

Materials i Mètodes

III

En aquest capítol es descriuen els principals processos experimentals utilitzats en aquest treball; alguns de generals de biologia molecular i de tècniques biofísiques i d'altres de particulars per a la rodopsina, degut a les seves característiques específiques.

III.1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES NATIVES

III.1.1. OBTENCIÓ DE RODOPSINA A PARTIR DE RETINES BOVINES

El mètode utilitzat per a l'obtenció dels segments externs de les cèl·lules bastó (ROS), on es troba la rodopsina, es basa principalment en el mètode descrit per Papermaster i Dreyer [Papermaster and Dreyer, 1974] en el que s'utilitza el fraccionament subcel·lular en gradient de sacarosa.

Protocol d'obtenció de ROS a partir de retines bovines—Les retines s'obtenen a WL Lawson, Co. (Lincoln, Nebraska USA). La purificació de ROS es fa en llum vermella de baixa intensitat i a 4°C. Es posen en un tub aproximadament 25 retines amb 15ml de sacarosa 30% (w/v), s'homogenitza amb el vòrtex durant 1min i es centrifuga a 5,000rpm (rotor A8-24, Kontron) durant 5min. Es repeteix el pas dues vegades més i el conjunt de sobrenedants es centrifuguen durant 15min a 14,000rpm (rotor A8-24, Kontron). El *pellet* es resuspèn amb 40ml de sacarosa 15% (w/v). La suspensió es col·loca damunt una solució 0.64M de sacarosa i es centrifuga (14,000 rpm, rotor A8-24, 10min). El *pellet* resultant es resuspèn amb sacarosa 0.64M i s'homogenitza amb un homogenitzador manual pestle. Després es diposita acuradament la suspensió sobre un gradient de sacarosa (1.20, 1.00, i 0.78 M) i es centrifuga (23,000 rpm, rotor AH629 Sorvall, 45 min). Es recol·lecta la banda que es forma en l'interfase de 0.78M/1.00M, s'homogenitza en tampó d'extracció (70 mM KHPO₄, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 6.9) i es centrifuga (20,000 rpm, rotor T865 Sorvall, 30 min). El *pellet* es renta dues vegades mitjançant la resuspensió amb tampó d'extracció mitjançant

xeringa i la posterior centrifugació durant 30min (20,000 rpm, T865 Sorvall rotor). El *pellet* resultant es resuspèn en tampó hipotònic (5 mM Tris-HCl, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.5) s'homogenitza amb pestel i xeringa i es centrifuga durant 30min (40,000 rpm, rotor T865 Sorvall). Els *pellets* resultants (ROS) es renten dos cops més en tampó hipotònic. El *pellet* obtingut es resuspenen en tampó d'extracció utilitzant pestle i xeringa i es centrifuga durant 20min (14,000 rpm, rotor A8-24, Kontron). Aquest pas de rentat es repeteix dues vegades. Finalment, les membranes es resuspenen en tampó d'extracció i es guarden en aliquotes a -80°C. Es determina la ratio A_{280}/A_{500} per comprovar la puresa de la preparació.

III.1.2. EXTRACCIÓ DE TRANSDUCINA A PARTIR DE RETINES BOVINES

Per a l'obtenció de transducina s'ha seguit el procediment descrit inicialment [Fung et al., 1981] que es base en la unió de la transducina a la rodopsina fotoactivada i posterior alliberament per addició de GTP en excés. La proteïna obtinguda es concentra i se separa del GTP mitjançant una columna cromatogràfica de bescanvi aniònic. Tot el procés es realitza amb llum i a 4°C.

Protocol d'extracció de transducina a partir de retines bovines—El procés d'obtenció de transducina es fa amb llum i a 4°C. S'obté ROS a partir de retines bovines segons el protocol descrit anteriorment. A partir de les membranes rentades amb tampó hipotònic es resuspenen els *pellets* en tampó hipotònic (5 mM Tris-HCl, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.5) amb 100µM de GTP i es centrifuga la mostra 30min a 40,000rpm (rotor T865). Es guarden els sobrenedants i es repeteix l'extracció dos cops. Els sobrenedants obtinguts es carreguen a la columna de DEAE Bio-Gel A. Un cop els sobrenedants s'han carregat es deixa la columna rentant-se durant tota la nit amb tampó d'equilibri (5mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol). L'endemà es renta la columna amb 300ml de tampó de rentat (5mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol) per tal d'eluir el GDP i el GTP. Després s'elueix la transducina amb tampó d'elució (5mM Tris-HCl, pH 7.5, 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol). La transducina obtinguda es dialitza contra tampó de diàlisi (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 50% glicerol) i es guarda a -20°C.

III.2. ESQUEMA GENERAL DELS MÈTODES UTILITZATS PER A L'OBTENCIÓ DE RODOPSINA RECOMBINANT

El procés experimental seguit per a l'obtenció de rodopsina recombinant, a partir del gen sintètic de l'opsina bovina, es mostra en l'esquema següent (Figura III.1.1)

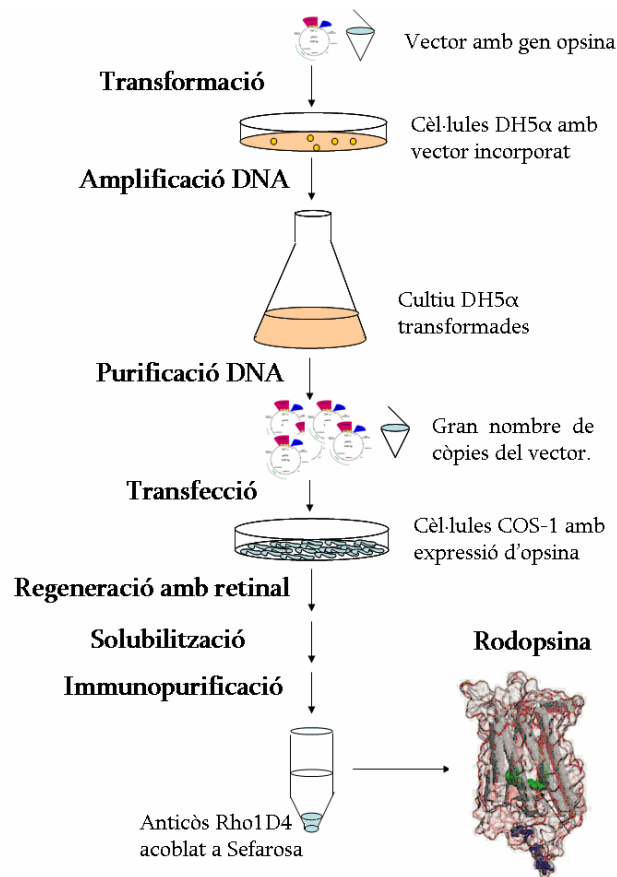


Figura III.1.1. Esquema experimental d'obtenció de rodopsina recombinant

III.3. VECTOR pMT4 I GEN DE L'OPSINA

El vector utilitzat en el clonatge del gen de l'opsina ha estat el pMT4 [Franke et al., 1988], proporcionat pel Dr. H.G. Khorana (Massachusetts Institute of Technology, USA). El vector conté el gen de resistència a ampicil·lina i presenta una elevada replicació en cèl·lules *E.Coli*

i una elevada expressió en cèl·lules eucariotes COS-1, utilitzades en l'obtenció de rodopsina recombinant.

El gen que codifica per la proteïna opsina bovina ha estat sintetitzat a partir de diferents oligonucleòtids i posteriorment ha estat clonat entre les dianes de restricció *EcoRI/NotI* del vector pMT4, entre les posicions 1061 i 2129. El gen té una longitud de 1057pb i conté 28 llocs de restricció únics, distribuïts al llarg de la seva seqüència, que poden ser utilitzats per realitzar mutagènesi per reemplaçament de tipus *cassette* [Ferretti et al. 1986].

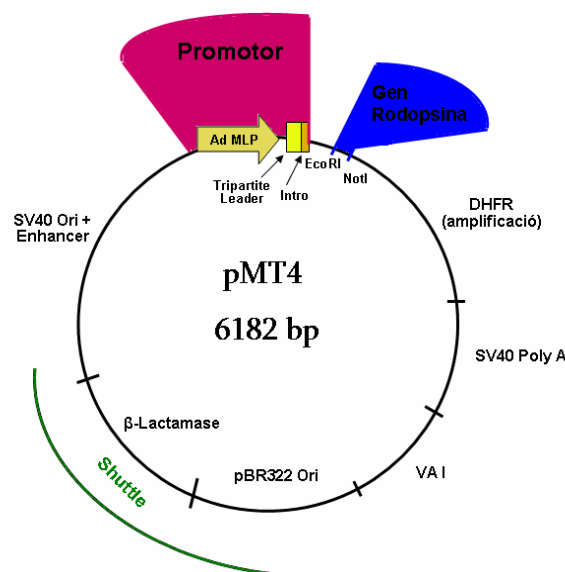


Figura III.2.1. Esquema del vector pMT4. El gen de l'opsina està clonat entre les dianes dels enzims de restricció *EcoRI* i *NotI*.

III.4. TÈCNIQUES D'ADN RECOMBINANT PER A L'OBTENCIÓ DE MUTANTS

En la realització d'aquesta tesi doctoral s'han construït una sèrie de mutants de rodopsina (Taula III.3.1). Amb la finalitat d'alterar el gen que codifica per l'opsina de forma específica, perquè la proteïna codificada es vegi modificada en un únic lloc puntual o en uns quants aminoàcids, s'han utilitzat tècniques d'ADN recombinant. Els mutants objecte d'estudi s'han obtingut a partir de les tècniques de mutagènesi dirigida i mutagènesi en *cassette*. En la taula següent es mostren els diferents mutants de rodopsina estudiats i la tècnica d'ADN recombinant utilitzada en cada cas (Taula III.3.1).

Mutant de rodopsina	Mutagènesi de lloc dirigit	Encebadors (seqüència de l'encebador directe)	Mutagènesi en <i>cassette</i>	Estratègia utilitzada
G51A			X	Reemplaçament del fragment <i>BclI/HindIII</i>
G51V			X	Reemplaçament del fragment <i>BclI/HindIII</i>
G89D			X	Reemplaçament del fragment <i>BglI/NcoI</i>
G51V/E134Q			X	Reemplaçament del fragment <i>BclI/HindIII</i>
G51V/V300G	X	5'CCAAGACGTCTGCC GGCT TACAA CCCGGTC'3 sobre la seqüència del mutant G51V		
V300G	X	5'CCAAGACGTCTGCC GGCT TACAA CCCGGTC'3		
G89K/K296G			X	Reemplaçament del fragment <i>EcoRI/XhoI</i>
V227Y	X	5'TGCTATGGCCAGCTG TACT TAC CGTCAAGGAGGC3'		
AALS	X	5'GGCCGAGAAGGAGG CCG CGCGT ATG CTTTC CATCATGGTCATCGC3'		
V227Y+AALS	X	5'GGCCGAGAAGGAGG CCG CGCGT ATG CTTTC CATCATGGTCATCGC3' sobre la seqüència del mutant V227Y		
H152R	X	5'CGGTGAGAAC CGC GCCATCATG GGCGTC3'		
V138S	X	5'GAGCGGTACGTG TCG GTGTGCA AGCCCATGAGC3'		
K141R	X	5'GTGGTGGTGTGC AGG CCCATGA GCAACTTC3'		
R147A	X	5'CCCATGAGCAACTTC GCC TTCGG TGAGAACCCAC-3'		
V138S/K141R/H152R	X	5'GAGCGGTACGTG TCG GTGTGCA GG CCCATGAGCAACTTC3' sobre la seqüència del mutant H152R		
V138S/V227Y/AALS	X	5'GAGCGGTACGTG TCG GTGTGCA AGCCCATGAGC3' sobre la seqüència del mutant V227Y/AALS		
V138S/K141R/V227Y/AALS	X	5'GAGCGGTACGTG TCG GTGTGCA GG CCCATGAGCAACTTC3' sobre la seqüència del mutant V227Y/AALS		

Taula III.3.1. Mutants construïts per a la realització d'aquest estudi i estratègia utilitzada per a la seva obtenció.

III.5. PURIFICACIÓ D'ADN PLASMÍDIC

El vector que conté el gen de l'opsina s'ha amplificat en cèl·lules DH5 α , una soca d'*E.coli* àmpliament utilitzada en biologia molecular. Aquestes cèl·lules han estat tractades prèviament amb CaCl₂, que altera la permeabilitat de la membrana cel·lular, per tal que puguin introduir el vector mitjançant un xoc tèrmic [Mandel et al., 1970]. El vector pMT4 presenta, tal i com hem vist, el gen de resistència a ampil·lina que ens permetrà seleccionar les cèl·lules que han introduït el vector mitjançant la utilització de medis selectius. Un cop s'han obtingut les colònies de transformació s'obindrà l'ADN a través de l'amplificació d'una colònia i posterior purificació del plasmidi. El mètode utilitzat en la purificació de l'ADN plasmídic és el de lisi alcalina i purificació en columna.

III.6. EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA OPSINA

El plasmidi, que conté el gen de l'opsina, és introduït dins les cèl·lules COS-1 mitjançant el mètode de transfecció per DEAE-dextrà (dietilaminoetil-dextrà). Les cèl·lules transfectades expressaran la proteïna i introduiran les modificacions postranscripcionals pertinents. Tanmateix aquestes modificacions a vegades no es realitzen de la mateixa manera que en la cèl·lula original. En el nostre cas observem que l'opsina expressada en cèl·lules COS-1 presenta una glicosilació heterogènia comparat amb la rodopsina nativa obtinguda de retines bovines [Oprian et al. 1987].

La línia de cèl·lules de mamífer COS-1 va ser adquirida a la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Es tracta d'una línia establerta a partir de cèl·lules de ronyó de mico verd africà (CV-1) transformades amb un mutant defectiu per l'origen de replicació del virus SV40 de simis. Les cèl·lules COS-1 tenen integrada una còpia completa dels gens d'expressió primerenca del SV40 i produeixen l'antigen T, així doncs, un plasmidi que contingui l'origen de replicació del SV-40 podrà replicar-se de forma independent [Rosenberg, 1996]. Aquest sistema permet expressar l'opsina a la membrana plasmàtica de les cèl·lules COS-1 representant un 0.3% de la proteïna total i amb una orientació anàloga a la de la rodopsina en les membranes dels discs dels bastons [Oprian et al. 1987].

Protocol d'expressió d'opsina recombinant—El plasmidi que conté el gen de l'opsina és transfectat de forma transitòria en cèl·lules COS-1, quan aquestes presenten entre un 50-70% de confluència. A la placa de 150mm de diàmetre s'hi afegeix 10ml de solució de transfecció; solució de DMEM que conté 2.5% de FBS, 100 µM de Cloroquina, 20µg d'ADN plasmídic i 100µg/ml DEAE-dextrà. S'incuben les cèl·lules durant 4h a 37°C, 5% de CO₂ i humitat saturada. Passades aquestes 4h d'incubació es substitueix la solució de transfecció per una solució de PBS amb un 10% de DMSO per un temps inferior a 10min. Després de 2 rentats amb 10ml de PBS les cèl·lules s'incuben entre 48-72h amb DMEM, 10% FBS i antibiòtics Strp, Gln i Pen (Gibco) a 37°C, 5% de CO₂ i humitat saturada.

III.7. PURIFICACIÓ DE RODOPSINA RECOMBINANT

Un cop la proteïna s'ha expressat en les cèl·lules COS-1 i abans de començar la seva purificació cal regenerar l'opsina amb el retinal, per tal d'obtenir la rodopsina. Després d'aquesta regeneració la purificació i caracterització de la proteïna s'haurà de fer en foscor. Tot seguit es solubilitzen les cèl·lules i després s'immunopurifica la rodopsina a partir de la fracció soluble. La reïna utilitzada en la immunopurificació s'obté de l'acoblament de l'anticòs Rho-1D4, monoclonal de ratolí que s'uneix específicament als últims 9 aminoàcids del C-terminal de la rodopsina (TETSNVAPA) [Molday et al, 1983], a la sefarsa activada amb bromur de cianogen [Cuatrecases et al, 1968]. L'elució de la proteïna es porta a terme per competència entre la rodopsina i el pèptid sintètic d'aquests últims 9 aminoàcids del C-terminal de la rodopsina. La proteïna resultant d'aquesta elució es troba a punt per realitzar els experiments de caracterització.

Protocol de purificació de rodopsina recombinant—L'11-*cis*-retinal utilitzat en aquest estudi prové en part del laboratori del Prof. P.P. Philippov (University of Moscow) i també en part del laboratori del Dr. Àngel R. De Lera (Universidade de Vigo). El dodecil maltòsid (DM) és d'Anatraxe i la matriu de Sefarsa activada és de Sigma. L'anticòs Rho-1D4 prové de Cell Essentials (Boston, USA). Passades 48-72h de l'inici de la transfecció, les cèl·lules COS-1, que sobreexpressen opsina, s'incuben en foscor i agitació durant 4h amb 20µM d'11-*cis*-retinal. Després les cèl·lules es solubilitzen amb 1% DM, en agitació i a 4°C durant 1.5h. A

continuació la proteïna es purifica de la fracció soluble per cromatografia de immunoafinitat amb l'anticòs Rho-1D4. La fracció ben plegada de la proteïna rodopsina s'elueix amb tampó 2mM Na₂HPO₄, pH 6, 0.05% DM, 100µM pèptid Rho1D4 [Garriga et al., 1996].

III.8. TÈCNiques ESPECTROSCÒPIQUES PER A LA CARACTERITZACIÓ DE LA RODOPSINA

A continuació es descriuen les diferents tècniques espectroscòpiques utilitzades en la realització d'aquest estudi.

III.8.1. ESPECTROSCÒPIA UV-VISIBLE

La rodopsina conté el seu lligand natural, el cromòfor 11-*cis*-retinal, unit covalentment a la proteïna mitjançant una base de Schiff protonada que li proporciona un espectre d'absorció característic a la zona del visible, amb un pic màxim d'absorció a 500nm. Aquesta característica és utilitzada per a la quantificació i caracterització de la rodopsina.

Per l'obtenció dels espectres d'UV-visible s'ha utilitzat un espectrofotòmetre UV-visible Varian Cary 100Bio. L'espectrofotòmetre es troba acoblat a un accessori controlador de temperatura Peltier, per poder controlar la temperatura durant l'experiment. Les condicions de mesura dels espectres són les següents: temps promig de mesura per punt 1s, interval de mesura de dades 2nm, velocitat de rastreig 240nm/min i rang de longituds d'ona de rastreig 250-650nm.

III.8.1.1. FORMACIÓ DE CROMÒFOR, COMPORTAMENT EN FRONT LA IL·LUMINACIÓ I POSTERIOR ACIDIFICACIÓ

L'espectre d'absorció es pot mesurar quantitativament a través de la llei de Lambert-Beer, utilitzant el coeficient d'extinció molar de la proteïna a 500nm ($\epsilon=40600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La quantitat de proteïna regenerada amb 11-*cis*-retinal ($\lambda_{\text{màx}}=500\text{nm}$) respecte a la proteïna total ($\lambda_{\text{màx}}=280\text{nm}$) és un paràmetre important que s'utilitza per a determinar el grau de

plegament de la rodopsina recombinant [Garriga et al 1996]. La reducció en la formació de cromòfor ha estat prèviament associada a un mal plegament de la proteïna. Així doncs, la *ratio* entre l'absorbància a 280nm i l'absorbància a 500nm per a la proteïna Wt, quan aquesta es troba correctament plegada en la seva totalitat, és de 1.6-1.8 [Garriga et al 1996].

La il·luminació de la mostra provoca la fotoisomerització del cromòfor que es tradueix en un canvi conformacional en la proteïna, passant a la seva conformació activa MetaII. Aquesta conformació presenta un màxim d'absorció a 380nm, per la rodopsina Wt, com a conseqüència del canvi conformacional i a la desprotonació de la base de Schiff. La posterior acidificació provoca la desnaturalització de la proteïna i la reprotonació de la base de Schiff, que es tradueix en un desplaçament del màxim d'absorbància a 440nm. Aquest fet s'utilitzarà per a determinar quina fracció de l'absorbància a 380nm correspon a la forma activa MetaII i quina altra al retinal lliure, que també absorbeix a 380nm.

Determinació de la formació de cromòfor i comportament en front la il·luminació i acidificació—Per tal de determinar el grau de formació de cromòfor, la rodopsina es purifica en tampó 1.8mM KH₂PO₄, 10mM Na₂PO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl a pH=7.2 i 0.05% DM, i es determina la *ratio* A_{280nm}/A_{500nm} . El comportament de la proteïna en front de la il·luminació es determina a partir de la mostra purificada en tampó 2mM Na₂HPO₄, pH=6.0 i 0.05%DM. La mostra s'il·lumina durant 10s amb la màxima intensitat d'una font Fiber-Liter MI-150 equipada amb un filtre de pas de llum de $\lambda > 495nm$, i l'espectre s'obté immediatament després de la il·luminació. Posteriorment, es pot acidificar la mostra per tal de reprotonar la base de Schiff. Els experiments d'acidificació s'han realitzat acidificant la mostra amb un 1% (v/v) de H₂SO₄ concentrat (1.5 μ L to a total of 150 μ L), l'espectre s'obté 30s després de l'acidificació. El comportament en front la il·luminació i l'acidificació d'un mutant es determina per comparació amb els resultats obtinguts per la proteïna Wt.

III.8.1.2. REACTIVITAT EN FRONT LA HIDROXILAMINA

La hidroxilamina és un compost que reacciona amb la base de Schiff hidrolitzant-la, provocant l'alliberament del retinal unit a la proteïna. La rodopsina Wt en foscor presenta una base de Schiff estable en presència d'hidroxilamina. L'estructura entorn la base de Schiff

de l'estat inactiu de la proteïna Wt és compacte i la hidroxilamina no pot accedir-hi per hidrolitzar-la. Un cop, però, la proteïna Wt ha estat il·luminada, i passa al seu estat actiu, la hidroxilamina reaccionarà ràpidament amb la base de Schiff i s'alliberarà el retinal. El temps de vida mitjana de la base de Schiff en fosc i en presència d'hidroxilamina determinarà l'accessibilitat a la base de Schiff i això ens ajudarà a conèixer el grau de plegament i/o compactació entorn d'aquest enllaç per a les diferents rodopsines recombinants.

Determinació de la reactivitat en front la hidroxilamina— A la conformació inactiva de la rodopsina purificada en tampó 2mM Na₂HPO₄, pH=6.0, i 0.05%DM s'hi afegeix una concentració final de 30mM d'hidroxilamina i es determina el decaïment de la banda d'absorció del cromòfor en el temps. Així, s'obté informació del grau de compactació entorn de la base de Schiff per comparació amb el resultat obtingut per la proteïna Wt.

III.8.1.3. ESTABILITAT TÈRMICA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS

En aquest experiment es vol estudiar la influència de la temperatura en l'entorn del retinal, per tal de determinar l'estabilitat del cromòfor de les proteïnes recombinants. Es realitza un seguiment de la pèrdua d'absorbància en el temps per a les diferents proteïnes recombinants a 55°C i en fosc. El temps de vida mitjana de la forma inactiva ens donarà una mesura de l'estabilitat del cromòfor de la proteïna mutada respecte de la proteïna Wt.

Estabilitat tèrmica de la rodopsina en fosc—Es fan espectres al llarg del temps i a 55°C de l'estat inactiu de la proteïna recombinant purificada en tampó 2mM Na₂HPO₄, pH=6.0 i 0.05%DM. El decaïment de la banda cromofòrica de l'estat inactiu en funció del temps es compara amb el resultat obtingut per la proteïna Wt.

III.8.1.4. ESTABILITAT DE LA BASE DE SCHIFF

Es determina l'estabilitat de la forma activa MetaII determinant l'estabilitat de la base de Schiff en el temps. La mostra s'acidifica a diferents temps després de la il·luminació, podent així diferenciar l'absorbància a 380nm que correspon a MetaII i la que correspon a retinal lliure. El decaïment de l'absorbància a 440nm correspon al decaïment de la conformació

activa MetaII. El temps de vida mitjana de la base de Schiff per a cada proteïna recombinant es compara amb el valor obtingut per a la proteïna Wt, determinant-se així l'estabilitat de la conformació activa.

Estabilitat de la base de Schiff—La mostra purificada en tampó 2mM Na₂HPO₄, pH=6.0 i 0.05%DM s'il·lumina durant 10s amb la màxima intensitat d'una font Fiber-Liter MI-150 equipada amb un filtre de pas de llum de $\lambda > 495\text{nm}$. S'acidifica la mostra un 1% amb H₂SO₄ concentrat (1.5 μL to a total of 150 μL) a diferents temps després de la il·luminació i es determina el temps de vida mitjana de la base de Schiff.

III.8.1.5. REGENERACIÓ DE LA RODOPSINA

Els diferents mutants de rodopsina no regeneren igual amb el cromòfor 11-*cis*-retinal. En aquest experiment es determina quin percentatge de proteïna regenera amb el cromòfor i la velocitat d'aquesta regeneració comparant els resultats amb els obtinguts per a la proteïna Wt. Per altra banda, en aquest estudi, també es treballa amb un anàleg del retinal, l'11-*cis*-7-metilretinal, i es determina la velocitat i la capacitat de regeneració de l'opsina Wt amb aquest anàleg.

Regeneració del cromòfor—Es fa un espectre de la mostra purificada en tampó 2mM Na₂HPO₄, pH=6.0 i 0.05%DM, i es determina la concentració de rodopsina. Posteriorment s'afegeix retinal en una proporció 1:2 (proteïna:retinal) i s'il·lumina la mostra durant 10s amb una font Fiber-Liter MI-150 equipada amb un filtre de pas de llum de $\lambda > 495\text{nm}$, de tal manera que s'il·lumina la rodopsina però no el retinal lliure present a la mostra. Es determina la velocitat de regeneració i el percentatge de regeneració de la proteïna segons l'augment de la banda cromofòrica en el màxim d'absorció d'aquesta. Els valors obtinguts es comparen amb els obtinguts per a la proteïna Wt.

III.8.2. ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

L'espectroscòpia de fluorescència es basa en l'emissió de fotons com a resultat de la relaxació

de molècules excitades prèviament per la radiació electromagnètica. Les molècules que, per les seves característiques químiques, emeten fluorescència quan es desexciten reben el nom de fluoròfors; generalment són compostos que tenen electrons deslocalitzats en dobles enllaços conjugats. En les proteïnes, el triptòfan és l'aminoàcid que presenta una fluorescència més elevada, representant aproximadament el 90% de la fluorescència total en les proteïnes. La tirosina també és un aminoàcid altament fluorescent en solució, però en les proteïnes presenta una emissió feble. La desnaturalització proteica provoca, en general, una potenciació de l'emissió de la tirosina. Aquests fluoròfors naturals són molt sensibles a la polaritat del seu entorn. Podem observar desplaçaments espectrals com a resultat de diversos fenòmens; com per exemple la unió de lligands, l'associació proteïna-proteïna i la desnaturalització, entre d'altres. Les proteïnes absorbeixen al visible amb un màxim d'absorció a 280nm i presenten un màxim d'emissió de fluorescència que oscil·la entre 320nm i 350nm. L'espectroscòpia de fluorescència ens proporcionarà bàsicament informació de canvis conformationals en la proteïna, ja que els canvis en la fluorescència d'aquests aminoàcids depenen del seu entorn.

III.8.2.1. ACTIVACIÓ DE TRANSDUCINA MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

En l'assaig d'activació de transducina mitjançant espectroscòpia de fluorescència s'utilitza la fluorescència intrínseca del Trp-207, de la subunitat α de la transducina, per seguir la conversió de l'estat inactiu (associat a GDP) a l'estat actiu (associat a GTP) [Faurobert et al., 1993]. El rendiment quàntic de la fluorescència intrínseca del complex α -GTP és aproximadament 2.3 cops més elevat que el del complex α -GDP [Phillips et al., 1988]. D'aquesta manera podem realitzar el seguiment de l'activació de transducina, per part de la rodopsina fotoactivada, segons l'increment de fluorescència en un medi on estan presents la rodopsina, la transducina i GTP exogen. Per tal de poder seguir l'activació de transducina per fluorescència, donada l'activitat GTPàsica d'aquesta, utilitzem en l'experiment un anàleg no hidrolitzable del GTP, el GTP γ S. Aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de l'activació de diferents mutants de rodopsina [Fahmy et al., 1993; Jager et al., 1994b; Farrens et al., 1996].

Protocol d'assaig d'activació de G_t mitjançant espectroscòpia de fluorescència—Les mesures de fluorescència s'han realitzat amb un espectrofluorímetre Aminco SL. Les longituds d'ona d'excitació i emissió utilitzades han estat 295nm (2-nm, amplitud d'esclatxa) i 340nm (16-nm amplitud d'esclatxa) respectivament. Breument, la rodopsina (40 nM) s'afegeix a la mescla de reacció que conté G_t (250 nM) i GTPyS (5 μ M) en tampó 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, i 0.012% DM. L'experiment es porta a terme a 20°C i la reacció s'inicia amb la il·luminació de la mostra durant 30s, amb una llum de fibra òptica de 150watt equipada amb un filtre de pas de llum >495-nm. La velocitat inicial d'activació de G_t s'obté de l'increment de fluorescència dels primers 60s després de la il·luminació (Wt=1.00). Alternativament, aquest assaig també s'ha realitzat utilitzant les condicions que es descriuen a continuació: la transducina s'ha purificat a partir de retines bovines essencialment com s'ha descrit en l'article [Heck et al., 1993] i s'ha conservat en tampó 20mM BTP, pH 7.1, 130mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM DTT. Per a la realització de l'experiment s'ha utilitzat un fluorímetre Fluorolog 2, Spex. L'assaig s'ha realitzat tal i com s'ha descrit prèviament [Meyer et al., 2000; Fritze et al., 2003]. Les longituds d'ona d'excitació i emissió utilitzades en l'experiment són 295nm (esclatxa, 0.4nm) i 340nm (esclatxa, 4nm) respectivament. Per a l'assaig s'ha utilitzat una concentració 2nM de rodopsina i 250nM de G_t en tampó 20mM BTP (pH 7.5), 130mM NaCl, 1mM MgCl₂, i 0.01% DM en un volum final de 650 μ l. Per a la determinació de la velocitat d'activació de G_t , les corbes s'han normalitzat segons la intensitat inicial de fluorescència abans d'il·luminar i s'ha realitzat una regressió lineal dels primers 60s després d'il·luminar per tal de determinar la velocitat inicial d'activació.

III.8.2.2. ESTABILITAT DE LA CONFORMACIÓ ACTIVA METAII PER ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

A l'estat inactiu de la rodopsina hi ha transferència d'energia de fluorescència dels 5 triptòfans, localitzats en el domini transmembrana de la rodopsina, al retinal [Farrens et al., 1995]. En el decaïment de l'estat actiu té lloc la hidròlisi de la base de Schiff i l'alliberament del retinal. Durant aquest decaïment observem un augment important en l'emissió de fluorescència. Aquest increment en la fluorescència dels triptòfans és degut a la pèrdua del *quencher*, el retinal [Farrens et al., 1995]. La velocitat d'alliberament de retinal és paral·lela

al decaïment de la MetaII en el cas de la proteïna Wt en les condicions d'estudi utilitzades, això ens permetrà utilitzar la tècnica d'espectroscòpia de fluorescència per determinar l'estabilitat de la conformació activa MetaII.

Estabilitat de la MetaII determinada segons espectroscòpia de fluorescència—Per a l'assaig s'ha treballat amb 2.4µg de pigment en un volum final de 120µl de tampó 200mM BTP, pH 7.5, i 0.03%DM. Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió utilitzades en l'experiment han estat 295 nm (escletxa, 0.2nm) i 330 nm (escletxa, 4nm), respectivament. La mostra s'ha il·luminat durant 13s i s'ha mesurat l'increment de fluorescència a 330nm. L'assaig també s'ha fet en paral·lel utilitzant les mateixes condicions anteriorment descrites però en presència de 100µM de pèptid G α -HAA. En l'anàlisi de dades, els espectres obtinguts s'han normalitzats, i s'hi ha ajustat corbes exponencials d'una o dues component, segons cada cas, utilitzant el programa SigmaPlot (Jandel Scientific).

III.8.3. ESPECTROSCÒPIA D'INFRAROIG

La tècnica que utilitzarem en el nostre estudi es coneix com a FTIR de diferència. Aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de canvis conformacionals en proteïnes de membrana [Rothschild et al., 1981; Braiman et al., 1988; Baenziger et al., 1992]. En el nostre cas farem espectres de FTIR de diferència entre l'estat inicial de la rodopsina, en fosc, i els diferents fotointermediaris d'activació que es voldran caracteritzar. Aquesta tècnica ens permet detectar els canvis conformacionals en el retinal, en el patró de ponts d'hidrogen de residus Asp, Glu en l'esquelet carbonat de la proteïna o en la matriu lipídica; així com també els canvis que tenen lloc en la formació dels fotointermediaris d'activació [Rath et al., 1998].

En la Figura III.7.3.1 es mostren els espectres de FTIR de diferència dels fotointermediaris MetaI i MetaII (que s'obtenen il·luminant les mostres que es troben en diferents condicions). Les bandes característiques de la conformació MetaI són les bandes positives a 951cm⁻¹, molt important en la conformació MetaI i que desapareix en la MetaII com a conseqüència de la relaxació de la cadena poliènica del retinal en passar a una conformació planar, a 1538cm⁻¹, i

a 1701cm^{-1} així com el doblet negatiu $1736\text{cm}^{-1}/1726\text{cm}^{-1}$ i la banda negativa a 1550cm^{-1} . Les bandes de l'espectre de FTIR de diferència que es relacionen amb la formació del fotointermediari MetaII són les bandes 1767cm^{-1} (negativa(-)), 1745cm^{-1} (positiva (+)) i 1730cm^{-1} (-), relacionades amb el canvi en el patró de ponts d'hidrogen dels aminoàcids Asp-83 i el Glu-122, la banda a 1713cm^{-1} (+) deguda a la protonació del contraió de la base de Schiff, el Glu-113, així com també les bandes positives a 1644cm^{-1} , que indica una pèrdua parcial de l'estructura secundària de l'hèlix 8, i a 1532cm^{-1} i les bandes negatives a 1620cm^{-1} i a 1555cm^{-1} [Vogel and Siebert, 2003; Ritter et al., 2004].

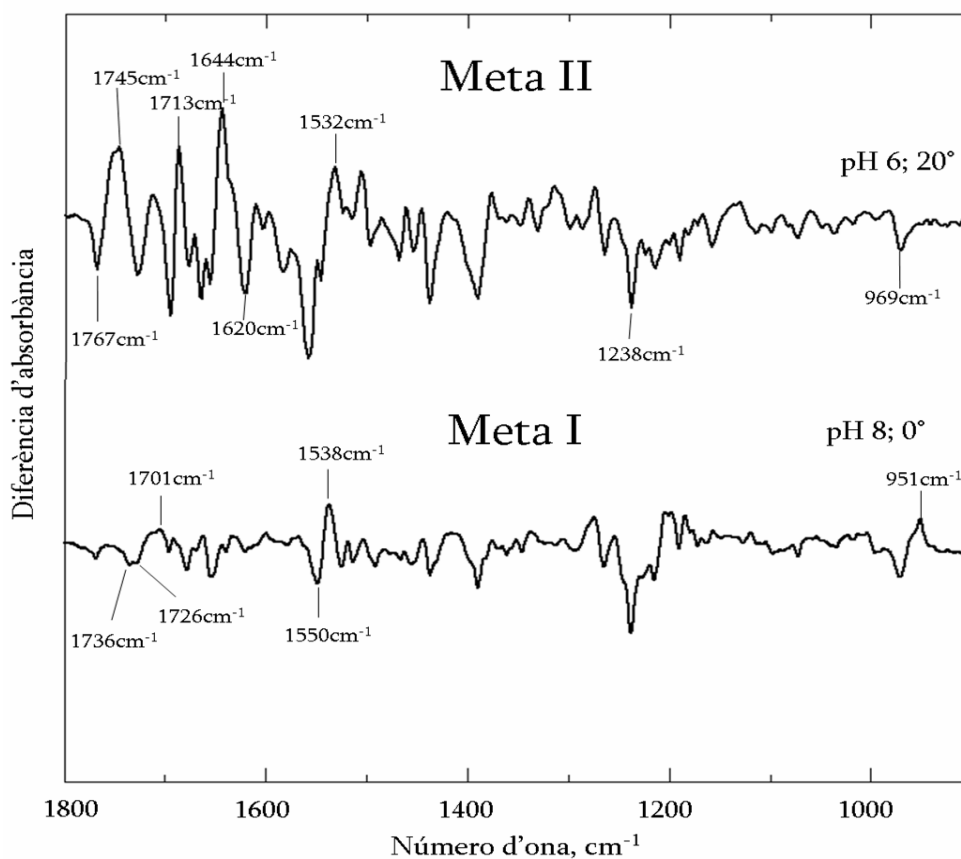


Figura III.7.3.1. Espectres de FTIR de diferència dels fotointermediaris MetaI i MetaII.

Protocol de espectroscòpia FTIR—Les mostres es preparen per centrifugació. La suspensió de membranes de rodopsina es centrifuga durant 30min a $100.000g$ i a 4°C per tal d'obtenir *pellet* de $2\text{-}3\text{mM}$, que s'exposa a aire sec durant 60s per tal de reduir la quantitat d'aigua en la mostra. Posteriorment, la mostra es transfereix a una cubeta amb control de temperatura

que consisteix en dues finestres de BaF₂ i un espaiador de 3µm de politetrafluoroetilè. L'espectre de FTIR es mesura en un espectrofotòmetre Bruker IFS66v/s equipat amb un detector (J15D-series, EG&G Judson) de mercuri cadmi tel·luri (MCT) refrigerat amb nitrogen líquid. Abans de cada mesura la mostra es deixa equilibrar per un mínim de 30min a l'espectrofotòmetre. L'espectre de FTIR s'obté abans i després de la il·luminació i l'espectre de FTIR de diferència es calcula restant l'espectre de l'estat inicial (A) de l'espectre de l'estat final (B). Cada experiment es repeteix un mínim de sis vegades. Les mesures impliquen l'acumulació de 128 espectres dels quals se n'obté la mitjana.

III.9. TÈCNICA DE RADIOACTIVITAT PER L'ASSAIG D'ACTIVACIÓ DE TRANSDUCINA

L'assaig d'activació de transducina també es pot realitzar mitjançant la utilització d'una tècnica radioactiva. En aquest assaig d'activació s'utilitza l'anàleg no hidrolitzable de GTP marcat radioactivament amb l'isòtop S³⁵, GTPγS³⁵. La rodopsina fotoactivada reconeix i s'uneix a la transducina. Un cop la transducina s'ha activat es dona el bescanvi d'una molècula de GDP per una molècula de GTPγS³⁵ en la subunitat α de la transducina. El GTPγS³⁵ no és hidrolitzable i per tan quedarà unit a la transducina. En l'assaig es determinarà quina quantitat de GTPγS³⁵ resta unit a la G_t després de la filtració i els rentats de la mostra sobre filtres de nitrocel·lulosa.

Protocol d'assaig d'activació de G_t mitjançant la tècnica de radioactivitat—La mostra que conté 20nM de rodopsina, 1µM de transducina, 3µM de GTPγS (i GTPγS³⁵) en tampó 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂ i 2mM DTT és il·luminada durant 1min amb una llum >495nm. Després d'1h d'incubació a temperatura ambient s'atura la reacció amb el tampó 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl i 10mM EDTA, i es filtra la mostra per tal d'eliminar el GTPγS³⁵ lliure que no s'ha unit a la transducina. Després de successius rentats amb el tampó 10mM Tris-HCl i 100mM NaCl es mesura el S³⁵ present en el filtre amb un comptador de guspireig TRICARB de Packard. El mateix es fa també amb la mostra sense il·luminar per tal de determinar quina és l'activitat basal del receptor.