència de reaccions metabòliques i de transport englobades dins el que es coneix com a "cicle visual dels retinoides". Tal i com es mostra en la Figura I.1.13, l'exposició a la llum del 11-*cis*-retinal produeix la formació del tot-*trans*-retinal que passarà a tot-*trans*-retinol per l'acció de la retinol deshidrogenasa. El tot-*trans*-retinol (tot-*trans* vitamina A) és transportat a través de la matriu interfotoreceptora (*interphotoreceptor matrix*, IPM) a l'epiteli pigmentari (*retinal pigment epithelium*, RPE). En el RPE el tot-*trans*-retinol és metabolitzat en absència de llum a 11-*cis*-retinal a través d'una esterificació, isomerització i oxidació. Després, l'11-*cis*-retinal és transportat altre cop als fotoreceptors on s'uneix covalentment al residu Lys-296 de la butxaca d'unió al lligand. S'ha descrit també una via de regeneració de l'11-*cis*-retinal en presència de llum, en la qual actuaria una proteïna homòloga a l'opsina però amb la capacitat d'unir tot-*trans*-retinal anomenada RGR. En presència de llum la proteïna RGR generaria 11-*cis*-retinal a partir del tot-*trans*-retinal [Pepperberg and Crouch, 2001].

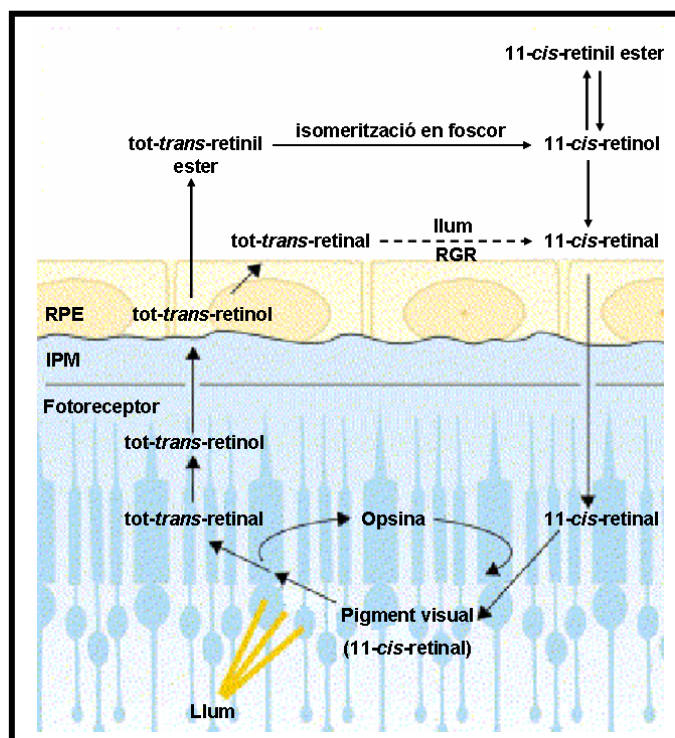


Figura I.1.13. Cicle visual de regeneració del retinal. Matriu interfotoreceptora (IPM), epiteli pigmentari de la retina (RPE).

La síntesi química d'anàlegs de retinal i la posterior regeneració de la proteïna opsina amb aquests s'utilitza en estudis de la cavitat d'unió al lligand, en estudis sobre les característiques químiques del lligand i el seu paper com a agonista invers, i també en estudis del procés de fotoactivació. Un capítol d'aquest treball va dedicat a l'efecte de la introducció d'un grup metil en el C7 del retinal en el procés de regeneració i de fotoactivació de la rodopsina.

I.1.2.8. PROPIETATS ESPECTROSCÒPIQUES DE LA RODOPSINA

El cromòfor 11-*cis*-retinal quan es troba lliure en solució etanòlica presenta un pic màxim d'absorbància en el visible de 376nm. Quan aquest mateix cromòfor, l'11-*cis*-retinal es troba dins la cavitat d'unió al lligand unit a l'opsina a través d'una base de Schiff protonada presenta un màxim d'absorció a 500nm (Figura I.1.14), aquestes diferències en el màxim d'absorció són degudes al canvi en l'entorn del retinal.

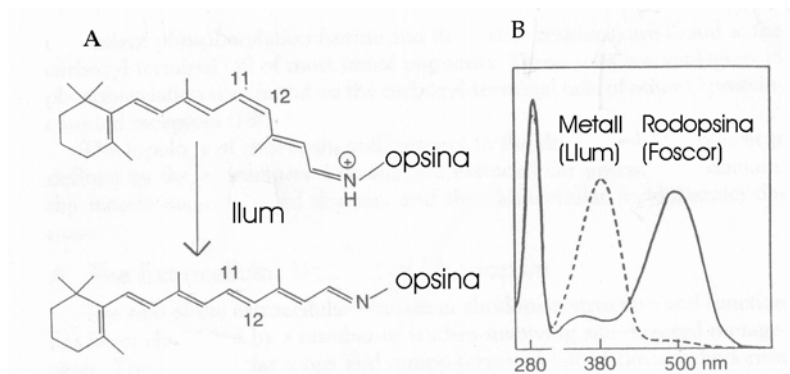


Figura I.1.14. A. Fotoisomerització del retinal. B. La línia continua ens mostra l'espectre d'absorció en l'UV-visible de la rodopsina en foscor amb una $\lambda_{\text{màx}}$ a 500nm. La línia discontinua és l'espectre d'absorció després de la il·luminació de la mostra amb una $\lambda_{\text{màx}}$ a 380nm, que ens indica que la rodopsina ha passat a la conformació activa MetaII.

El fet que la rodopsina absorbeixi a l'UV-visible ens permet la seva caracterització a través d'espectroscòpia UV-visible. Quan la proteïna es troba en la seva conformació inactiva presenta un màxim d'absorció a 500nm, a causa l'entorn proteic en el qual es troba el retinal i a la base de Schiff protonada. La conformació activa de la rodopsina, MetaII, presenta un màxim d'absorció a 380nm, ja que com a resultat de la fotoisomerització a tot-*trans*-retinal

es produeixen canvis en l'entorn proteic d'aquest i la desprotonació de la base de Schiff. Aquesta base de Schiff pot ser reprotonada, per acidificació de la mostra, produint-se un desplaçament de l'absorbància màxima a 440nm. Això ens permetrà diferenciar quina proporció del pic d'absorbància a 380nm correspon a l'estat activat MetaII i quina altra és contribució del tot-*trans*-retinal lliure, que també absorbeix a aquesta longitud d'ona. L'estudi de l'acidificació de la mostra il·luminada, acidificada a diferents temps després de la il·luminació (seguint l'evolució de la banda a 440nm en el temps) ens permetrà determinar l'estabilitat de la conformació activa MetaII (Figura I.1.15).

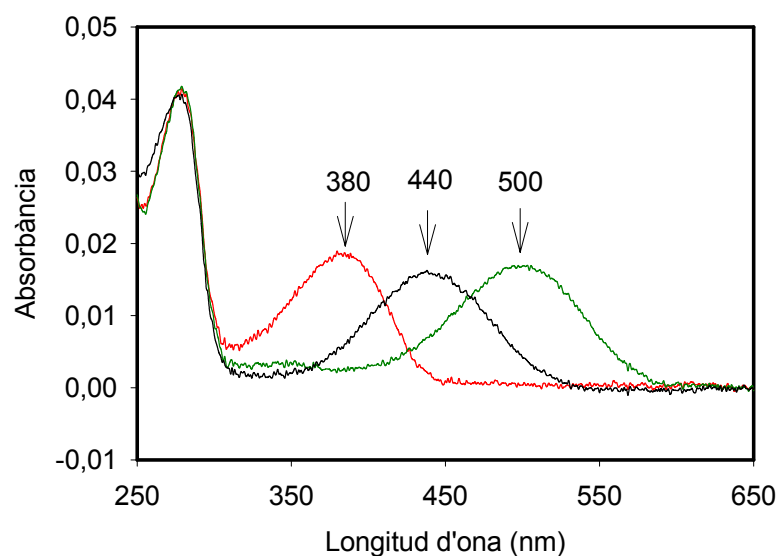


Figura I.1.15. En verd espectre de la rodopsina en fosc. En vermell espectre de la proteïna després d'il·luminar, la proteïna es troba en conformació MetaII. Posteriorment s'acidifica reprotonant-se així la base de Schiff i el màxim d'absorbància es desplaça a 440nm.

Altres experiments de caracterització de la rodopsina com poden ser la regeneració de la proteïna opsina amb retinal, l'estabilitat tèrmica de la conformació inactiva, l'estabilitat de la base de Schiff així com també la reactivitat en front la hidroxilamina entre altres, es poden realitzar mitjançant la tècnica d'espectroscòpia UV-visible. Tots aquests experiments es troben descrits en l'apartat de *Materials i Mètodes*.

I.1.2.9. MALALTIES DE LA RETINA ASSOCIADES A MUTACIONS EN LA RODOPSINA

Un aspecte de gran rellevància mèdica és el paper de la rodopsina en malalties degeneratives de la retina com la RP. La RP és la principal malaltia hereditària que causa degeneració de les cèl·lules de la retina. Engloba un grup de retinopaties degeneratives, clínicament i genèticament heterogènies, amb símptomes clínics comuns. La seva incidència és d'entre 1/3000-1/5000 persones [Kalloniatis and Fletcher, 2004, Ramon et al., 2004]. El nom de RP prové de la formació de taques pigmentoses en la retina com a conseqüència de la invasió de cèl·lules de l'epiteli pigmentari (Figura I.1.16). Els malalts de RP es caracteritzen per patir una degeneració gradual de les cèl·lules fotorceptors iniciada en els bastons, i posteriorment de les membranes externes de la retina. En estats més avançats es pot presentar atròfia de les cèl·lules del epiteli pigmentari, atenuació dels vasos sanguinis que conflueixen en la retina, dipòsits pigmentaris, així com, despigmentació i pal·lidesa del disc òptic.

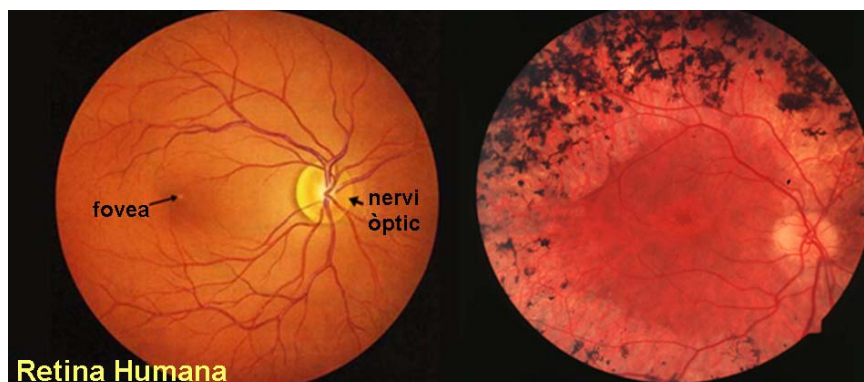


Figura I.1.16. Fons de lull d'un individu sa i d'un individu amb RP en el qual es pot apreciar, en la part superior d'aquest, els dipòsits pigmentaris característics de la malaltia.

La pèrdua de la funció fotorceptora es manifesta en forma de ceguesa nocturna, una progressiva pèrdua de la visió perifèrica i de l'agudesesa visual. En la figura següent s'observen les diferències existents entre la visió d'un individu sa respecte la d'un individu malalt de RP en un estat avançat de la malaltia (Figura I.1.17).



Figura I.1.17. A l'esquerra veiem una panoràmica del Pedraforca i a la dreta la visió en túnel o visió d'escopeta que tindria del Pedraforca un malalt afectat de RP.

La RP es pot classificar en diferents tipus segons el seu patró hereditari; autosòmica dominant (adRP) que representa un 16% de la gent afectada, autosòmica recessiva (arRP) amb un 31% de la gent afectada, xLRP d'herència lligada al sexe amb un 9% de les afectacions i que és la manifestació més severa, o deguda a mutacions esporàdiques (44% dels afectats) [Heckenlivery et al., 1988; Kalloniatis and Fletcher,2004].

En els darrers 15 anys s'han descrit més de 150 mutacions en el gen de la opsina associades a la forma autosòmica dominant de la RP (adRP), entre elles un gran nombre de mutacions puntuals i unes quantes delecions. Les mutacions associades a adRP es troben en tot el gen de l'opsina, en els tres dominis del receptor: intradiscal, transmembranal i citoplasmàtic [Garriga and Manyosa, 2002] (Figura I.1.18).

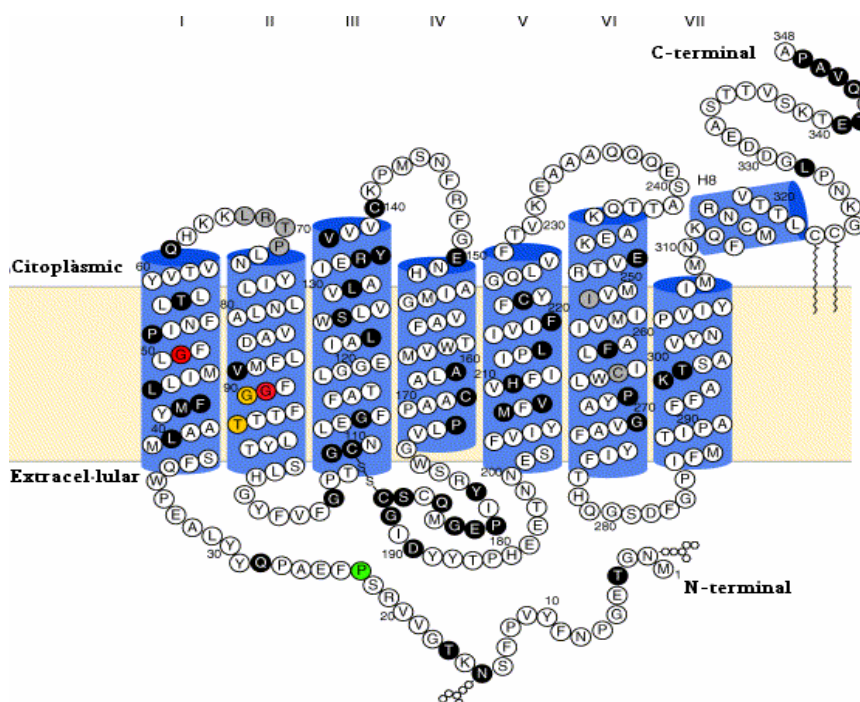


Fig.I.1.18. Estructura 2D de la rodopsina. En negre podem observar les mutacions descrites que causen RP. En vermell les posicions Gly-51 i Gly-89 que tractarem en detall. En gris es mostren les delecions que causen RP i en groc les mutacions associades a ceguesa nocturna congènita (*Congenital Stationary Night Blindness, CSNB*).

Aquestes mutacions en el gen de l'opsina que causen RP s'han classificat de diverses maneres. En són exemples les classificacions proposades per Sung [Sung et al., 1991] i Doi [Doi et al., 1990]. Segons Sung les mutacions es classifiquen en dos grups depenent de la localització subcel·lular de la proteïna mutada en la cèl·lula fotoreceptora, i de les característiques fenotípiques d'aquestes proteïnes mutades. La classificació de Doi es basa en les característiques estructurals i bioquímiques de la proteïna mutada, com podrien ser la regeneració del cromòfor, l'activació de transducina, el patró de glicosilació, etc. Una classificació més actual d'aquestes mutacions es descriu en detall a continuació.

Classificació de les mutacions en el gen de la opsina.

Les mutacions en el gen de la opsina es classifiquen en sis classes segons l'efecte que causa la mutació en la proteïna [Mendes et al., 2005]. Les mutacions de classe I són aquelles mutacions que permeten un correcte plegament de la rodopsina però que presenten el transport a la membrana afectat. La classe II es refereix a aquelles mutacions que causen un mal plegament de la proteïna, que són retingudes en el reticle endoplasmàtic i no són reconstituïdes fàcilment amb 11-*cis*-retinal. Les mutacions de classe III corresponen a aquelles mutacions que afecten l'endocitosi, com podria ser el mutant R135L [Chuang et al., 2004]. Les mutacions de classe IV no afectarien el plegament *per se* però sí que afectarien l'estabilitat i les modificacions postranscripcionals, un exemple seria la mutació T4R [Zhu et al., 2004]. De forma similar les mutacions de classe V no presentarien un efecte inicial en el plegament però presentarien un increment en la velocitat d'activació de la transducina [Andres et al., 2003]. Els mutants que presenten un plegament correcte però que presenten activitat constitutiva, en absència de cromòfor i en foscor, són els mutants que classifiquem com a mutants de classe VI. Finalment es proposa que per aquelles mutacions que no s'hagi observat un defecte bioquímic o cel·lular, o que no hagin estat estudiades quedin pendents de classificació.

Aquestes classes no són excloents, per exemple, la mutació K296E presenta activitat constitutiva i també presenta mal plegament de la proteïna [Robinson et al., 1992; Saliba et al., 2002]. En el cas de la mutació K296E se suggereix classificar-la com a mutació de classe

II, ja que és una mutació que causa adRP i de forma general els mutants de classe VI causen ceguera nocturna congènita (*Congenital Stationary Night Blindness*, CSBN). La classificació de les mutacions descrites fins el moment sobre el gen de l'opsina es mostra a la taula de continuació.

Classificació	Característiques	Aminoàcid	Mal plegament
Classe I	<i>Plegament normal però no correcte transport a la membrana.</i>	L328, T342, Q344, V345, A346, P347	No
Classe II	<i>Retingudes al ER i no reconstitueixen fàcilment amb 11-cis-retinal.</i>	T17, P23, G51, T58, V87, G89, G106, C110, L125, A164, C167, P171, Y178, E181, G182, C187, G188, D190, H211, C222, P267, S270, K296	Si
Classe III	<i>Afecta a l'endocitosi.</i>	R135	No
Classe IV	<i>No afecta necessàriament al plegament però si a l'estabilitat i a les modificacions posttranslacionals.</i>	T4	No
Classe V	<i>Augment de la velocitat d'activació de transducina</i>	M44, V137	No
Classe VI	<i>Presenten activitat constitutiva de l'opsina</i>	G90, T94, A292	No
No classificades	<i>No presenten defecte bioquímic o cel·lular o no estudiades en detall</i>	N15, Q28, L40, F45, L46, P53, G109, G114, S127, L131, Y136, C140, E150, P170, G174, P180, Q184, S186, T193, M207, V209, P215, M216, F220, E249, G284, T289, S297, E341	

Taula I.1. Classificació de les posicions aminoacídiques de la proteïna opsina descrites fins el moment en les quals es troba una mutació que causa RP

En aquest treball s'estudiaran mutacions en l'hèlix I i II que causen RP, en concret les mutacions G51A, G51V i G90D, amb la finalitat d'apropar-nos a les bases moleculars de la malaltia.

Fins el moment no s'ha descrit cap teràpia efectiva per a l'RP, des de fa anys s'utilitza la vitamina A com a suplement nutricional per reduir els efectes de la malaltia [Berson, 2000].

Recentment hi ha però una controvèrsia en l'efectivitat del tractament [Miggiano and Falsini, 2004]. En l'actualitat s'estan estudiant aproximacions de teràpia gènica i transplantaments de cèl·lules de la retina per curar definitivament la malaltia [Lu et al., 2002a; Sagdullaev 2003; Kaplan et al., 1997, Dejneka et al., 2003].

La CSNB és una malaltia que presenta una simptomatologia semblant als estadis primaris de l'RP, els malalts tenen afectada la visió nocturna i mantenen la visió diürna durant tota la vida. No s'ha detectat tampoc degeneració de les cèl·lules de la retina, almenys fins a edats avançades [Sieving et al., 1995]. Fins al moment s'han descrit tres mutacions en el gen de la opsina que causen la malaltia, G90D [Rao et al., 1994], T94I [al-Jandal et al., 1990] i A292E [Dryja et al., 1993] que es transmeten mitjançant un patró d'herència autosòmica dominant.