

IV.3. MUTANTS DE RODOPSINA ASSOCIATS AMB RP

IV.3.1. *ESTUDIS ESTRUCTURALS*

IV.3.1.1. Caracterització per espectroscòpia UV-Vis

MUTANTS TRANSMEMBRANALS: M44T, G114D, R135L, V137M, P171Q i H211P

➤ MUTANTS G114D, P171Q, H211P i M44T

El procediment d'obtenció d'aquestes rodopsines mutades ha estat tal i com s'ha descrit en l'apartat III.4. de **Materials i mètodes**, però utilitzant 10 plaques de cèl·lules COS-1 per la transfecció dels plàsmids amb la mutació G114D, P171Q i H211P. Els espectres UV-Vis de la purificació dels mutants G114D, P171Q i H211P es mostren a la Figura 24. Cal destacar que les elucions per a la purificació de la proteïna van ser realitzades a alta força iònica per desenganxar tota la possible proteïna mal plegada o agregada unida a la columna. Els resultats espectroscòpics indiquen que aquests mutants no regeneren en presència d'11-*cis*-retinal (no apareix cap banda d'absorbància a 500 nm), però sembla que si que s'expressen encara que en baixa quantitat, donat que a 280 nm presenten un pic que indica l'existència de proteïna, en aquest cas opsina mal plegada que no uneix cromòfor. Per tant, es confirma la baixa expressió de les proteïnes recombinants G114D, P171L i H211P i que no uneixen retinal. Aquestes mutacions afecten el correcte plegament de la rodopsina i fan que la major part de proteïna quedi retinguda al reticle endoplasmàtic on molt probablement és degradada, en lloc d'anar a la membrana plasmàtica.

Així doncs, no es va detectar cap evidència de regeneració d'aquestes proteïnes amb el cromòfor . L'elevada inestabilitat de les proteïnes junt amb el fet que el procés de purificació és un procés relativament llarg, ens va fer pensar sobre la possibilitat de comprovar la presència de proteïna regenerada tot just després d'incubar les cèl·lules amb 11-*cis*-retinal.

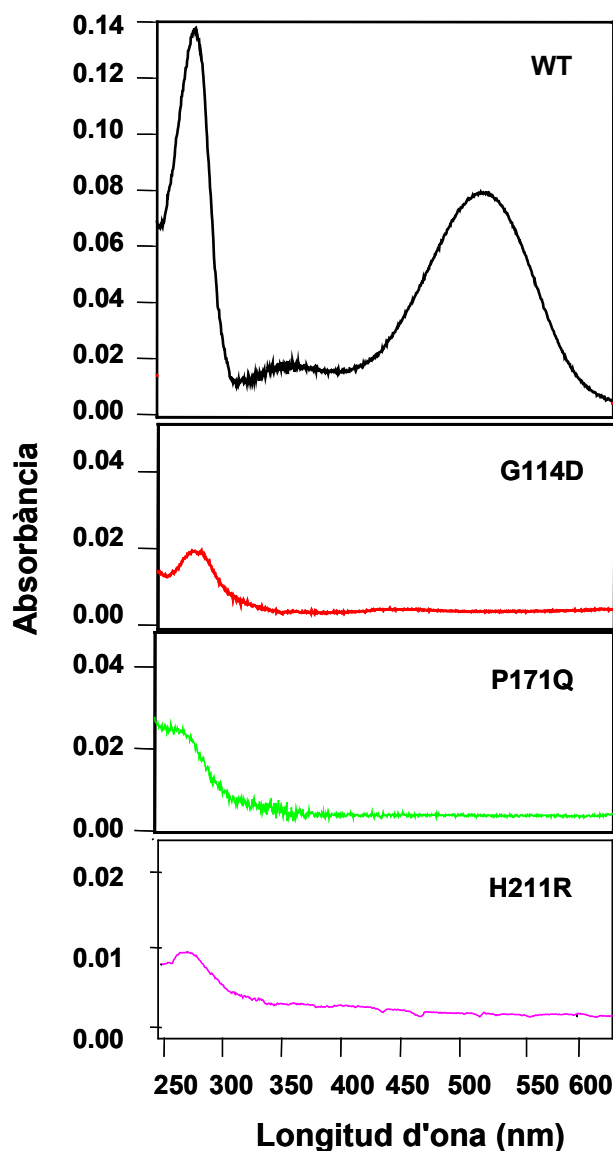
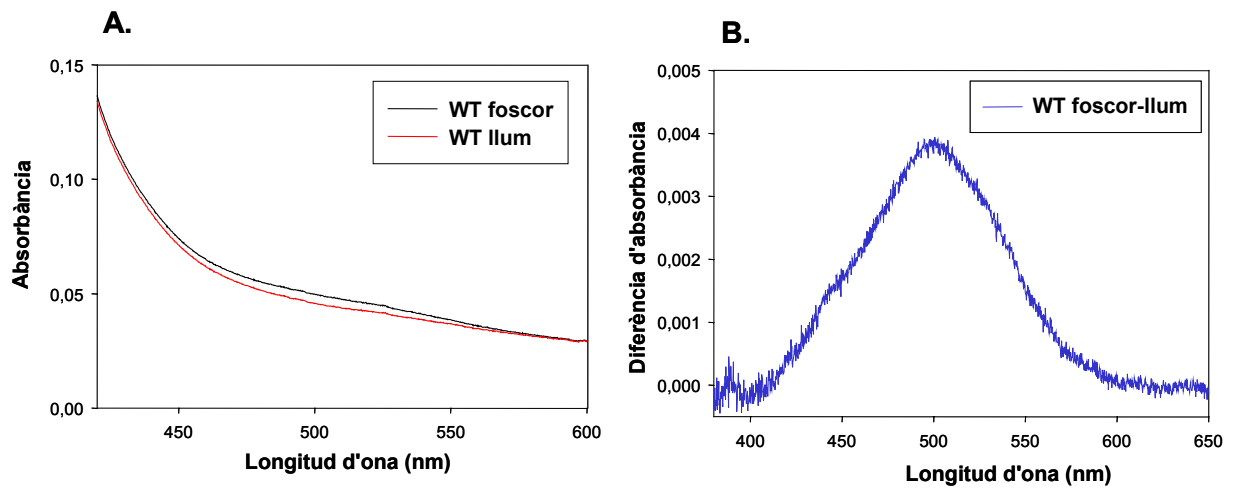


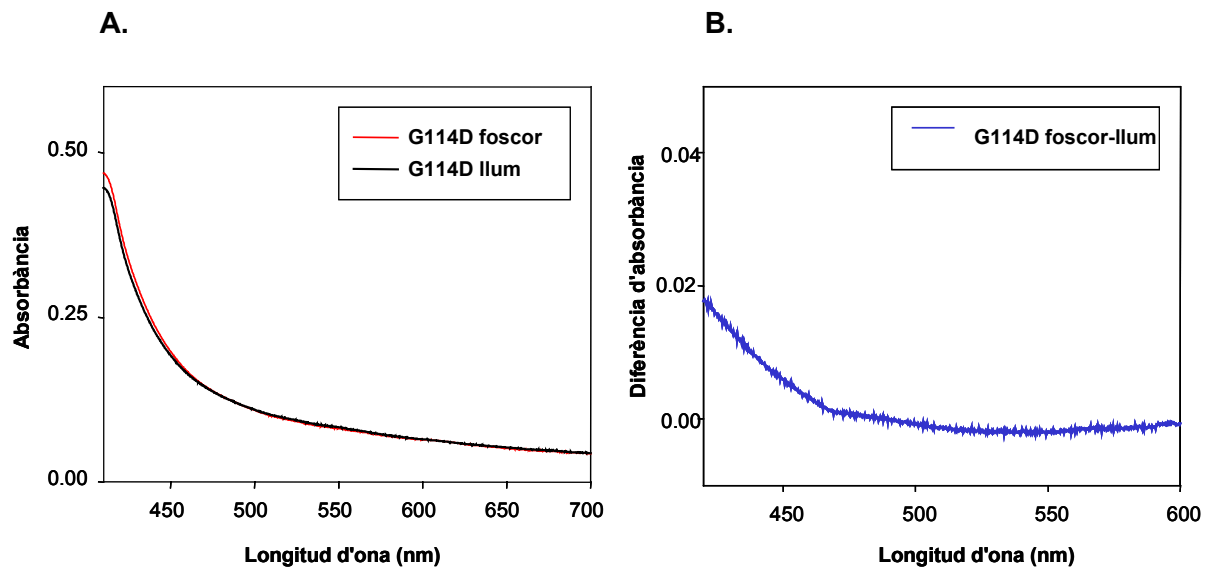
Figura 24. Espectres UV-Vis d'absorció de les proteïnes mutants expressades en cèl·lules COS-1 representats junt amb l'espectre característic de la proteïna WT.

Per dur a terme aquest experiment les membranes de les cèl·lules COS-1 es van tractar tal i com s'explica en l'apartat III.6.2.3 de **Materials i mètodes** i es van realitzar els espectres de diferència per comprovar la presència de cromòfor. En la Figura 25 es mostren els espectres d'absorció de les mostres sense purificar a les fosques i il·luminades i els resultats obtinguts de la diferència d'aquests espectres. Segons els espectres de diferència es confirma definitivament que aquests mutants no regeneren (no hi ha un pic de diferència d'absorbància entre llum-fosc a 500nm).

1.



2.



3.

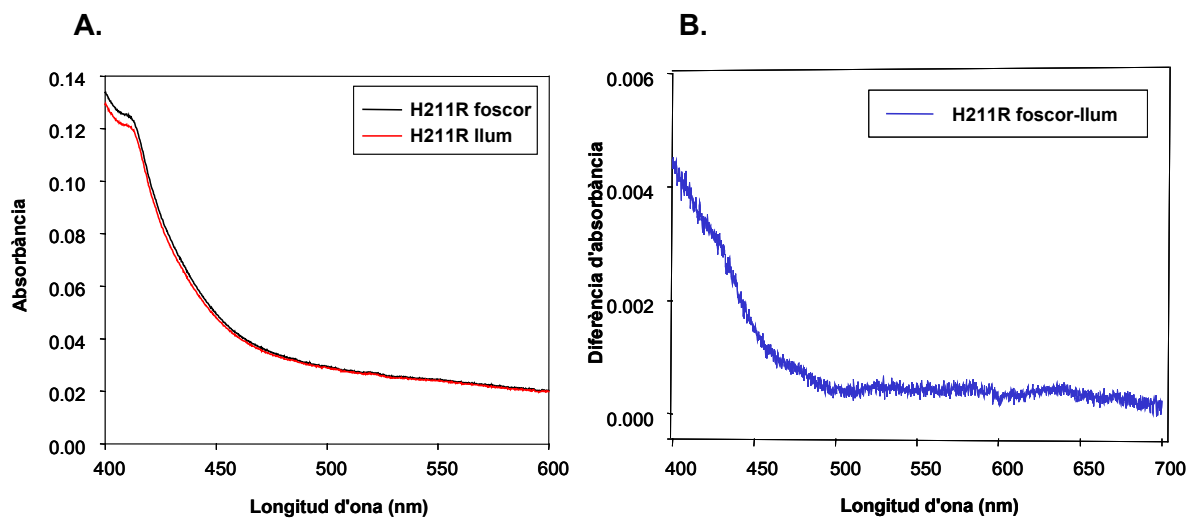


Figura 25. Espectres d'absorció en l'UV-Vis (A) i espectres de diferència (B) de la proteïna salvatge (1) i dels mutants G114D (2) i H211R (3) sense purificar. El càlcul dels espectres de diferència ha estat realitzat a partir de l'espectre de la mostra a les fosques i l'espectre després d'ésser il·luminada durant 1 minut amb un filtre que només deixa passa la llum per sobre de 495 nm.

En estudis previs d'expressió *in vitro* ja s'ha observat que la substitució d'aminoàcids en el domini transmembrana interfereix amb l'estabilitat i/o plegament de l'opsina, resultant en un nivell bastant reduït d'expressió, disminució de la regeneració amb 11-*cis*-retinal o absència de regeneració, i un transport ineficient de la proteïna del reticle endoplasmàtic a la membrana plasmàtica. Aquestes mutacions van ser classificades com a mutacions associades a RP de classe II (Sung i al., 1993). Els mutants de classe II es caracteritzen per el seu baix nivell d'expressió, regeneració reduïda o absent amb 11-*cis*-retinal i transport ineficient a la membrana plasmàtica. Dins d'aquesta classificació es poden distingir els mutants de classe IIa que presenten una localització intracel·lular predominant i els de classe IIb que presenten una localització en la superfície cel·lular significant.

A la Figura 26 es mostra l'espectre d'absorció de la proteïna mutant M44T i la proteïna salvatge, expressades en cèl·lules COS-1 i regenerades posteriorment en presència d'11-*cis*-retinal. Aquesta proteïna s'expressa a un nivell molt similar al de la proteïna salvatge i presenta una relació A_{280}/A_{500} de 1.9 (1.8 per la proteïna WT). Això indica que la proteïna mutant uneix cromòfor a un nivell semblant al de la proteïna WT, reflexant un grau de plegament molt similar al de la proteïna salvatge. El màxim de la banda d'absorció en el visible es troba localitzat a 500 nm com en el cas de la proteïna salvatge.

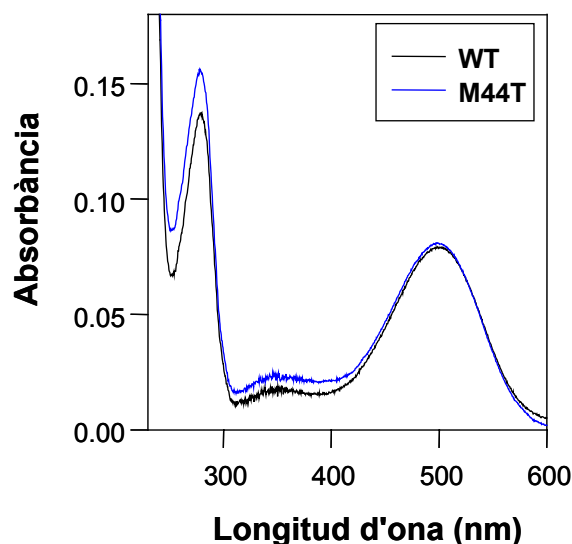


Figura 26. Espectre d'absorció UV-Vis de la rodopsina salvatge i el mutant de rodopsina M44T expressats en cèl·lules COS-1. L'espectre es va realitzar a les fosques i a 20°C.

➤ MUTANTS R135L i V137M

La Figura 27 presenta l'espectre d'absorció de la proteïna mutant R135L respecte l'espectre de la proteïna salvatge, provinents de la transfecció de 5 plaques de cèl·lules COS-1. L'espectre d'absorció de la proteïna WT presenta les bandes d'absorció característiques a 280 i 500 nm, i la relació A_{280}/A_{500} és d'1.8. El mutant R135L s'expressa a un nivell inferior respecte al de la proteïna WT i presenta una relació A_{280}/A_{500} de 2.5. Això utilitzat com a paràmetre per mesurar el grau de plegament d'aquestes rodopsines (Garriga i al., 1996), indica que la proteïna mutant R135L es troba parcialment plegada.

A la Figura 28 es mostra l'espectre d'absorció en l'UV-Vis del mutant V137M junt amb l'espectre de la proteïna salvatge, tots dos obtinguts a partir de la transfecció de 5 plaques de cèl·lules COS-1. El nivell d'expressió de la proteïna mutant V137M és similar al de la proteïna WT, la relació d'absorbàncies A_{280}/A_{500} és de 2, en el cas de la proteïna salvatge la relació A_{280}/A_{500} és 1.8. El màxim d'absorbància en el visible per el mutant V137M, està localitzat a 500 nm com a la proteïna salvatge.

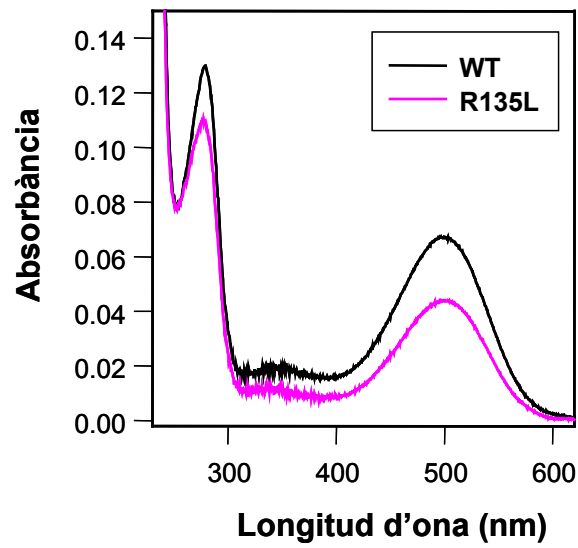


Figura 27. Espectre d'absorció UV-Vis de la rodopsina salvatge i el mutant de rodopsina R135L expressats en cèl·lules COS-1. L'espectre es va realitzar a les fosques i a 20°C.

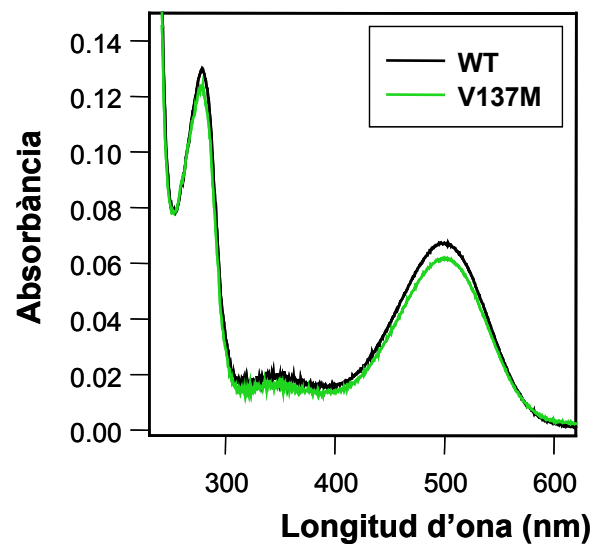


Figura 28. Espectre d'absorció UV-Vis realitzat a les fosques i a 20°C de la rodopsina salvatge i el mutant de rodopsina V137M expressats en cèl·lules COS-1.

MUTANT INTRADISCAL G106W

Els espectres UV-Vis de la purificació de la proteïna mutant G106W junt amb la proteïna WT es mostren a la Figura 29. Cal destacar que les elucions per a la purificació de la proteïna van ser realitzades a alta força iònica per desenganxar tota la possible proteïna mal plegada o agregada unida a la columna. Els resultats espectroscòpics indiquen que aquest mutant no regenera en presència d'11-*cis*-retinal (no apareix cap banda d'absorbància a 500 nm), però sembla que sí que s'expressa encara que en baixa quantitat, donat que a 280 nm presenta un petit pic que indica l'existència de proteïna, en aquest cas opsina mal plegada que no uneix cromòfor.

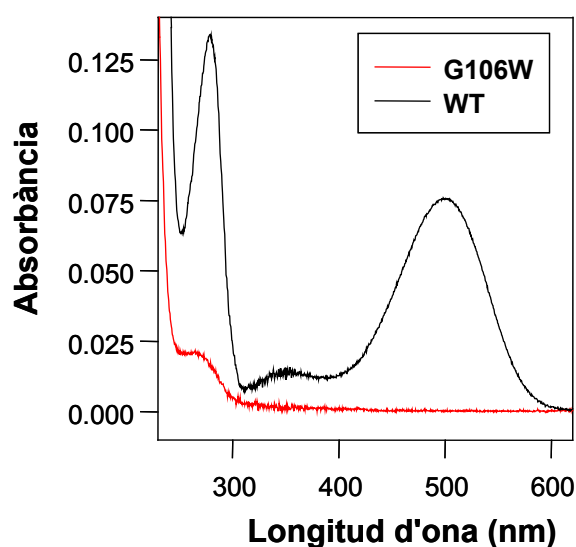


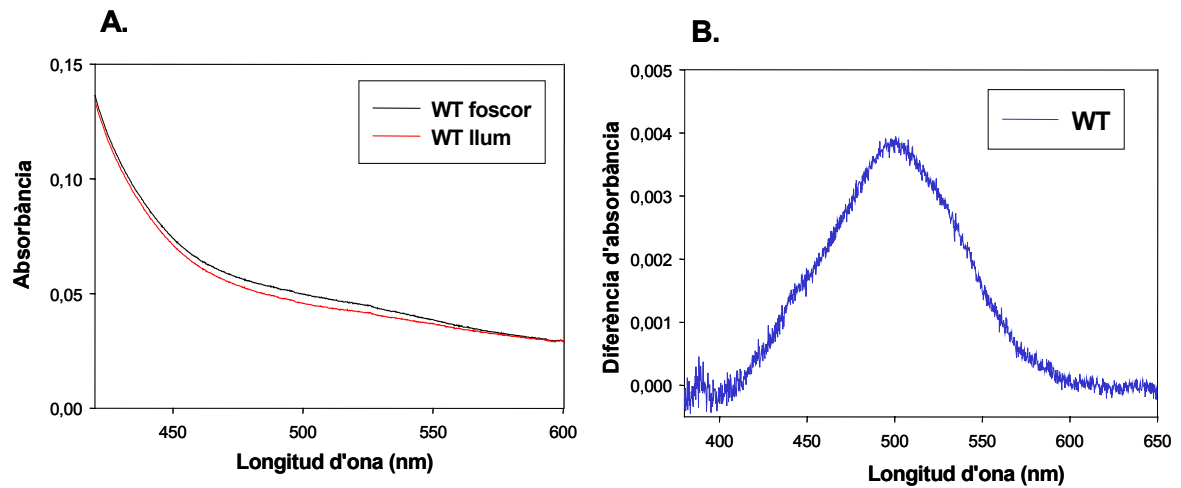
Figura 29. Espectre d'absorció UV-Vis de la rodopsina salvatge i el mutant de rodopsina G106W expressats en cèl·lules COS-1. L'espectre es va realitzar a les fosques i a 20°C.

MUTANTS DE L'EXTREM C-TERMINAL: A346P i L328P

Per el mutant A346P no es va poder obtenir proteïna a partir del mètode de purificació utilitzada per la resta de mutants. La posició de la mutació fa molt probable que l'anticòs Rho-1D4 no reconegui la proteïna mutada. Cal recordar que el lloc de reconeixement de l'anticòs Rho-1D4 correspon als nou darrers aminoàcids de l'extrem C-terminal, d'aquesta manera és molt probable que la proteïna mutada no s'uneixi al sistema Rho-1D4 acoblat a la sefarsa de CNBr activada. Per comprovar aquesta hipòtesi i veure si el mutant pot regenerar en presència del cromòfor es va realitzar l'assaig de regeneració sense purificar tal i com s'explica en l'apartat III.6.2.3 de **Materials i mètodes**. Es van realitzar els espectres d'absorció de les mostres obtingudes a les fosques i després de ser il·luminades, en membranes de cèl·lules COS-1 abans de purificar. La disminució de l'absorbància a 500 nm indica la presència d' 11-*cis*-retinal unit per enllaç de base de Schiff al cromòfor (Figura 30). A partir dels espectres de diferència podem observar que la proteïna mutada A346P presenta un espectre similar a la proteïna WT. Això indica que l'opsina A346P s'expressa i regenera en presència del cromòfor en el mateix grau que l'opsina WT, però no pot ésser purificada a partir de la columna d'afinitat amb l'anticòs Rho-1D4.

La Figura 31 presenta els espectres d'absorció obtinguts de la purificació de la rodopsina mutant L328P junt amb la proteïna salvatge (WT). L'espectre d'absorció de la proteïna WT presenta les bandes d'absorció característiques a 280 i 500 nm, i la relació A_{280}/A_{500} és de 1.8. El mutant L328P s'expressa a un nivell lleugerament inferior respecte al de la proteïna WT i presenta una relació A_{280}/A_{500} de 2.3, el què indica que uneix cromòfor a un nivell lleugerament inferior al de la proteïna salvatge. El màxim d'absorbància en el visible per el mutant L328P, està localitzat a 500 nm com en la proteïna salvatge.

1.



2.

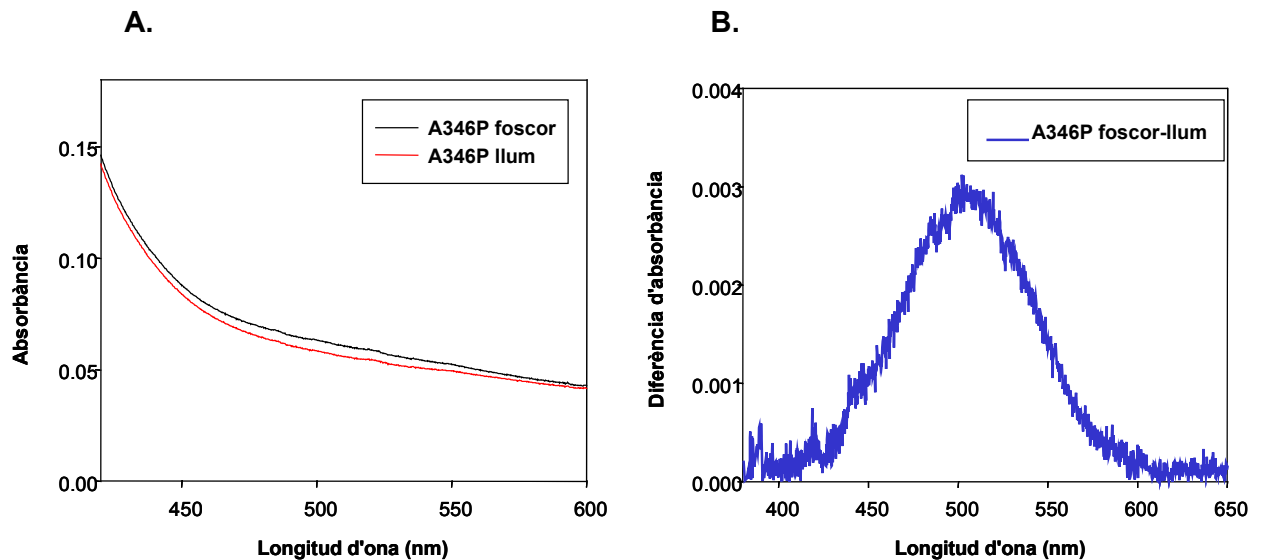


Figura 30. Espectre d'absorció en l'UV-Vis (A) i espectre de diferència (B) de la proteïna salvatge (1) i del mutant A346P sense purificar (2). El càlcul dels espectres de diferència ha estat obtingut a partir de l'espectre de la mostra a les fosques i l'espectre després d'ésser il·luminada durant 1 min amb un filtre que només deixa passa la llum per sobre de 495 nm.

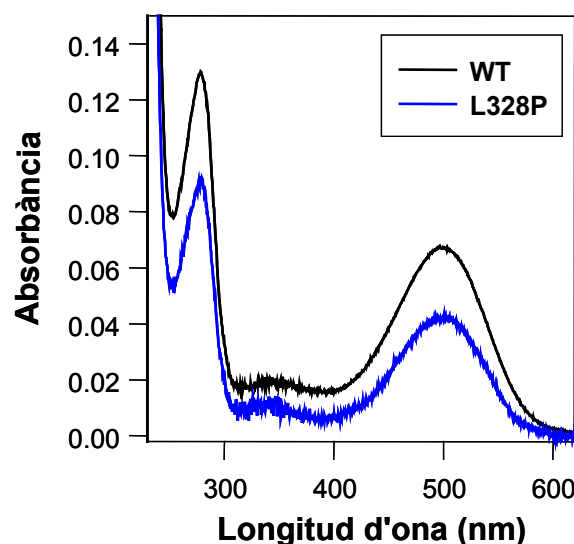


Figura 31. Espectre d'absorció UV-Vis de la rodopsina salvatge i el mutant de rodopsina L328P expressats en cèl·lules COS-1. L'espectre es va realitzar a les fosques i a 20°C.

IV.3.2.2. Caracterització electroforètica

Les Figures 32, 33 i 34 mostren els resultats de l'anàlisi per *Western Blot* de les rodopsines recombinants purificades amb l'anticòs Rho-1D4. A la figura 32, es presenten les mostres obtingudes a partir de la regeneració de les proteïnes recombinants en membranes de cèl·lules COS-1 per els mutants transmembranals que no uneixen cromòfor (G114D, P171Q i H211P) i també per els que no es poden purificar a partir de l'anticòs Rho-1D4 (A346P).

Per confirmar la seva expressió es varen realitzar electroforesis en gel SDS-PAGE i *Western Blot* per detectar, amb l'ajuda de l'anticòs contra l'opsina Rho-1D4, les proteïnes obtingudes en la purificació. La rodopsina recombinant WT s'expressa correctament, donant una banda d'electroforesi que migra a una alçada corresponent a un pes molecular de 40KDa, i presenta un patró de glicosilació heterogeni típic de les proteïnes que s'expressen en aquesta línia cel·lular. Les opsines mutades s'aprecien molt lleugerament en el *Western Blot*, degut al baix nivell d'expressió.

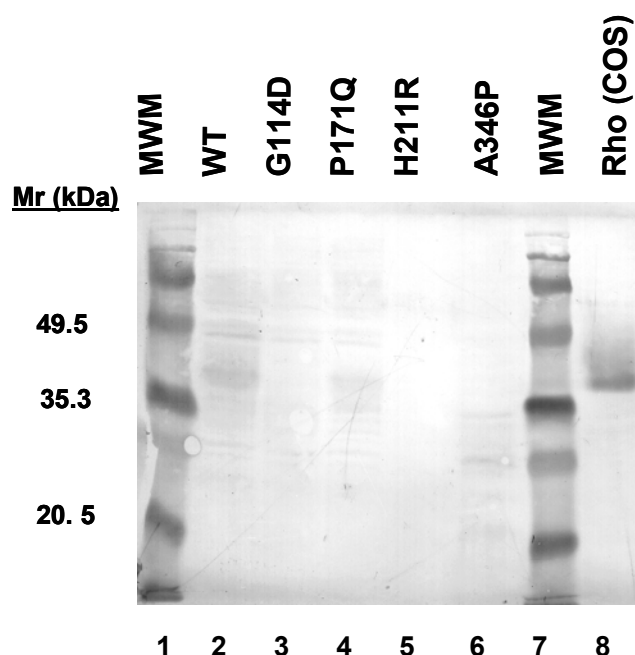


Figura 32. Anàlisi per Western Blot de la rodopsina i els mutants de rodopsina detectats amb l'anticòs Rho 1D4. (1) Marcador de pes molecular. (2-6) Proteïnes mutants obtingudes a partir de la regeneració de membranes de cèl·lules COS-1: WT, G114D, P171Q, H211R i A346P. (7) Marcador de pes molecular. (8) Rodopsina salvatge provinent de cèl·lules COS-1.

La Figura 33, mostra l'anàlisi per immunoblot de les rodopsines mutades M44T i G106W i de la rodopsina WT, detectades amb l'anticòs monoclonal Rho-1D4. La banda que correspon a rodopsina en la proteïna M44T presenta un aspecte molt similar al de la proteïna salvatge, amb una banda de massa molecular aparent d'aproximadament 40 KDa i un *smear* característic degut a la glicosilació heterogènia que es produeix a les proteïnes expressades en cèl·lules COS-1 (Kaushal i al., 1994). Es confirma que la proteïna M44T s'expressa de manera molt similar a la proteïna salvatge i que segueix el mateix patró de comportament electroforètic, el què indica que és processada per la maquinària cel·lular de la mateixa manera que la proteïna WT. La mostra corresponent a la proteïna mutada G106W presenta una banda majoritària de massa molecular aparent similar a la banda de proteïna salvatge i una segona banda més baixa d'aproximadament 35 KDa atribuïda a espècies no glicosilades, que no presenta la taca en forma de llapissada (*smear*) (Kaushal i al., 1994).

Aquest comportament electroforètic ha estat associat a la presència de proteïnes mal plegades defectives que no uneixen retinal (Liu i al., 1996; Ridge i al., 1995). La

proteïna mutada G106W s'expressa a un nivell inferior al de la proteïna WT i no uneix de cromòfor.

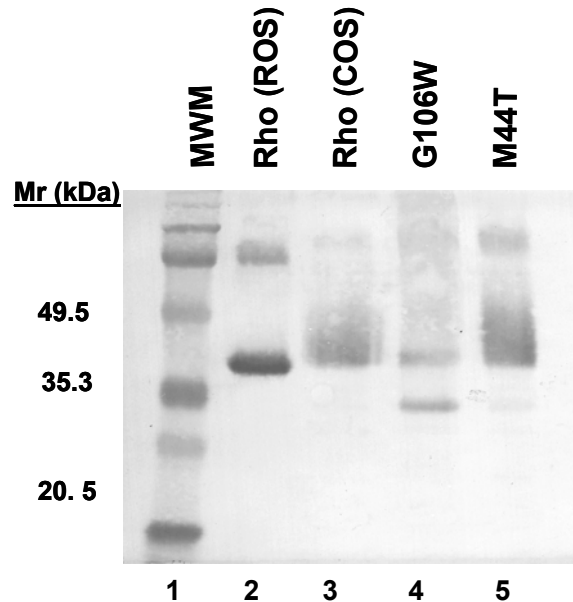


Figura 33. Anàlisi per Western Blot de la rodopsina i els mutants de rodopsina detectats amb l'anticòs Rho 1D4. (1) Marcador de pes molecular. (2) Rodopsina provinent de segments externs de cèl·lules bastó. (3) Rodopsina salvatge provinent de cèl·lules COS-1. (4-5) Proteïnes mutants G106W i M44T.

La Figura 34 mostra els resultats obtinguts de l'anàlisi per immunoblot de les rodopsines recombinants mutants i la rodopsina WT purificades utilitzant l'anticòs monoclonal Rho-1D4. L'aspecte de la banda corresponent a la rodopsina és el mateix per el mutant V137M que el de la proteïna salvatge, i lleugerament més tènue per els mutants R135L i L328P, indicant que s'expressen a un nivell inferior i que la proteïna V137M ho fa a un nivell similar al de la proteïna WT. Aquesta banda presenta en totes les mostres un pes molecular aparent de 40 KDa i un “*smear*” característic degut a la glicosilació de la proteïna expressada en cèl·lules COS-1. Aquesta similitud en el patró electroforètic de les proteïnes

mutants, i l'absència de bandes inferiors (per sota de la banda principal de rodopsina de 40 KDa) suggereix que aquests mutants són processats per la maquinària cel·lular de la mateixa manera que la proteïna WT.

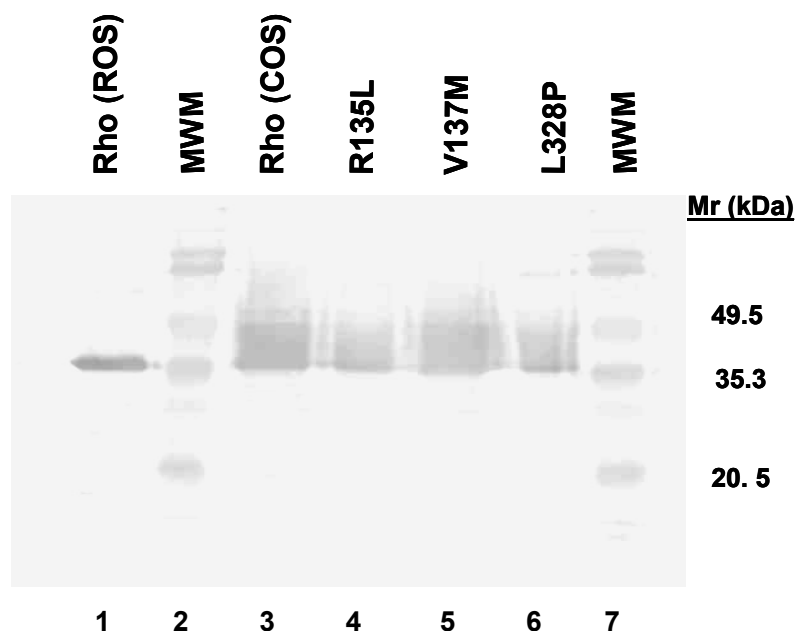


Figura 34. . Anàlisi per Western Blot de la rodopsina i els mutants de rodopsina detectats amb l'anticòs Rho 1D4. (1) Rodopsina provinent de segments externs de cèl·lules bastó. (2) Marcador de pes molecular. (3) Rodopsina salvatge provinent de cèl·lules COS-1. (4-6) Proteïnes mutants R135L, V137M i L328P. (7) Marcador de pes molecular.

IV.3.2.3. Comportament de les proteïnes mutants amb la il·luminació i l'acidificació del medi

La Figura 35 mostra l'espectre de blanqueig i d'acidificació per la proteïna WT i els mutants que uneixen retinal M44T, R135L, V137M i L328P realitzat tal i com s'explica a l'apartat III.6.3 de **Materials i mètodes**. La proteïna recombinant WT provinent de cèl·lules COS-1, presenta la banda d'absorció característica a 380 nm que apareix després d'il·luminar durant 10 segons. Després de l'acidificació, la banda es desplaça cap a 440 nm

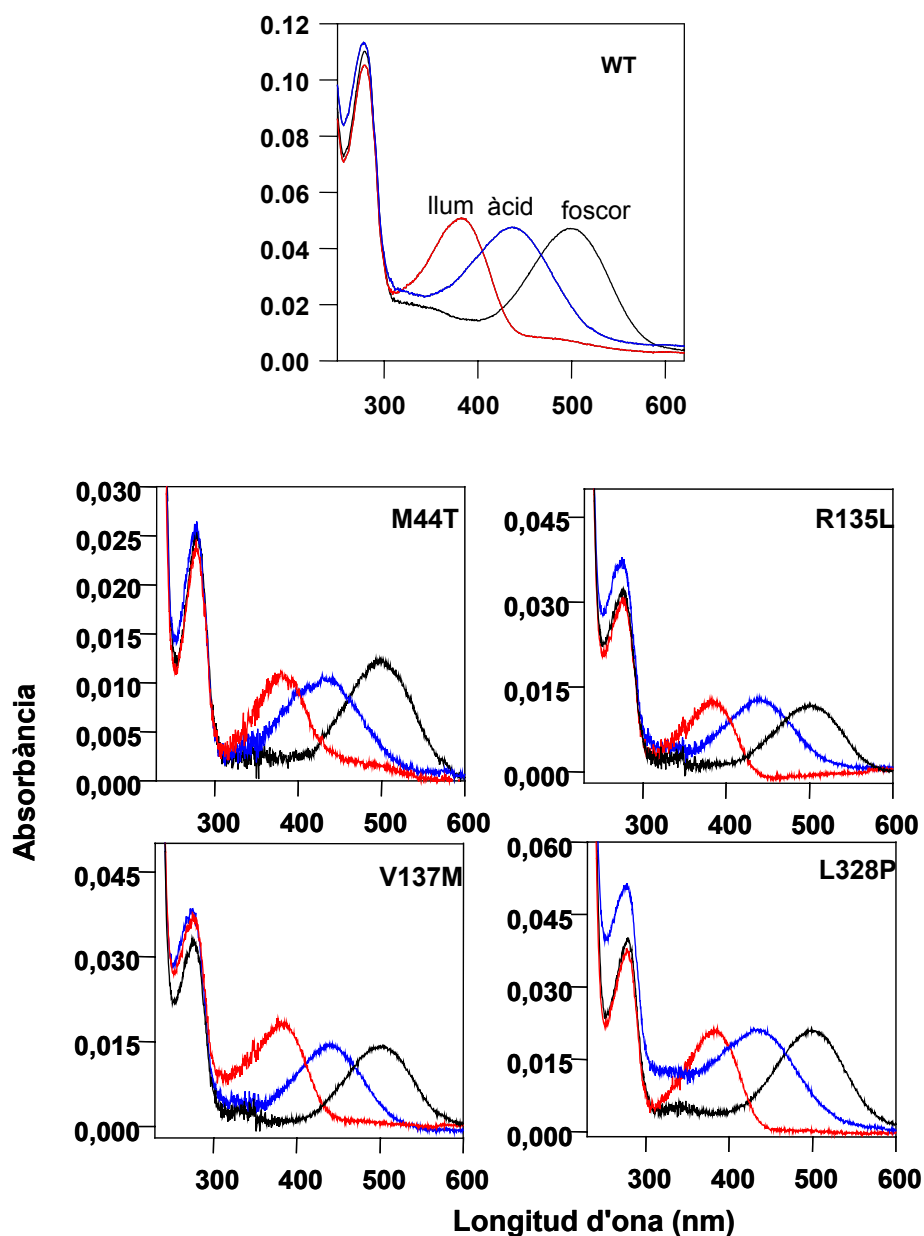


Figura 35. Comportament enfront de la llum i de l'acidificació de la proteïna WT i de les proteïnes mutades associades a RP. L'espectre d'absorció es va mesurar abans (fosc) i immediatament després d'il·luminar la mostra durant 10 s a través d'un filtre de *cutoff* 495 nm (llum). L'espectre de l'acidificació es va obtenir afegint H_2SO_4 2N fins a un pH de 1.9 a les mostres il·luminades (àcid).

indicant clarament que les espècies presents que absorbeixen a 380 nm corresponen a espècies unides per base de Schiff al cromòfor, concretament l'intermediari Meta II, amb el 11-*cis*-retinal unit covalentment a través d'un enllaç per base de Schiff a l'opsina. El comportament enfront de la il·luminació i de l'acifació per les proteïnes mutades ha estat el mateix que per la proteïna salvatge, la qual cosa indica que formen l'intermediari actiu Meta II i uneixen el retinal de la mateixa manera que la proteïna salvatge.

IV.3.2.4. Reactivitat de les proteïnes mutants a l'hidroxilamina a la foscor

Es va estudiar la reactivitat en presència d'hidroxilamina per la rodopsina WT i per les rodopsines amb mutacions associades a RP. En l'experiment es fa el seguiment espectrofotomètric de la pèrdua d'absorbància de la banda corresponent a la rodopsina (500nm) un cop s'incuba la mostra en 25 mM d'hidroxilamina. La reactivitat en presència d'hidroxilamina a les fosques s'ha utilitzat com una mesura de l'accessibilitat d'aquest reactiu a l'enllaç per base de Schiff entre el cromòfor 11-*cis*-retinal i la proteïna (Sakmar i al.,1991). Aquesta accessibilitat és una mesura indicativa del grau de plegament i/o compactació de les proteïnes mutades.

La rodopsina WT expressada en cèl·lules COS-1 és estable a la hidroxilamina a les fosques en el temps de durada de l'experiment, i això està d'acord amb el comportament que presenta en estudis previs. Els resultats obtinguts per les proteïnes mutades s'ajusten a funcions exponencials. A la Taula IV.1 es presenta la constant de velocitat del procés d'hidròlisi de la base de Schiff en presència d'hidroxilamina per cada mutant. Després d'incubar les mostres durant 4 hores amb hidroxilamina, no s'observa una reactivitat significativament diferent a la del WT per la rodopsina mutada M44T (Figura 36). La resta de mutants presenten un increment de la reactivitat amb hidroxilamina moderat respecte la proteïna salvatge (vegeu Taula 6) essent lleugerament superior per al mutant R135L.

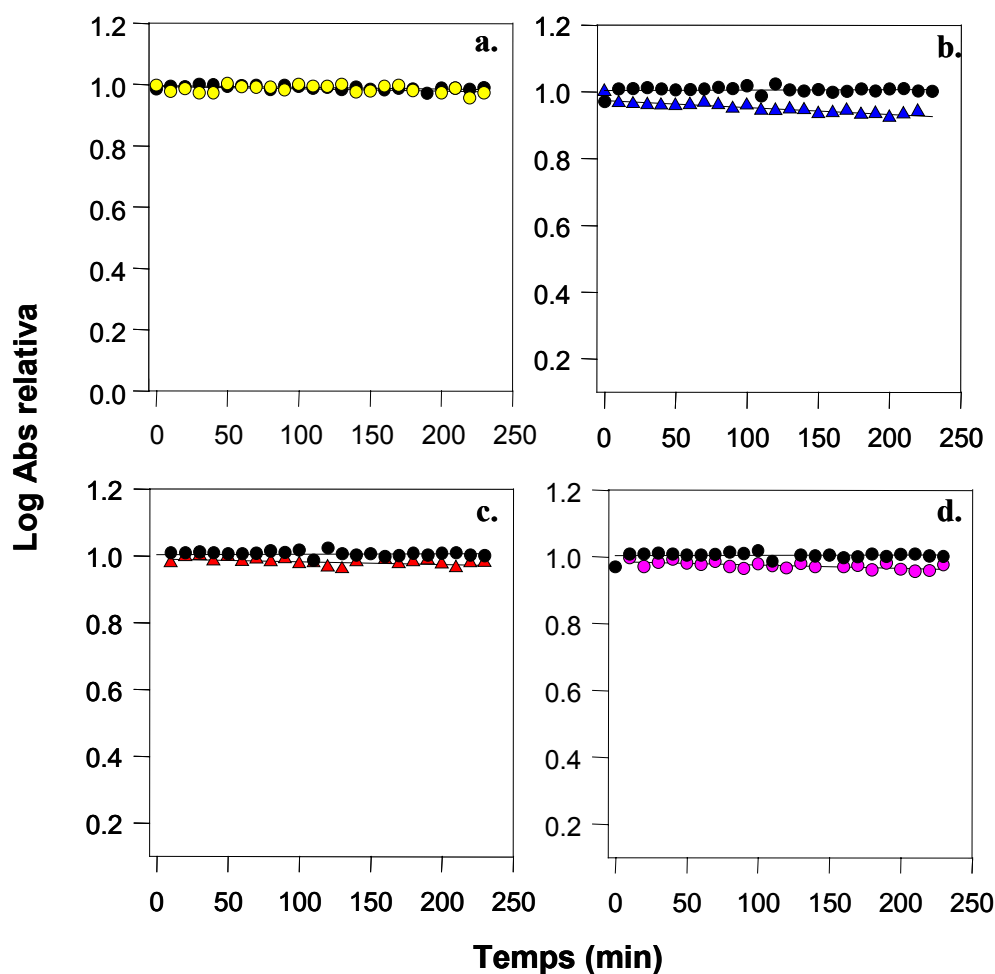


Figura 36. Reactivitat amb hidroxilamina de la rodopsina WT i de les rodopsines mutades a les fosques. Es monitoritza la pèrdua d'absorbància de la banda de cromòfor a 500 nm un cop s'afegeix hidroxilamina a la mostra fins a una concentració final de 25mM. Les dades obtingudes van ser normalitzades i els punts van ser ajustats a una funció exponencial negativa. (a) Reactivitat del mutant M44T (●) respecte la proteïna WT (●). (b) Reactivitat del mutant R135L (▲) respecte la proteïna WT (●). (c) Reactivitat del mutant V137M (▲) respecte la proteïna WT (●). (d) Reactivitat del mutant L328P (●) respecte la proteïna WT (●). Els valors obtinguts de les constants de velocitat del procés (k) es presenten a la Taula IV.1.

El mutant M44T no presenta una reactivitat amb hidroxilamina diferent del WT, tot i que segons el model d'estructura tridimensional de la rodopsina proposat per Palczewski i al. (2000), es tracta d'un residu que forma part de la regió que envolta l'enllaç per base de Schiff. Es tracta d'un canvi de residu que no modifica el plegament de la proteïna ni desestabilitza la unió del 11-*cis*-retinal per enllaç de base de Schiff al residu de Lys296.

Els mutants R135L i V137M de l'extrem de l'hèlix III i el mutant L328P, presenten una reactivitat similar enfront de la hidroxilamina a la de la proteïna WT, tot i que el mutant R135L presenta una reactivitat una mica més elevada.

IV.3.2.5. Estabilitat tèrmica de les proteïnes mutades

Es va realitzar l'estudi de l'estabilitat tèrmica dels mutants associats amb RP que regeneren amb el retinal, realitzant el seguiment de la pèrdua d'absorbància de la banda a 500 nm en funció del temps quan la mostra es troba a una temperatura de 55°C (Figura 37). Aquesta pèrdua d'absorbància deguda a l'alliberament del retinal per efecte de la temperatura ens permet fer una aproximació sobre l'estabilitat conformacional de la proteïna en el seu estat inactiu (foscor). Sota aquestes condicions experimentals la rodopsina salvatge recombinant presenta una pèrdua d'absorbància que s'ajusta a una funció exponencial negativa que presenta una $t_{1/2}$ de 12.7 minuts. Els mutants estudiats presenten una pèrdua de l'absorbància a 500 nm que oscil·la entre valors de $t_{1/2}$ d'11.7 minuts (mutant M44T) i 4.12 minuts (mutant R135L). Els mutants V137M i L328P presenten una estabilitat intermèdia amb $t_{1/2}$ de 10.2 i 9.7 minuts, respectivament.

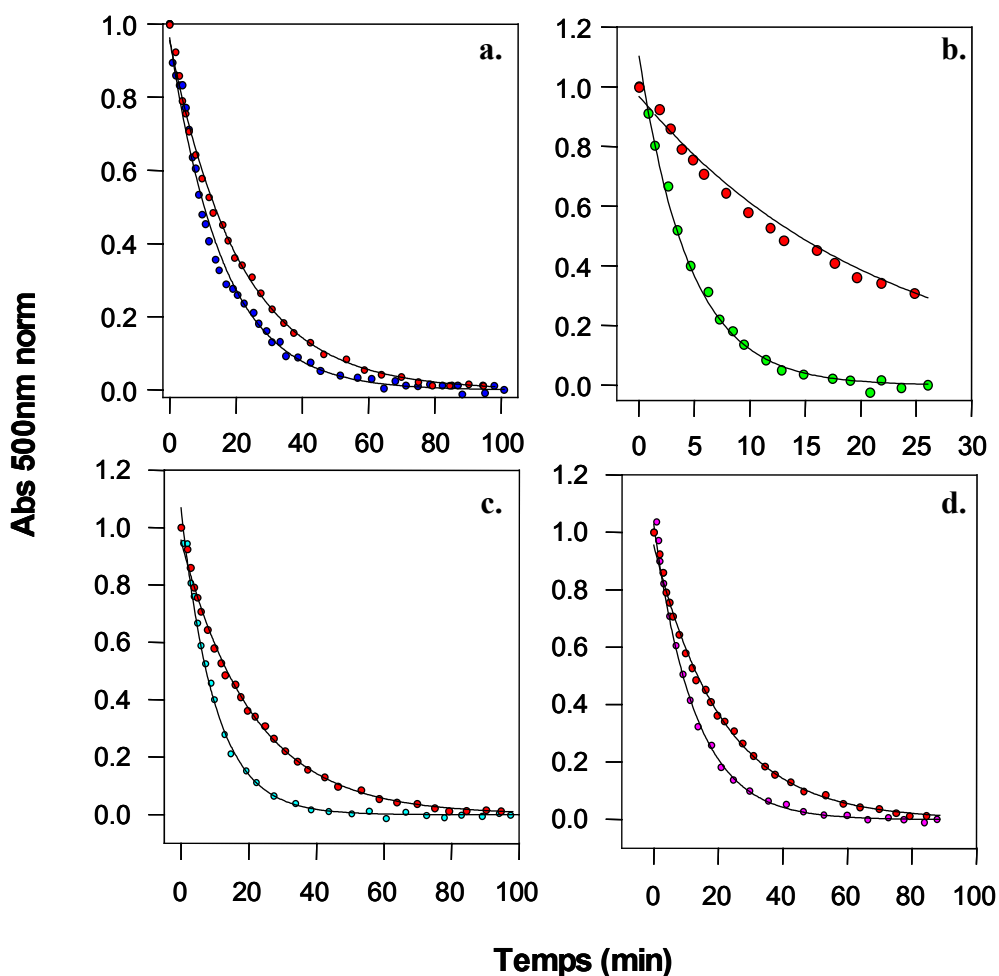


Figura 37. Estabilitat tèrmica de les proteïnes mutades respecte la proteïna WT. Es realitza la mesura de l'estabilitat del cromòfor en funció de la pèrdua d'absorbància de la banda a 500 nm, en funció del temps, un cop es posa la mostra a 55°C i a les fosques (a) Estabilitat del mutant M44T (●) respecte la proteïna WT (●). (b) Estabilitat del mutant R135L (●) respecte la proteïna WT (●). (c) Estabilitat del mutant V137M (●) respecte la proteïna WT (●). (d) Estabilitat del mutant L328P (●) respecte la proteïna WT (●). Les dades d'absorbància a 500 nm varen ser recol·lectades cada 0.2 minuts i ajustades a una exponencial simple negativa. Es va determinar el valor de $t_{1/2}$ del procés per cada proteïna (veure Taula IV.1). En la figura només es mostra una part dels valors per a major claredat.

El mutant M44T presenta un valor de $t_{1/2}$ similar al de la proteïna salvatge. Aquest resultat està d'acord amb l'assaig anterior de reactivitat en presència d'hidroxilamina i indica que la mutació no altera significativament el plegament i/o grau de compactació de la rodopsina mutada. Tot i que aquest residu forma part de la regió que envolta l'enllaç per base de Schiff, concretament la cadena lateral hidrofòbica de la Met44, suporta en part la direcció de la cadena lateral de la Lys296 a través de l'eix longitudinal de la rodopsina (Palczewski i al., 2000).

Entre els dos mutants de l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix III, existeix una diferència important en l'estabilitat tèrmica. El mutant R135L presenta una pèrdua d'estabilitat bastant acusada amb un valor de $t_{1/2}$ de 4.12 minuts. El triplet Glu134-Arg135-Tyr136 (es coneix també com a motiu (D/E)R(Y/W)) és una regió altament conservada en la família de receptors acoblats a proteïna G i els seus residus participen en varis enllaços per pont d'hidrogen amb residus del voltant, el Glu134 forma un pont salí amb el residu d'Arg135 que es troba connectat també al Glu247 i la Thr251 en l'hèlix VI (Palczewski i al., 2000). El canvi d'aquest residu a leucina podria desestabilitzar la formació d'aquests enllaços provocant una variació de l'estructura proteica que fa menys estable la rodopsina a 55°C (així com més reactiva o accessible a la hidroxilamina). La mutació V137M no afecta significativament l'estabilitat tèrmica de la proteïna. La substitució del residu hidrofòbic de valina per metionina és un canvi més conservatiu que afecta menys l'estructura del receptor que la mutació en la posició 135. El mutant L328P presenta un valor de $t_{1/2}$ inferior al de la proteïna salvatge (9.7 minuts), malgrat que es tracta d'una posició a l'extrem citoplasmàtic de la proteïna i no hauria d'influir en l'estabilitat de la rodopsina.

IV.3.2. ESTUDIS FUNCIONALS

IV.3.2.1. Funcionalitat de les proteïnes mutants de rodopsina associades a RP

Ha estat estudiada la funcionalitat dels mutants de rodopsina associats amb RP analitzant la seva capacitat d'activar la proteïna Gt, respecte a la proteïna salvatge. Aquesta activació ha estat determinada a partir d'un assaig espectralfluorimètric tal com es descriu a l'apartat III.7 de **Materials i mètodes**, i ha estat comparada amb la funcionalitat de la proteïna WT.

Les velocitats inicials d'activació de les proteïnes mutades i de la proteïna WT es presenten en la Taula 6 i han estat obtingudes a partir de les corbes d'activació per fluorescència obtingudes per cada proteïna (Figura 38). El valor de la velocitat inicial d'activació per les proteïnes mutants es normalitza respecte el valor d'activació de la proteïna salvatge que es pren com 1.00. L'assaig d'activació de la proteïna Gt, així com els experiments amb hidroxilamina i l'estabilitat tèrmica, només han pogut realitzar-se amb els mutants que regeneren amb 11-*cis*-retinal.

Les proteïnes estudiades associades amb mutacions de RP presenten graus diferents d'activació respecte la proteïna WT. El mutant M44T presenta una velocitat inicial d'activació de l'ordre del 54% superior a la de la proteïna salvatge. Aquesta mutació, localitzada a l'hèlix I de la rodopsina, no provoca canvis importants respecte la proteïna salvatge a nivell d'expressió, regeneració i estabilitat de l'intermediari actiu Meta II així com a nivell de reactivitat en presència d'hidroxilamina i estabilitat tèrmica. En resum sembla que la mutació no afecta al plegament de la proteïna tal i com es pot deduir a partir de la informació obtinguda a partir de les proves que ens donen informació sobre l'entorn del retinal. En canvi, provoca l'increment en la velocitat d'activació de la Gt.

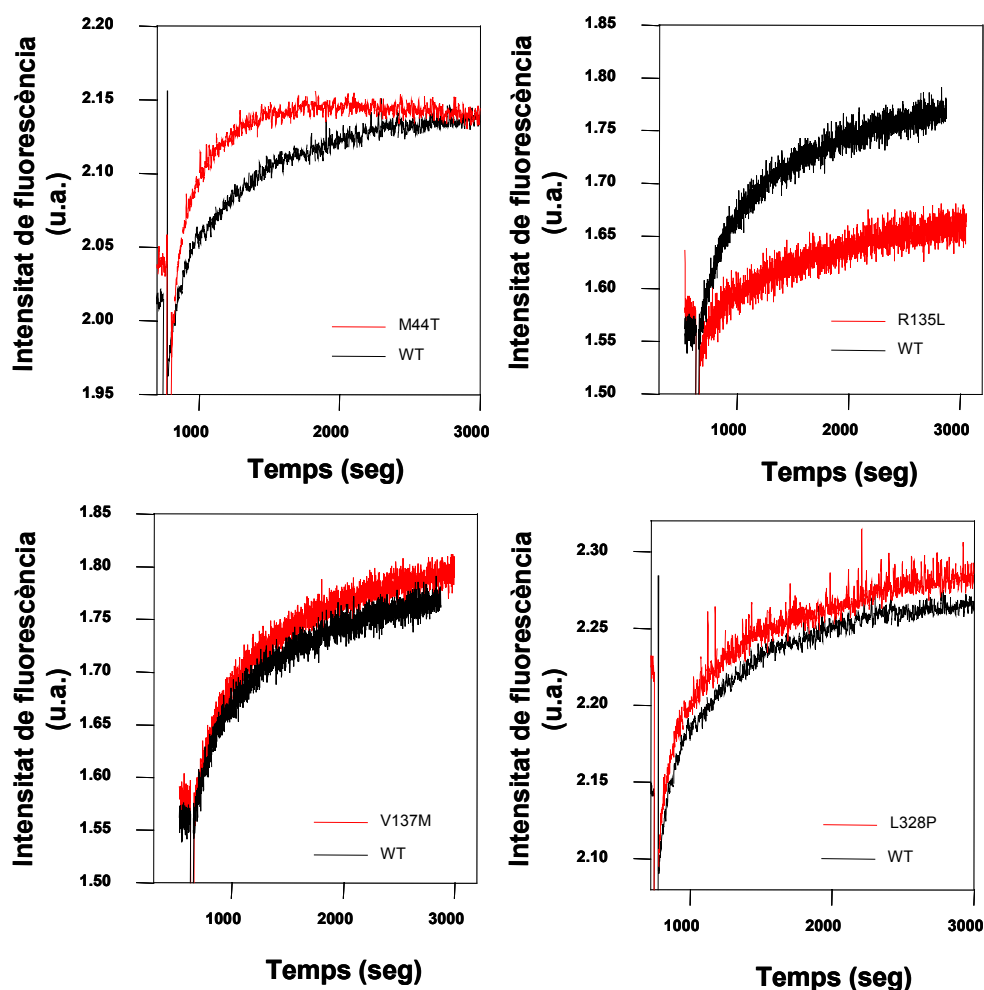


Figura 38. Mostra d'alguns espectres de fluorescència de l'activació de la proteïna G per la rodopsina salvatge (negre) i els mutants M44T, R135L, V137M i L328P (vermell). Per realitzar l'experiment, la rodopsina (40nM) és il·luminada durant 20 segons en una barreja que conté 250nM Gt, 5 μ M GTP γ S en tampó d'activació. Per calcular la velocitat inicial d'activació relativa, es determina el pendent de l'increment inicial de fluorescència un cop la mostra és il·luminada a partir de la recta de regressió formada per els punts corresponents als primers 60 segons de l'experiment.

Els mutants de l'extrem de l'hèlix III tenen alterada la seva interacció amb la proteïna G. La mutació R135L té reduïda la velocitat d'activació de la Gt aproximadament en un 60%. Aquest comportament reflexa la importància d'aquest residu com a integrant del triplet DRY altament conservat en totes les famílies de receptors acoblats a proteïna Gt. En canvi, el mutant V137M altera la transducció de senyal incrementant la velocitat d'activació en un 20% aproximadament. Aquest resultat reforça la hipòtesi sobre la interacció del *loop* 3 citoplasmàtic amb la transducina durant la formació del complex actiu (Hamm, 2001) degut a que l'activació del receptor provoca canvis en l'orientació de les hèlixs transmembranals III i VI.

D'altra banda s'ha determinat la velocitat inicial d'activació de la proteïna mutant L328P. Aquest mutant presenta una velocitat inicial d'activació lleugerament superior a la de la proteïna WT. Segons Hamm (2001), el residu de l'extrem C-terminal després de la Cys316 es troben cobrint els *loops* citoplasmàtics i la introducció de la mutació podria afavorir l'exposició dels *loops* que interaccionen amb la Gt.

IV.3.3. TAULA DE RESULTATS GENERALS DE LES MUTACIONS ASSOCIADES A RP

El conjunt de resultats obtinguts en la caracterització dels mutants associats a RP es presenten a la taula següent:

	$\lambda_{\max}$ (nm)	A_{280}/A_{500}	Constants relatives de reactivitat NH_2OH^a	Estabilitat tèrmica ($t_{1/2}$, min)	Velocitat inicial relativa d'activació Gt ^a
WT	500	1.7-1.8	1	12.7	1
M44T	500	1.9	1.15	11.7	1.54
G106W	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
G114D	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
R135L	500	2.5	1.84	4.1	0.43
V137M	500	2	1.28	10.2	1.24
P171Q	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
H211P	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
L328P	500	2.1	1.11	9.7	1.1
A346P	500	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

Taula 6. Resum dels resultats obtinguts per la rodopsina salvatge i els mutants. ^a Els valors dels diferents paràmetres estudiats (reactivitat amb NH_2OH , $k=10^4 \text{ min}^{-1}$; activació de Gt, velocitat inicial relativa) han estat normalitzats respecte als resultats obtinguts per la proteïna salvatge (WT) considerats com 1.00. ^bND, no determinat. Aquests paràmetres no han pogut ser determinats degut a que aquest mutant no regenera pràcticament en presència del cromòfor (vegeu Figura 25).

IV.4. MUTANTS EN LA POSICIÓ 125 DE L'HÈLIX III DE LA RODOPSINA

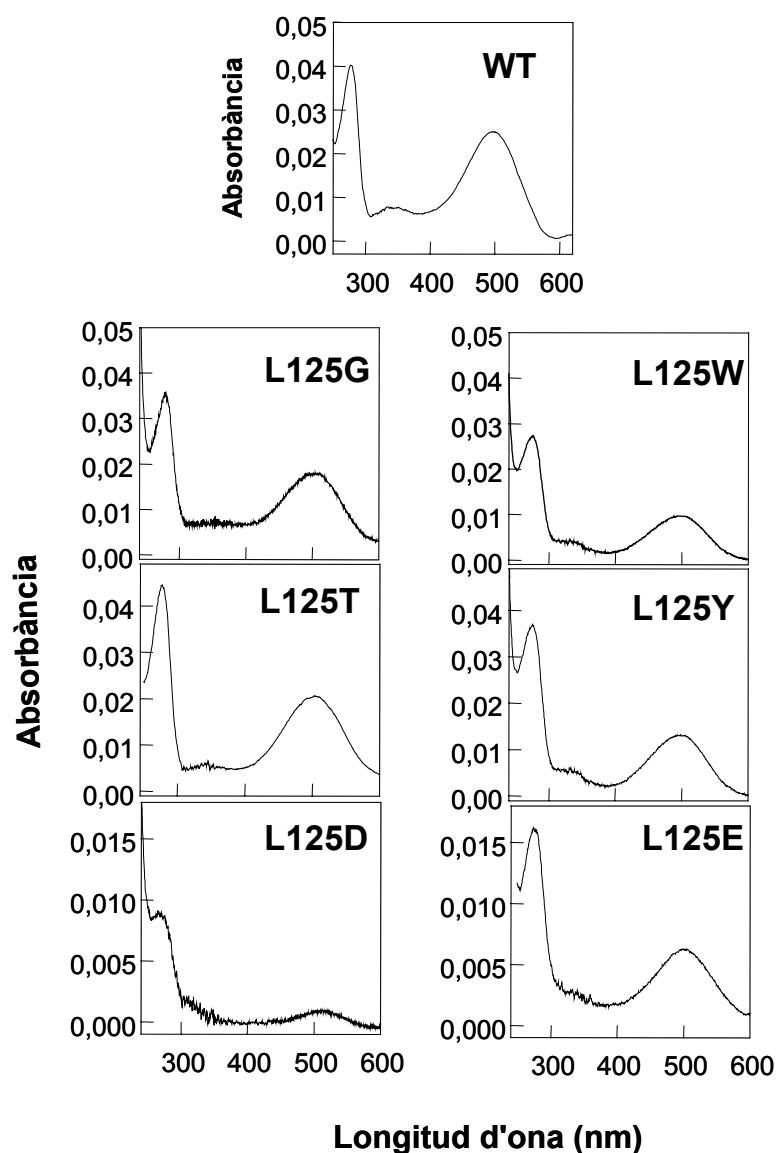
Els mutants que es descriuen a continuació en la posició 125 (lloc de la mutació associada a RP L125R), han estat expressats en cèl·lules COS-1, purificats per cromatografia d'immunoafinitat i caracteritzats espectroscòpicament. Aquests mutants són: L125G, L125T, L125D, L125E, L125Y, L125N, L125I, L125H, L125P i L125W.

IV.4.1. ESTUDIS ESTRUCTURALS

IV.4.1.1. Caracterització per espectroscòpia UV-Vis

En la Figura 39 es mostra l'espectre d'absorció UV-Vis de la proteïna WT i de les proteïnes mutants. L'espectre d'absorció de la proteïna WT presenta la banda d'absorció característica a 280 nm i la banda d'absorció a 500 nm deguda a la unió del cromòfor 11-*cis*-retinal a la proteïna. La proteïna salvatge presenta una relació A_{280}/A_{500} de 1.7. Aquesta relació d'absorbàncies és un paràmetre que s'utilitza per determinar el grau de puresa de la mostra obtinguda i també és indicativa del grau de plegament/desplegament de la molècula de rodopsina. El mutant L125I uneix cromòfor a un nivell similar al de la proteïna salvatge (relació $A_{280}/A_{500}=1.9$). Per altra banda, els mutants L125P i L125D formen una quantitat molt inferior de cromòfor respecte la proteïna WT, amb relacions de A_{280}/A_{500} de 3.7 i de 8-10, respectivament. Tots els altres mutants estudiats formen cromòfor, però en quantitat inferior a la de la rodopsina salvatge, amb unes relacions de A_{280}/A_{500} que oscil·len des de 2.3 fins a 2.7. El mutant L125T presenta una relació A_{280}/A_{500} de 2.3 i el màxim de la banda d'absorció de cromòfor en la regió del visible es troba desplaçat cap a la zona del vermell, a 507 nm. Els mutants L125W i L125Y mostren el pic de màxima absorció a 500 nm i presenten relacions A_{280}/A_{500} de 2.7 i 2.6, respectivament (vegeu Taula 7). Les mutacions L125D i L125E introdueixen residus polars ionitzables, que tenen propietats fisicoquímiques molt similars. Tot i això, aquestes dues proteïnes mutants presenten uns espectres d'absorció d'UV-Vis molt diferents. En el cas del mutant L125E, aquesta proteïna regenera parcialment ($A_{280}/A_{500}=2.6$) i el màxim d'absorció de la banda corresponent al cromòfor es troba lleugerament desplaçat a 503 nm.

Sorprenentment, el mutant L125D, que implica la substitució per una cadena lateral que conté el mateix grup carboxil, regenera cromòfor a un nivell molt baix ($A_{280}/A_{500}= 8-10$) i té el màxim d'absorció de la banda de cromòfor a 505 nm, tot i que la baixa absorbància de la banda afecta la determinació de la longitud d'ona del màxim amb precisió.



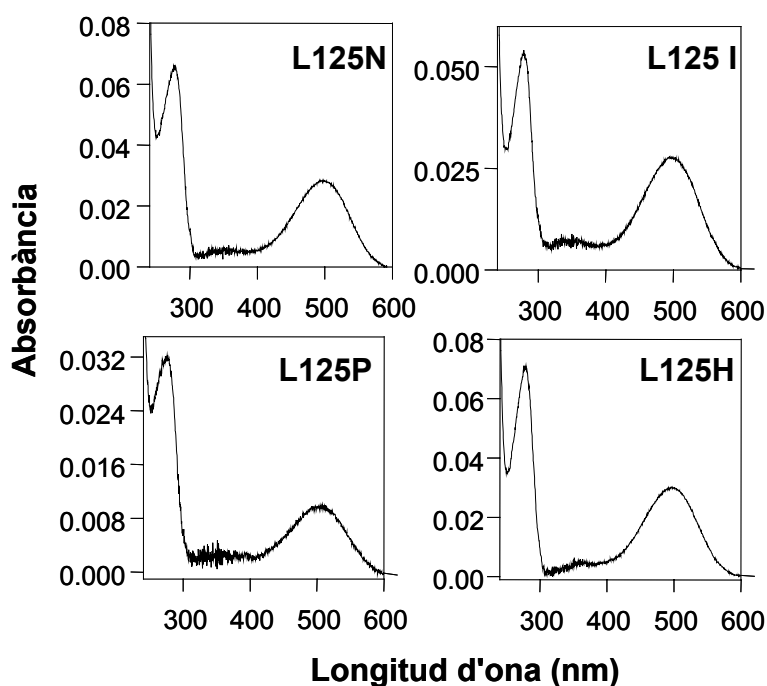


Figura 39. Espectre d'absorció UV-Vis de la rodopsina salvatge expressada en cèl·lules COS-1 i els mutants de rodopsina en la posició 125 de l'hèlix transmembranal III. Es mostra l'espectre a les fosques i a 20°C d'algunes de les proteïnes purificades en tampó D més representatives. Les característiques espectrals dels mutants, incloent el valor de $\lambda_{\max}$, es presenten en la Taula I.

S'ha observat que en determinats casos, quan la mutació afecta algun residu de la butxaca del retinal i es troba presumptament localitzada en una posició estratègica per la unió de retinal, la cinètica d'unió del cromòfor es troba alterada (Reeves i al., 1999, Hwa i al., 1999). D'aquesta forma, la regeneració amb cromòfor es pot incrementar augmentant la concentració d'11-*cis*-retinal utilitzada durant el procés de regeneració de les cèl·lules COS-1 (Reeves i al., 1999), o bé incrementant el temps de regeneració de 9 a 12 hores en lloc de les 3 hores del protocol estàndard (Reeves i al., 1999; Hwa i al., 1999).

Per els mutants estudiats en la posició 125, aquest efecte en la cinètica de regeneració no s'ha pogut detectar almenys per una concentració de retinal de 100 μ M i 12 hores de temps de regeneració; excepte per el mutant L125D que presenta un lleuger increment de la regeneració en aquestes condicions (dades sense mostrar). Tot i així, no es pot excloure un increment de la regeneració sota altres condicions experimentals.

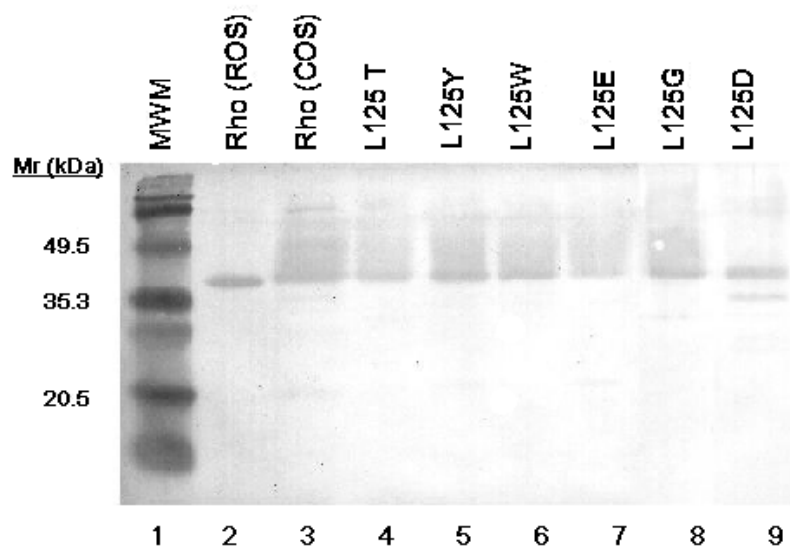
Tots els mutants estudiats presenten menys regeneració amb cromòfor que la proteïna WT tal i com es pot deduir de les relacions A_{280}/A_{500} que són superiors a la de la proteïna salvatge; també presenten una estabilitat inferior segons els experiments de “blanqueig” tèrmic. En particular, el mutant L125D mostra un nivell d'expressió baix, un comportament electroforètic anòmal (vegeu Figura 39) i una regeneració amb cromòfor molt baixa. Tot això indica clarament un mal plegament d'aquesta proteïna mutant.

La majoria de mutants estudiats (L125G, L125T, L125D, L125E i L125P) tenen el màxim d'absorció en la zona del visible desplaçat cap al vermell respecte el màxim a 500 nm de la proteïna salvatge. Aquests desplaçaments del màxim van des de 503 nm en el cas dels mutants L125G i L125E, fins a 507 nm en el cas del mutant L125T i 508 nm en el mutant L125P. El desplaçament del màxim d'absorció quan s'introdueixen aminoàcids que porten grups hidroxil en la cadena lateral ha estat descrit anteriorment (Chan i al., 1992). Els desplaçaments descrits en aquests mutants són petits però significatius ja que indiquen que l'11-*cis*-retinal és sensible enfront al canvi d'aminoàcid; això indica que les mutacions a la posició 125 estan afectant l'estructura nativa de la butxaca d'unió del retinal.

IV.4.1.2. Caracterització electroforètica

La Figura 40 mostra els resultats de l'anàlisi per immunoblot de les rodopsines recombinants purificades utilitzant l'anticòs monoclonal Rho-1D4. L'aspecte de la banda corresponent a la rodopsina és el mateix per la majoria dels mutants que el de la rodopsina salvatge. Aquesta banda presenta una massa molecular aparent d'aproximadament 40 KDa y un “*smear*” característic que és degut a glicosilació heterogènia de la proteïna expressada en cèl·lules COS-1 (Kaushal i al., 1994). Tot i així el mutant L125D mostra una banda d'aproximadament 35 KDa i no presenta aquesta típica taca en forma de llapissada (*smear* típic). Aquest comportament electroforètic ha estat associat a la presència de proteïnes mal plegades defectives per la unió de retinal (Liu i al., 1996; Ridge i al., 1995).

Segons aquest immunoblot, el nivell d'expressió per la majoria de proteïnes mutants és similar al de la proteïna salvatge, excepte pels mutants L125D i L125E, que s'expressen a un nivell inferior.



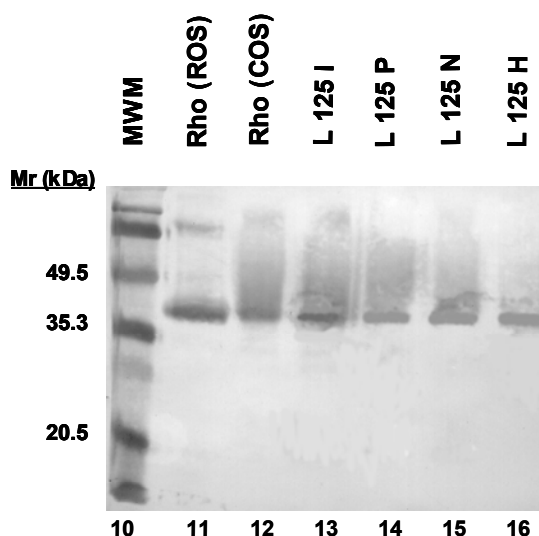


Figura 40. Anàlisi per Western Blot de la rodopsina i els mutants de rodopsina detectats amb l'anticòs Rho 1D4. (1) Marcador de pes molecular. (2) Rodopsina provinent de segments externs de cèl·lules bastó. (3) Rodopsina salvatge provenint de cèl·lules COS-1. (4-9) Proteïnes mutants L125T, L125Y L125W , L125E, L125G i L125D. (10) Marcador de pes molecular. (11) Rodopsina provinent de segments externs de cèl·lules bastó. (12-16) Proteïnes mutades L125I, L125P, L125H i L125N.

Així doncs, tots els mutants estudiats presenten un comportament electroforètic molt similar al de la proteïna salvatge, a excepció del mutant L125D, que no presenta el “*smear*” característic d'espècies glicosilades i que presenta una banda inferior d'aproximadament 35 KDa. La similitud en el patró electroforètic per la resta de mutants, i en particular l'absència de bandes inferiors (per sota de la banda principal de rodopsina de 40 KDa) suggereix que aquestes proteïnes mutants són processades per la maquinària cel·lular de la mateixa manera que la proteïna WT.

IV.4.1.3. Comportament de les proteïnes mutades amb la il·luminació i l'acidificació del medi

La Figura 41 mostra l'espectre de blanqueig i d'acidificació per la proteïna WT i els mutants L125W i L125P. La proteïna recombinant WT provenint de cèl·lules COS-1, presenta la banda d'absorció característica a 380 nm que apareix després d'il·luminar durant 10 s. Després de l'acidificació, la banda es desplaça cap a 440 nm indicant clarament que les espècies presents que absorbeixen a 380 nm corresponen a espècies unides per base de Schiff al cromòfor, concretament l'intermediari Meta II, amb el 11-*cis*-retinal unit covalentment a través d'un enllaç per base de Schiff a l'opsina.

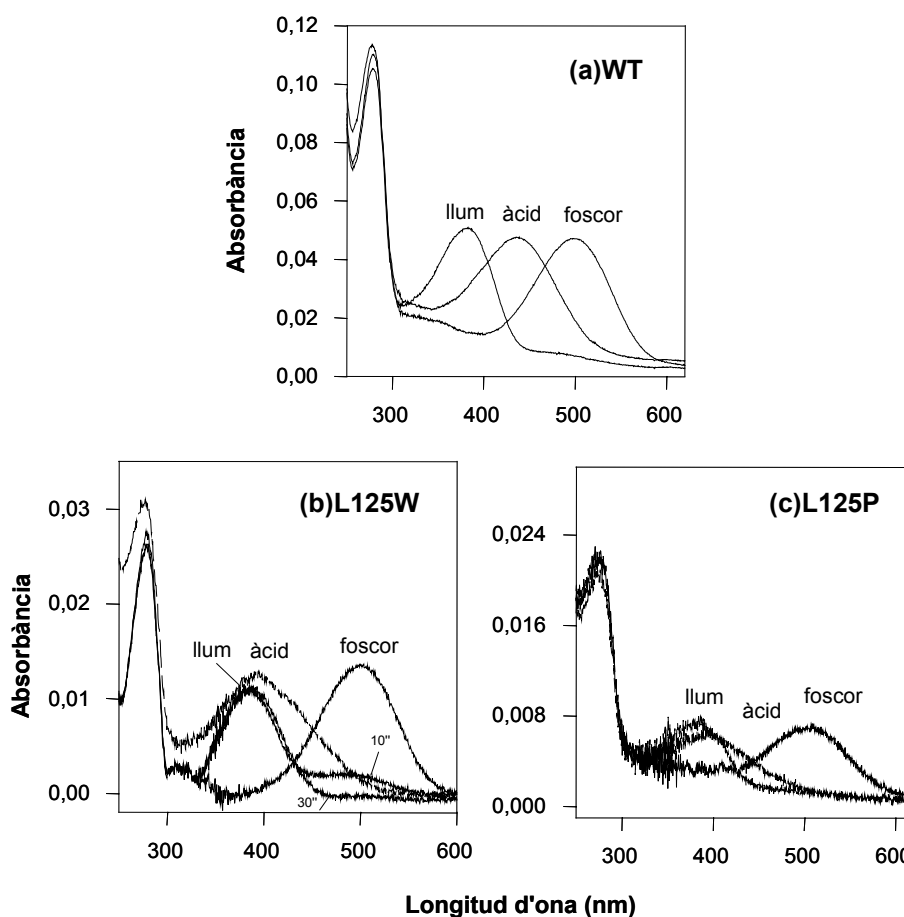


Figura 41. Comportament enfront de la llum i l'acidificació del medi de la rodopsina salvatge (*wild type*) (A) i les rodopsines mutants L125W i L125P (B, C). L'espectre d'absorció va ser registrat a les fosques (foscor) i tot just després d'il·luminar la mostra durant 10 segons amb un transil·luminador de fibra òptica equipat amb un filtre de pas de llum >495 nm (llum). L'espectre acidificat va ser mesurat després d'afegir H₂SO₄ fins a un pH final de 1.9 a les

mostres il·luminades. En el cas del mutant L125W va ser necessari il·luminar durant 30 segons per convertir totes les espècies que absorbeixen a 500 nm en les que absorbeixen a 380 nm.

En el cas del mutant L125W (Figura 41 b), la il·luminació durant 10 segons no és suficient per convertir completament la banda d'absorbància a 500 nm en la banda de 380nm ja que després del blanqueig apareix encara una banda d'absorbància remanent a 500 nm. Durant les següents il·luminacions (temps total 30 segons) el pic d'absorció a 500 nm es desplaça per complet a 380 nm, això suggereix que s'ha produït la conversió total al fotointermediari Meta II. Per altra banda, l'acidificació de la mostra després de la conversió total de les espècies que absorbeixen a 500 nm en espècies que absorbeixen a 380 nm, no resulta en el desplaçament de la banda cap a 440 nm si no que resulta en la formació d'una banda ampla asimètrica amb un màxim d'absorció aproximadament a 390 nm. Per al mutant L125P s'observa el mateix comportament anormal d'acidificació. Aquest comportament, molt diferent del de la proteïna WT, indica que les espècies que absorbeixen a 380 nm obtingudes després de la il·luminació no són espècies que presenten enllaç per base de Schiff, si més no indica que aquestes espècies presenten el 11-*cis*-retinal ja desenganxat de la proteïna. Això indicaria que la Meta II ha decaïgut durant el temps que ha durat l'experiment. El comportament enfront de la il·luminació i l'acidificació per les altres proteïnes mutants ha estat el mateix que per la proteïna WT.

Per els mutants L125W i L125P tant el comportament enfront de la llum com l'acidificació es troben alterats respecte la proteïna WT. Per ambdues proteïnes l'atrapament àcid de les espècies que absorbeixen a 380 nm és irregular. Això indica que les espècies que absorbeixen no corresponen a espècies amb enllaç per base de Schiff, això reflexa molt probablement el fet de què aquestes proteïnes presenten un intermediari actiu Meta II molt inestable.

Tot i així, la reactivitat amb hidroxilamina en aquests mutants és més baixa que la que s'ha vist anteriorment en el cas d'altres mutants (Sakmar i al., 1991; Han i al., 1996). En el nostre cas, la Leu125 es troba localitzada als voltants de l'anell de β -ionona del retinal (Palczewski i al., 2000; Andrés i al., 2001), en una zona allunyada de la base de Schiff. Aquesta localització explicaria que la reactivitat a la hidroxilamina a les fosques dels mutants sigui més baixa respecte a altres mutants estudiats prèviament.

IV.4.1.4. Reactivitat de les proteïnes mutades a l'hidroxilamina a la foscor

S'ha estudiat la reactivitat a l'hidroxilamina de la rodopsina WT i les rodopsines mutants (Figura 42). En l'experiment, es monitoritza espectrofotomètricament la disminució d'absorbància de la banda de cromòfor a 500 nm un cop s'afegeix hidroxilamina a la mostra fins a una concentració final de 25 mM. Tant la rodopsina de ROS com la rodopsina WT, presenten una reactivitat molt baixa en el temps de durada de l'experiment. Els resultats obtinguts per les rodopsines mutades s'ajusten a funcions exponencials (veure Taula 7), i el comportament de la proteïna WT està d'acord amb el comportament descrit en estudis previs (vegeu Figura 42). Després d'incubar la mostra durant 4 hores amb hidroxilamina, no s'observa un augment de reactivitat per a la rodopsina WT. En canvi, tots els mutants estudiats presenten una reactivitat amb hidroxilamina més elevada tal i com es dedueix de la disminució de l'absorbància a 500 nm (Figura 42).

En el cas dels mutants L125W i L125Y aquestes substitucions introdueixen residus més voluminosos que permeten una accessibilitat més ràpida de la hidroxilamina a l'interior de la butxaca d'unió del retinal i a l'enllaç per base de Schiff. En el cas de la mutació L125P s'observa un efecte de la hidroxilamina molt més dràstic (vegeu Figura 42) que estaria relacionat amb el paper desestabilitzador d'hèlix α que té la prolina.

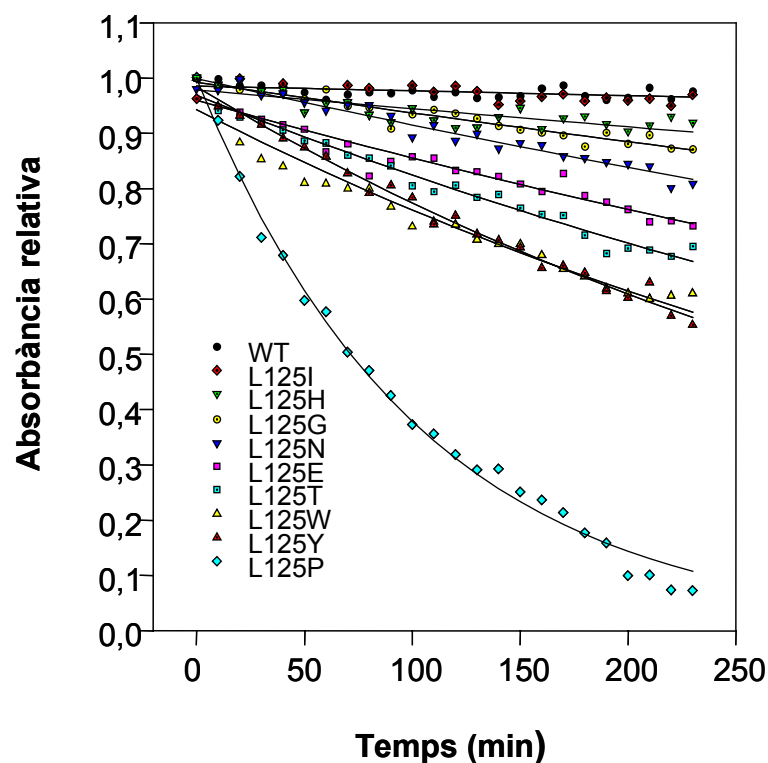


Figura 42. Reactivitat de la rodopsina WT i de les rodopsines mutants a les fosques. Es va realitzar el seguiment de la pèrdua d'absorbància de la banda de cromòfor a 500 nm un cop s'afegeix hidroxilamina a la mostra fins a una concentració final de 25 mM. Les dades obtingudes van ser normalitzades i els punts es van ajustar a una funció exponencial negativa. Els valors obtinguts de la constant de velocitat (k) es presenten a la Taula 7.

IV.4.1.5. Estabilitat tèrmica de les proteïnes mutades

L'estabilitat tèrmica dels mutants purificats i de la proteïna WT també es va determinar, realitzant el seguiment de la pèrdua d'absorbància de la banda a 500 nm en funció del temps a una temperatura de 55°C (Figura 43). En les nostres condicions experimentals, la rodopsina WT presenta una pèrdua d'absorbància a 500 nm que s'ajusta a una funció exponencial negativa que presenta una vida mitjana ($t_{1/2}$) de 12 minuts. Tots els mutants estudiats presenten una pèrdua d'estabilitat bastant acusada amb valors de $t_{1/2}$ que oscil·len entre 12 minuts (proteïna WT) i 0.5 minuts (mutant L125P). Les mutacions més conservatives, com la L125I, presenta una estabilitat intermèdia (4.7 minuts) quan es compara amb la proteïna WT. La pèrdua d'estabilitat a 55°C és màxima per als

mutants L125W (0.7 minuts) i L125P (0.5 minuts), que decau aproximadament 20 cops més ràpid que la rodopsina WT (veure Taula 7). Aquests resultats indicarien que els mutants tenen una estructura menys estable en el seu estat fonamental (a les fosques) que la proteïna salvatge, degut probablement a diferències estructurals en la conformació inactiva d'aquestes proteïnes.

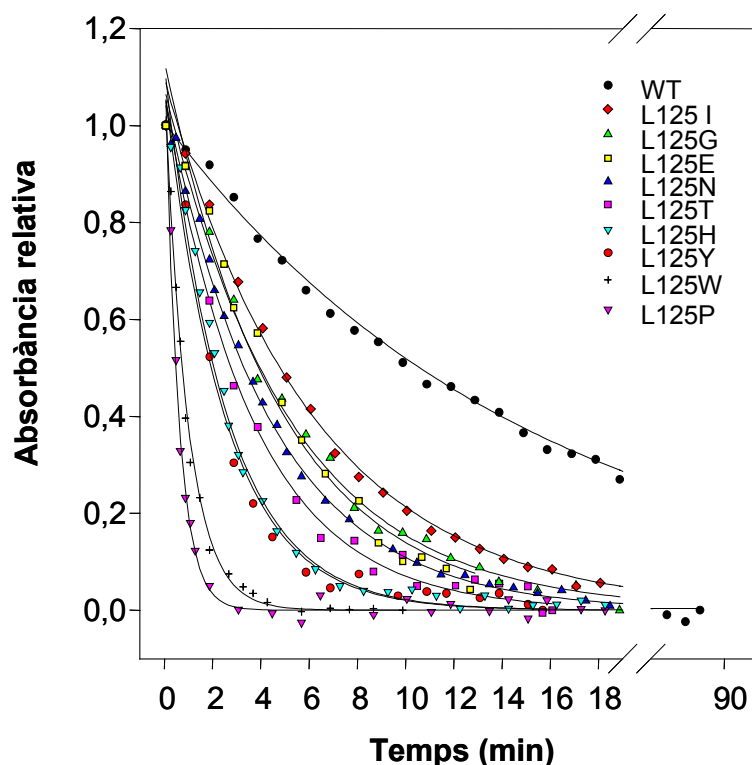


Figura 43. Estabilitat tèrmica de la proteïna WT i dels mutants en la posició 125. Es mesura l'estabilitat del cromòfor en funció de la pèrdua d'absorbància de la banda a 500 nm en funció del temps quan es posa la mostra a 55°C. Tots els mutants presenten una estabilitat més reduïda (pèrdua de retinal més ràpida) quan es comparen amb la proteïna salvatge. Les dades d'absorbància a 500 nm varen ser recol·lectades cada 0.2 minuts, van ser ajustades a una exponencial simple negativa utilitzant el programa d'anàlisi de dades Sigma Plot, i es va determinar el valor de $t_{1/2}$ del procés per a cada proteïna (veure Taula 7). Només es mostra una part dels valors per a major claredat i per evitar el solapament de punts en la figura.

IV.4.2. ESTUDIS FUNCIONALS

IV.4.2.1. Funcionalitat de les proteïnes mutants en la posició 125 de l'hèlix III de la rodopsina

La funcionalitat d'aquests mutants de rodopsina va ser analitzada a partir d'un assaig espectrofluorimètric tal i com es descriu en l'apartat III.7. de **Materials i mètodes**, i va ser comparada amb la funcionalitat de la proteïna WT. Les velocitats inicials obtingudes a partir de les corbes d'activació per fluorescència es mostren en la Taula 7.

El valor de l'activació per a les proteïnes mutants es normalitza respecte al valor d'activació de la WT que es pren com 1.00.

Les velocitats inicials d'activació dels mutants L125N, L125I, L125H i L125P són molt similars a la de la proteïna salvatge. Per als mutants L125G, L125T i L125E la velocitat inicial d'activació està lleugerament reduïda respecte a la de la proteïna WT, i per als mutants L125Y i L125W està reduïda aproximadament en un 50% i 15% respectivament respecte a l'activació de la proteïna salvatge (vegeu Taula 7).

Per als mutants L125T, L125E i L125G la velocitat d'activació es troba només reduïda en un 20-30% respecte la velocitat d'activació que presenta la proteïna WT. Les dues mutacions que impliquen els canvis més importants pel que fa a la grandària de la cadena lateral, la L125Y i la L125W, presenten una disminució major en la velocitat inicial d'activació de proteïna G; en particular per el mutant L125W que presenta una velocitat inicial d'activació del 15% respecte a la proteïna WT (vegeu Taula 7). Per aquest mutant, es pot correlacionar el defecte en la capacitat de transducció de senyal amb la inestabilitat observada en el seu estat actiu (Meta II) que s'observa en els experiments d'acidificació (Figura 41). El mutant L125P presenta un comportament especial ja que, tot i que presenta una forma activa inestable passant ràpidament a la forma d'opsina + all-*trans*-retinal, la velocitat d'activació inicial de la Gt és molt similar a la de la proteïna WT. Això podria estar reflectint un possible efecte estabilitzador de la forma il·luminada del mutant L125P per unió de la proteïna Gt.

L'efecte estèric produït per la introducció de les diferents mutacions sobre l'activació de Gt es pot correlacionar amb el volum molar de cada residu tal i com es presenta a la Figura 44. S'observa que l'activació de Gt és màxima per les substitucions amb aminoàcids de volum molar similar al de la leucina (WT). Per sota i per sobre d'aquest volum molar, l'activació de Gt es veu disminuïda.

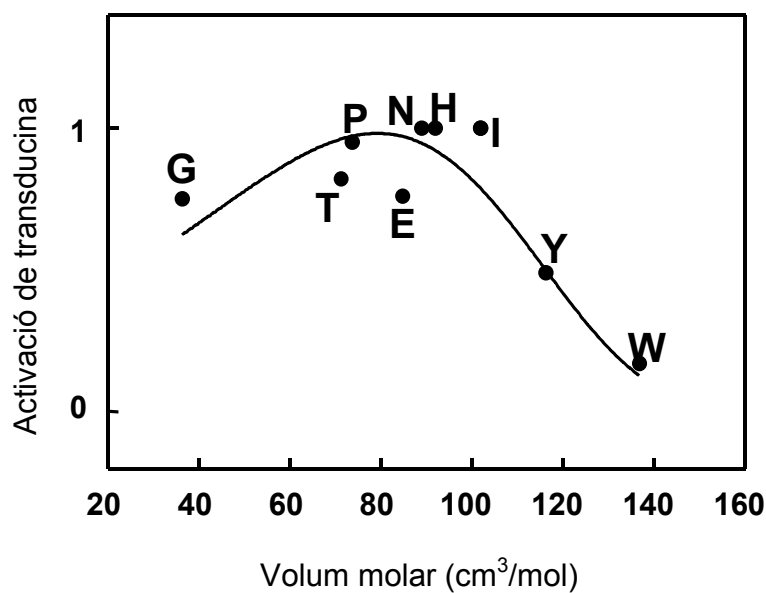


Figura 44. Activació de Gt vs. volum molar. Representació de la velocitat inicial normalitzada d'activació de Gt respecte el volum molar dels residus introduïts. Els resultats s'ajusten a una funció *weibull* (SigmaPlot).

IV.4.3. TAULA DE RESULTATS GENERALS DE LES MUTACIONS EN LA POSICIÓ 125

El conjunt de resultats obtinguts en la caracterització dels mutants en la posició 125 es presenta a la taula següent:

	$\lambda_{\max}$ (nm)	A_{280}/A_{500}	Estabilitat tèrmica ($t_{1/2}$, min)	Constants relatives de reactivitat NH_2OH ^a	Velocitat inicial relativa d'activació Gt ^a
WT	500	1.7	12	1	1.00
L125G	503	2.0	3.9	2	0.75
L125T	507	2.3	2.8	17.9	0.82
L125Y	500	2.6	1.9	26.7	0.49
L12W	500	2.7	0.7	23.8	0.17
L125D	505	8-10	ND ^b	ND ^b	ND ^b
L125E	503	2.6	3.9	12.8	0.76
L125N	495	2.0	3.4	4.2	1.0
L125I	500	1.9	4.7	1	1.0
L125H	500	2.3	2.0	1.2	1.0
L125P	508	3.7	0.5	52.2	0.95

Taula 7. Resum dels resultats obtinguts per la rodopsina salvatge i els mutants. ^a Els valors dels diferents paràmetres estudiats (reactivitat amb NH_2OH , $k=10^4\text{min}^{-1}$; activació de Gt, velocitat inicial relativa) han estat normalitzats respecte els resultats obtinguts per la proteïna salvatge (WT) considerats com 1.00. ^bND, no determinat. Aquests paràmetres no han pogut ser determinats degut a que aquest mutant no regenera pràcticament en presència d'11-cis-retinal (vegeu Figura 40).

V. DISCUSSIÓ GENERAL

V.1. EFECTE DE LES MUTACIONS PUNTUALS EN EL GEN DE LA RODOPSINA ASSOCIADES A RP.

En general els efectes fenotípics de les mutacions caracteritzades en aquest treball en individus afectats de RP es poden associar amb determinats defectes moleculars en la rodopsina. Els pacients presenten una RP de tipus difusa (inici de símptomes característics com la ceguesa nocturna en la primera dècada de vida i una pèrdua progressiva del camp visual fins una constricció total de visió en túnel i manca de senyal a l'electroretinograma a la segona dècada de vida). La caracterització bioquímica de les rodopsines portadores de les mutacions puntuals associades a RP ens ha permès correlacionar aspectes del fenotip clínic dels malalts afectats amb el/s defecte/s observats en l'estructura i/o funcionalitat del receptor.

Les mutacions estudiades pertanyen als diferents dominis de la rodopsina: la superfície citoplasmàtica, la regió transmembranal o el domini intradiscal.

V.1.1. Mutacions en el domini transmembrana de la rodopsina

Una part important de les proteïnes mutades caracteritzades en aquest treball i que es troben associades a RP són mutacions que es localitzen en el domini transmembranal de la rodopsina. En general les mutacions que es donen en aquest domini i als voltants del pont disulfur (excepte la mutació M44T en l'hèlix I) causen un fenotip sever de la malaltia (McInnes i al., 1992), amb aparició dels primers símptomes a una edat precoç,

➤ Hèlix I

La mutació M44T va ser descrita per Reig i al. (1994) que varen localitzar la substitució ATG per ACG en el codó 44 d'un pacient espanyol diagnosticat de RP de tipus difusa. Aquesta mutació produeix el canvi de Met per Thr en l'hèlix I del domini transmembranal.

Han estat descrites vàries mutacions puntuals diferents associades amb RP en l'hèlix I transmembranal de la rodopsina. D'aquestes mutacions vàries presenten la introducció d'aminoàcids carregats (L46R, G51R, P53R i T58R) (Inglehearn i al., 1992; Dryja i al., 1990), d'altres presenten la introducció de residus apolars (G51V i G51A) (Dryja i al., 1991; Macke i al., 1993) i la mutació F45L (Sung i al., 1991) que és una substitució conservativa. L'estudi de les característiques bioquímiques de la majoria d'aquestes mutacions revelen que presenten una capacitat inferior per unir l'11-*cis*-retinal que la de la proteïna WT, s'acumulen al reticle endoplasmàtic i són transportats inefficientment a la membrana cel·lular. Han estat classificats com de classe I segons Sung i al. (1991), excepte el mutant F45L que presenta un comportament intermedi entre els mutants de classe II i els de classe I (comportament relativament similar al WT). Els resultats de la caracterització bioquímica de la rodopsina amb la mutació M44T indiquen que aquesta proteïna es processa i uneix cromòfor com la proteïna salvatge i no presenta problemes de plegament o d'estabilitat en l'estat basal (fosc). De la mateixa manera que la mutació en el codó 45, el mutant M44T presenta un comportament similar al dels mutants de tipus I segons la classificació de Sung i al. (1991). Tot i així, el mutant presenta una velocitat inicial d'activació de proteïna Gt superior a la proteïna WT, aquesta característica no ha estat estudiada ni determinada fins ara en cap mutant de l'hèlix I transmembranal de la rodopsina. És probable que el canvi per treonina (Figura 45) generi un espai buit que pot ser ocupat per una molècula d'aigua i això, junt amb la presència del grup OH, provocaria una pertorbació de l'entorn de la base de Schiff afavorint la seva desprotonació quan s'il·lumina. En conseqüència, si la desprotonació de la base de Schiff és més ràpida, la capacitat d'aquest mutant d'interaccionar amb la proteïna Gt es pot veure incrementada.

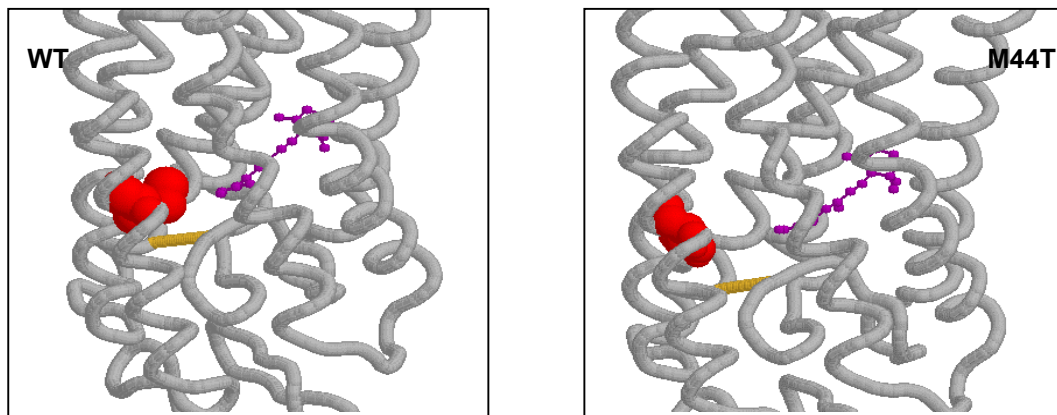


Figura 45. Visualització molecular de la rodopsina (Protein Explorer) basada en l'estructura cristal·lina de Palczewski i al. (2000) on es pot observar buit generat degut a la substitució de la metionina en posició 44 per treonina a l'hèlix I transmembranal (vermell), en una zona propera a l'entorn de la base de Schiff que forma l'11-cis-retinal (violeta) amb el residu de Lys296. En groc es mostra el pont disulfur format entre les cisteïnes 110 i 187.

Aquesta mutació va ser detectada en una família consanguínia que presenta un únic cas de RP. El pacient (mascle de 50 anys) presenta RP de tipus difús. La malaltia es va començar a manifestar a l'inici de la segona dècada de vida amb dificultats de visió nocturna, evolucionant cap a una constricció del camp visual a la tercera dècada. Als 50 anys el pacient no presentava senyal en l'electroretinograma, l'agudeses visual era inferior al 0.1 i el fons de l'ull presentava un aspecte característic de RP.

Aparentment, els mutants amb una activació de Gt incrementada, presenten una manifestació de símptomes més tardana i una evolució més lenta de la malaltia.

➤ Hèlix III

La mutació G114D en el gen de la rodopsina va ser descrita per Millán i al. (1995) en dues famílies de diferent origen (espanyol i alemany) afectades de adRP. En el codó 114 es va localitzar la substitució GGC per GAC que provoca la substitució de la glicina per un residu d'àcid aspàrtic en la cadena polipeptídica (Figura 46). Aquesta mutació es caracteritza per una baixa expressió i manca de regeneració amb 11-*cis*-retinal.

Aquesta mutació provocaria un defecte de plegament en l'estructura terciària de la rodopsina, interferint també en la formació del pont disulfur entre la Cys110 i la Cys187 necessari perquè es doni el correcte plegament de la molècula. En estudis previs d'expressió *in vitro*, (Han i al., 1996b), dels mutants estudiats en la posició 114 (G114A, G114V, G114I, G114M i G114W) només el mutant G114A va regenerar en presència d'11-*cis*-retinal. Això indica que qualsevol substitució amb un aminoàcid de cadena lateral superior a la del grup metil de l'alanina afectaria al grau d'expressió i a la regeneració de les proteïnes mutades. D'acord amb la classificació proposada per Sung i al. (1991) es tracta d'un mutant de classe II i presumiblement tindria afectat el transport de la proteïna del reticle endoplasmàtic a la membrana plasmàtica. Aquesta mutació va ser descrita en dues famílies de diferent origen. La primera família (espanyola) es caracteritza per una aparició dels símptomes a una edat precoç i una progressió ràpida de la malaltia. Els primers símptomes de pèrdua d'agudesia visual apareixen entre els 4-12 anys. En membres entre 15 i 30 anys l'agudesia visual oscil·la entre 0.4 i 0.6 fins arribar a ser 0.1 en el pacient més gran (48 anys). Tots els pacients presenten una reducció concèntrica precoç del camp visual amb lleugers canvis en la pigmentació del fons de l'ull. La resposta a l'electroretinograma es troba ja alterada en el pacient més jove de 4 anys, es redueix en pacients d'entre 20-30 anys i no es detecta cap resposta en pacients per sobre de 30 anys. A la segona família els primers símptomes de ceguesa nocturna apareixen a la infantesa, la progressió de la malaltia es dona més ràpid en les dues femelles que presenten una pèrdua important de camp visual amb signes al fons de l'ull de RP a la segona dècada de vida i discapacitació visual als 36 anys.

Els pacients afectats per aquesta mutació, que provoca un greu defecte estructural de la molècula, es caracteritzen fenotípicament per un patró sever de la malaltia i aparició a una edat precoç.

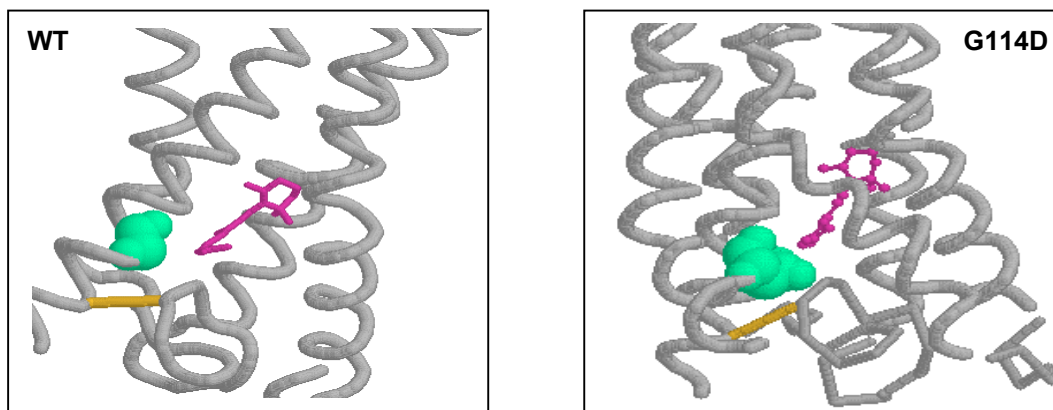


Figura 46. Visualització molecular de la rodopsina (Protein Explorer) basada en l'estructura cristal·lina de Palczewski i al. (2000) on es pot comparar el canvi de volum degut a la substitució de la glicina en posició 114 per aspàrtic en l'hèlix III transmembranal (verd), respecte la posició del cromòfor (violeta) i el pont disulfur entre les cisteïnes 110 i 187 (groc).

La mutació R135L en el gen de la rodopsina va ser descrita en una família espanyola afectada per RP autosòmica dominant per Reig i al. (1996). Es va detectar el canvi de base CGC per CTG en el codó 135, que correspon al canvi d'arginina per leucina. Els membres afectats de la família presenten un quadre clínic característic de RP amb inici de símptomes com la ceguesa nocturna en la primera dècada de vida y una pèrdua progressiva del camp visual. Els estudis oftalmològics i electrofisiològics varen diagnosticar aquesta RP de tipus difús (Lynnes i al., 1985; Massof i al., 1981). Els estudis de Sung i al. (1991) van classificar aquesta mutació com de tipus IIb, és a dir que regenera poc en presència d'11-*cis*-retinal i s'acumula a nivells baixos en la membrana plasmàtica.

Els nostres resultats indiquen que la mutació R135L impedeix la formació de cromòfor al nivell de la proteïna WT, així mateix la reactivitat en presència d'hidroxilamina és major i l'estabilitat tèrmica menor, respecte a la proteïna WT. Pel que fa a la seva funcionalitat, presenta una activació de Gt d'aproximadament el 40% respecte al WT.

Estudis previs realitzats per Min i al. (1993), van determinar també que el mutant no regenera com la proteïna WT però no estan d'acord amb les nostres dades d'activació de Gt. El residu Arg135 es troba molt conservat en l'estructura dels GPCR, formant part del triplet DRY. El Glu134 i l'Arg135 es troben carregats i s'ha vist anteriorment que tenen un paper clau en les interaccions que s'estableixen entre la Meta II i la transducina (Franke i al.,1990) i que la càrrega negativa del Glu134 és important en l'estabilització de la forma inactiva de la rodopsina (Cohen i al., 1992) . La substitució del residu d'arginina per leucina trencaria el pont salí existent entre el Glu134 i la Arg135 requerit per mantenir la rodopsina en la seva forma inactiva. La neutralització de l'Arg135 implicada en la interacció amb la Gt, provoca una alteració de la transducció de senyal.

Aquesta mutació ha estat descrita en una família d'origen espanyol on els membres afectats presenten un quadre clínic típic de RP, amb inici de símptomes característics com la ceguesa nocturna en la primera dècada de vida i una pèrdua progressiva del camp visual. Els estudis oftalmològics i electrofisiològics varen diagnosticar aquesta RP com de tipus difús. Al contrari d'altres mutacions en les que la severitat de la malaltia es relaciona amb la incapacitat d'unir retinal per part de la rodopsina, en aquest cas el fenotip sever de la malaltia i la seva aparició a una edat precoç està relacionat amb la baixa capacitat d'activar la Gt.

La mutació V137M va ser descrita per Ayuso i al. (1996) en una família d'origen espanyol afectada d'adRP. Els individus portadors detectats poden ser homozigots o heterozigots per la mateixa mutació i presenten una àmplia variabilitat clínica de la malaltia. Aquesta mutació a l'extrem de l'hèlix III és conseqüència de la substitució de base GTG per ATG en el codó 137. Segons la classificació de Sung i al.(1991) aquesta proteïna formaria part del grup de mutants de classe I (nivell d'expressió, regeneració i localització subcel·lular semblants al WT). Els resultats de la caracterització *in vitro* d'aquesta proteïna mutada indiquen nivells d'expressió i regeneració amb 11-*cis*-retinal similars als de la proteïna WT. La proteïna es processa de manera anàloga a la proteïna salvatge i presenta les mateixes característiques espectrals. El mutant V137M presenta una activació de Gt un 20% superior a la de la proteïna WT. La diferent regeneració i activació de Gt d'aquest mutant respecte el mutant R135L vist anteriorment, seria degut

a que en el cas del mutant V137M la mutació modificaria la conformació del *patch*

hidrofòbic de valines 137-138-139, conservat en l'estructura dels GPCR's i implicat en l'activació de la Gt. Segons el model descrit per Palczewski i al. (2000), les Val137, Val138 i Val139 es troben cobrint parcialment el costat citoplasmàtic dels residus de Glu134 i Arg135. Aquest parell de residus carregats s'ha vist anteriorment que tenen un paper clau en les interaccions que s'estableixen entre la Meta II i la Gt (Franke i al., 1990) i que la càrrega negativa del Glu134 és important en l'estabilització de la forma inactiva de la rodopsina (Cohen i al., 1992). La substitució del residu de valina per una metionina provocaria un canvi estèric al costat citoplasmàtic que afavoriria la interacció dels residus 134-135 amb la Gt.

Els individus homozigots explorats estan afectats de RP mentre que els individus heterozigots presenten una ample variabilitat en la manifestació de la malaltia. Hi ha individus heterozigots asimptomàtics, mentre que els afectats presenten ceguesa nocturna, agudeses visual disminuïda, constricció del camp visual, aspecte del *fundus* típic de RP i absència de registre d'electroretinograma. En qualsevol cas, en aquesta família apareixen individus amb diferents manifestacions clíniques de la malaltia, degut molt probablement a efectes addicionals (genètics o ambientals) que poden jugar un paper important en la severitat i edat d'aparició dels símptomes.

➤ **Hèlix IV**

La mutació P171Q en el gen de la rodopsina va ser descrita per Antiñolo i al. (1994) en una família d'origen espanyol amb adRP de tipus difús. En el codó 171 del gen de la rodopsina es va detectar la substitució de CCA per GAA., que produeix el canvi del residu de prolina per glutamina en l'hèlix IV transmembranal de la rodopsina en una posició que no varia en les opsines dels vertebrats (Dryja i al., 1990). Els resultats de la caracterització bioquímica d'aquesta proteïna mutada mostren uns nivells d'expressió baixos i absència de regeneració amb 11-*cis*-retinal. La prolina és un residu important en el plegament de la cadena peptídica, és de suposar que aquesta mutació pot produir un canvi en l'orientació de l'hèlix alfa (kink).

S'ha comparat el comportament d'aquesta mutació amb els mutants P170L i P171L (Kaushal & Khorana, 1994). El mutant P170L regenera amb 11-*cis*-retinal mentre que el mutant P171L no permet la unió de cromòfor. Això indicaria que la diferent orientació dels aminoàcids a dins de l'hèlix transmembrana, permet o no interaccions específiques amb altres aminoàcids de les hèlixs veïnes. Així la P171 es trobaria encarada cap a la butxaca del retinal o bé cap a altres aminoàcids propers importants en les interaccions hèlix-hèlix.

Els nostres resultats serien compatibles amb els deduïts de l'estructura cristal·lina proposada per Palczewski i al. (2000) en la qual la P171 es troba encarada cap al *binding pocket* del retinal i propera als residus Gly174, Ser176 i Arg177 del *loop* intracel·lular EII. Una part del *loop* EII es troba replegat cap al centre de la rodopsina, en contacte amb l'extrem intradiscal de l'hèlix IV i presenta zones (residus Ser186 fins Asp190) que estan en contacte amb el retinal.

Aquesta mutació va ser detectada en una família d'origen espanyol on l'aparició de la malaltia en els membres de la família es dona a la meitat de la segona dècada de vida, amb ceguesa nocturna i una reducció progressiva del camp visual que acaba en una constricció extrema (visió en túnel) als 40 anys. Durant la tercera dècada, els pacients no presenten resposta a l'electroretinograma.

➤ Hèlix V

La mutació H211R en el gen de la rodopsina va ser descrita en una família espanyola per Reig i al. (1994). Es va detectar la substitució en el codó 211 del triplet CAC per CGC, junt amb una substitució de C a A en el codó 160, que dona lloc a una mutació silenciosa. La caracterització *in vitro* de la proteïna indica un baix nivell d'expressió i manca de regeneració amb 11-*cis*-retinal, com els mutants de classe II. La introducció d'una arginina carregada positivament en l'entorn hidrofòbic de les hèlixs transmembrana provocaria importants alteracions estructurals reflectides en un mal plegament tridimensional de la proteïna que dificultaria el seu transport a la membrana i a la vegada la seva regeneració amb l'11-*cis*-retinal.

Estudis estructurals utilitzant espectrometria de masses han permès detectar que en aquesta proteïna mal plegada es forma un pont disulfur anòmal entre la Cys185 i la Cys187 (Hwa i al., 2002). Això podria ser una característica estructural comú dels mutants que presenten *misfolding*.

Aquesta mutació ha estat detectada en una família d'origen espanyol amb RP clínicament classificada com de tipus difusa. El fenotip dels pacients diagnosticats amb aquesta mutació es caracteritza per ser sever, amb una manifestació de la malaltia a edats primerenques.

V.1.2. Mutacions en el domini intradiscal de la rodopsina

La mutació puntual G106W en el gen de la rodopsina es troba associada amb RP autosòmica dominant i ha estat detectada en pacients d'origen britànic i americà. Aquesta mutació, localitzada al primer *loop* intradiscal de la rodopsina, implica la substitució de GGG per TGG en el codó 106. La proteïna presenta un nivell d'expressió baix, no regenera amb 11-*cis*-retinal i presenta un comportament electroforètic característic de rodopsines mal plegades amb la presència d'espècies no glicosilades. Aquesta mutació es troba molt a prop del pont disulfur entre les cisteïnes 110 i 187, essencial per al plegament correcte de la proteïna (Figura 47). En aquest sentit s'ha determinat en estudis previs la importància de l'extrem N-terminal i els *loops* intradiscals en l'engalzament previ de la rodopsina, necessari per la formació precisa de la seva estructura terciària (Kaushal i al., 1994). Aquesta interpretació està confirmada en l'estructura cristal·lina recentment publicada (Palczewski i al., 2000) en la qual les regions en el domini extracel·lular de la rodopsina (extrem N-terminal i *loops*) es troben formant una estructura estructurada i molt compacta.

No s'han trobat dades clíniques sobre pacients portadors d'aquesta mutació, que molt probablement presentaran molt probablement un fenotip sever de la malaltia.

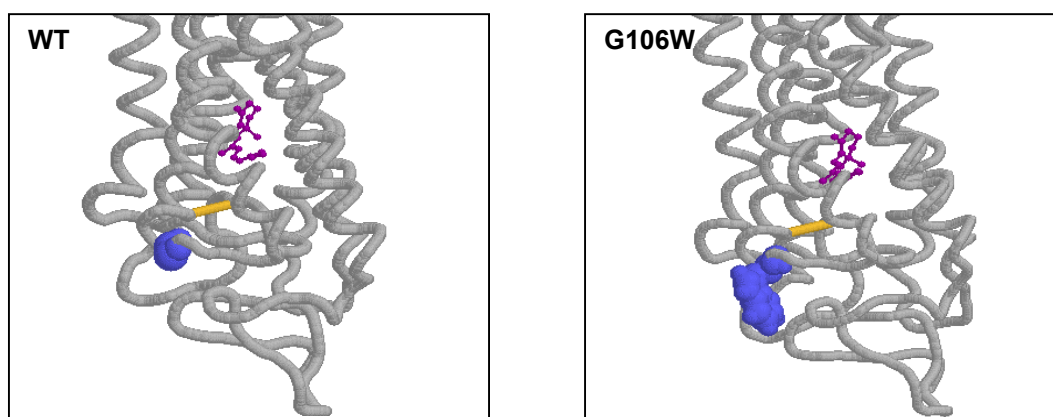


Figura 47. Visualització molecular de la rodopsina (Protein Explorer) basada en l'estructura cristal·lina de Palczewski i al. (2000) on es pot comparar el canvi de volum degut a la substitució de la glicina en posició 106 per triptòfan en el costat intradiscal (blau) respecte la posició del pont disulfur entre les cisteïnes 110 i 187 (groc). En violeta es mostra el cromòfor 11-*cis*-retinal.

V.1.3. Mutacions en el domini citoplasmàtic de la rodopsina

La mutació L328P, localitzada a l'extrem C-terminal de la rodopsina, es troba associada amb adRP i és conseqüència de la substitució de CTG per CCG. La caracterització de la proteïna mutada mostra un comportament semblant al WT tot i que la regeneració amb cromòfor i l'expressió és lleugerament inferior a la de la proteïna WT. Aquesta mutació augmenta lleugerament l'activació de la transducina. Segons Hamm (2001), els residus de l'extrem C-terminal després de la Cys316 es troben en la proteïna WT cobrint els *loops* citoplasmàtics. Es molt probable que la introducció d'un residu de prolina provoqui un canvi conformacional en l'extrem C-terminal, quedant exposats aquests *loops* citoplasmàtics afavorint la interacció amb la Gt.

La mutació A346P va ser descrita per Borrego i al. (1995) en una família d'origen espanyol afectada de RP autosòmica dominant. En aquest treball no s'ha pogut caracteritzar la proteïna portadora d'aquesta substitució ja que no ha estat possible la seva purificació mitjançant el sistema d'immunoafinitat degut a que la mutació es troba a l'epítot de reconeixement de l'anticòs Rho-1D4. Tot i així es va poder comprovar el nivell d'expressió i regeneració amb 11-*cis*-retinal mitjançant *Western Blot* i espectroscòpia de diferència en el visible. Es va trobar que el mutant s'expressa i regenera al mateix nivell que el WT. En els individus afectats d'aquesta família, l'inici de la malaltia es dona aviat a la infantesa amb l'aparició de ceguesa nocturna. Posteriorment presenten una reducció progressiva del camp visual fins que arriben a tenir una constricció extrema en la tercera dècada de vida. Durant l'inici de la segona dècada de vida, els pacients no presenten respostes electroretinogràfiques.

Aquestes mutacions en el domini C-terminal de la rodopsina podrien afectar el procés de fosforilació de la molècula en l'extrem C-terminal i la posterior unió de l'arrestina durant el procés d'inactivació de la rodopsina (Wilden i al., 1986). En ratolins transgènics que expressen la mutació Q344ter s'ha vist que els bastons funcionen quasi correctament tot i que presenten major sensibilitat a la llum i una resposta més lenta comparada amb la dels bastons control (Sung i al., 1994). Per altra banda, el mutant Q344ter presenta alteracions en el transport cap al segment extern del bastó (Sung i al., 1994). És possible que les mutacions L328P i A346P estudiades produeixin un efecte similar a la Q344ter acumulant-se en el segment extern del bastó, interferint en la viabilitat cel·lular. Això podria ser la causa del fenotip observat amb aparició de la malaltia a una edat precoç.

V.2. EFECTE DE MUTACIONS EN LA POSICIÓ 125 DE L'HÈLIX III DE LA RODOPSINA EN LA CONFORMACIÓ DE LA BUTXACA D'UNIÓ DEL RETINAL.

En la posició 125 de l'hèlix III transmembranal de la rodopsina han estat estudiades prèviament diverses mutacions, degut a què és el lloc de la mutació L125R associada a RP (Garriga i al.,1996). La proteïna mutada L125R no regenera amb 11-*cis*-retinal en membranes de cèl·lules 293 (Sung i al.,1993) ni quan és purificada en presència de DM (Garriga i al.,1996). El nostre propòsit va ser aprofundir en la significació de la posició 125 en l'estructuració del domini transmembranal de la rodopsina. Amb aquesta finalitat, es va estudiar l'efecte de noves mutacions que involucren la introducció de cadenes laterals amb propietats físico-químiques diferents (tamany i càrrega, és a dir efectes estèrics i electrostàtics), en l'estructura i funció de les proteïnes mutades.

Totes les proteïnes mutades estudiades presenten el mateix comportament electroforètic que la proteïna salvatge, a excepció del mutant L125D que no presenta el “*smear*” característic de la proteïna WT i que presenta una banda inferior d'aproximadament 35 KDa, que ha estat prèviament atribuïda a espècies no glicosilades. La similitud dels patrons electroforètics en la resta de mutants i, en particular, l'absència de bandes inferiors (per sota de la banda principal de rodopsina a aproximadament 40KDa) suggereix que les proteïnes mutades són processades per la maquinària cel·lular de la mateixa manera que la WT. Malgrat el processament normal de les proteïnes, la majoria de mutants estudiats presenten una regeneració amb el retinal inferior a la de la proteïna WT tal i com es pot deduir de l'elevada relació $A_{280}/A_{500\text{ nm}}$. Es a dir, la cadena lateral introduïda

interfereix en la formació de la butxaca d'unió del retinal i també en l'estabilitat de la proteïna tal i com es pot deduir dels resultats dels experiments tèrmica i de reactivitat amb la hidroxilamina.

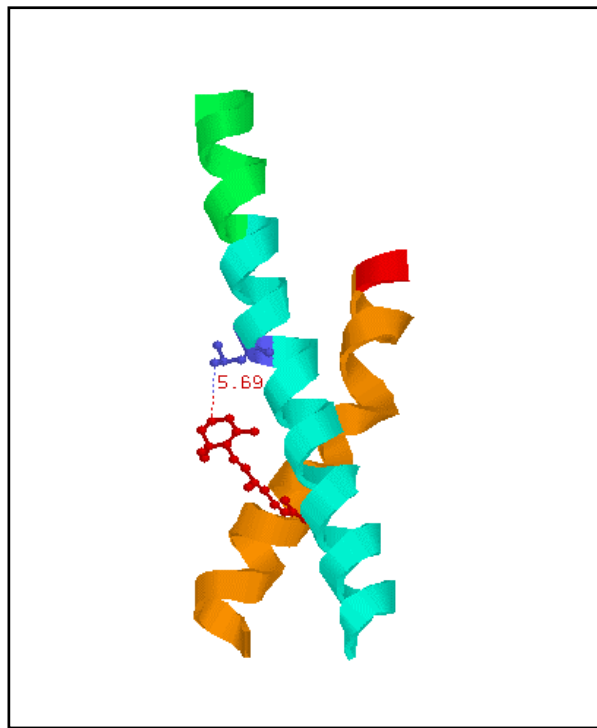


Figura 48. Visualització molecular del residu Leu125 de l'hèlix III transmembranal de la rodopsina respecte la localització del 11-*cis*-retinal unit per enllaç per base de Schiff al residu de Lys296 de l'hèlix VII de la proteïna. Aquesta visualització ha estat realitzada a partir de les coordenades presentades en el darrer model de l'estructura tridimensional de la rodopsina (Palczewski i al., 2000) utilitzant el programa de visualització molecular Protein Explorer.

El model estructural derivat de l'estructura cristal·lina més recent (Palczewski i al., 2000) permet conèixer els residus que formen part de la butxaca d'unió del retinal. En aquesta estructura, la Leu125 es troba localitzada a la part mitjana de l'hèlix III en direcció cap al domini citoplasmàtic de la proteïna i aproximadament a un gir d'hèlix per sobre del Glu122 que es troba a l'entorn del retinal (Han i al., 1996) i proper a l'anell de β -ionona. Altres residus importants d'aquesta regió són la Phe261 i el Trp265 que cobreixen l'anell de β -ionona des de la cara citoplasmàtica, i la Met207, la His211, la Phe212, la Tyr268 i la Tyr269 que envolten l'anell de β -ionona des de la cara extracel·lular (Palczewski i al., 2000). A partir de l'estructura cristal·lina, podem deduir que el residu Leu125 no es troba en contacte directe amb el cromòfor però sí a una distància suficientment propera com per que la introducció de determinats aminoàcids puguin induir pertorbacions estructurals significatives i modificar substancialment el comportament de la proteïna.

El conjunt de resultats obtinguts en aquest treball a partir dels estudis de mutagènesi, alguns d'ells ja publicats (Andrés i al., 2001), juntament amb els que han estat descrits anteriorment per Garriga i al., (1996), confirmen la implicació de la Leu125, en l'estructuració correcte de la butxaca del retinal i estan d'acord amb les dades estructurals deduïdes de diferents models tridimensionals proposats en els últims anys (Bikker i al., 1998; Alkorta i al., 1994; Filizola i al., 1998). Així, una substitució que impliqui un augment de volum, com per exemple, la L125W, o una que impliqui modificacions en l'estructura helicoidal, com per exemple, la L125P, o la introducció d'un residu carregat, com el mutant L125E (Figura 49), induiran pertorbacions que afectaran d'alguna manera l'estructura del retinal i en particular l'entorn de l'anell de la β -ionona, regió implicada en la transició conformacional Meta-I -- Meta-II (Jäger i al., 1994) i en el mecanisme de reposicionament de l'anell de β -ionona en la isomerització *cis-trans* del retinal, , que es el factor que determina l'activació del receptor (Teller i al., 2001).

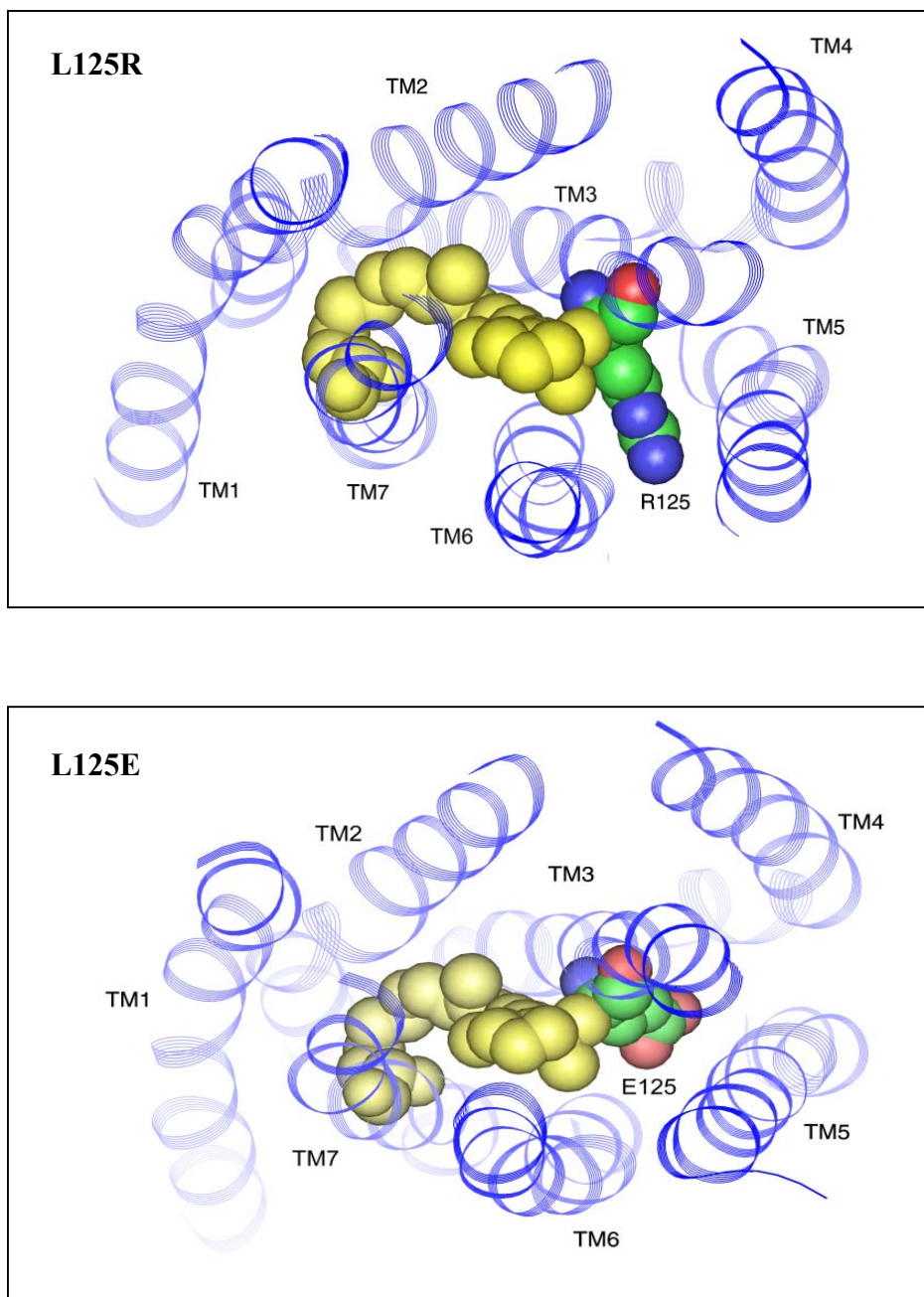


Figura 49. Modelització molecular realitzada amb el programa *Insight* per Francesc Corcho (Departament d'Enginyeria Química, UPC) on es mostra la mutació L125R (residu voluminós i carregat; no uneix retinal) associada a RP, en l'hèlix III transmembranal de la rodopsina. A la part inferior es presenta el mutant L125E caracteritzat en aquest treball.

V.3. BIOLOGIA MOLECULAR I PERSPECTIVES TERAPEUTIQUES DE LA RP

La caracterització de les proteïnes amb mutacions associades a RP així com l'anàlisi detallat de diferents mutacions en una posició associada a la malaltia ens ha permès aportar informació precisa sobre l'estructura, el mecanisme d'activació del receptor i la seva funcionalitat, en els individus afectats. Totes aquestes aproximacions estructurals permeten definir les bases moleculars que provoquen els processos degeneratius de la retina en la RP.

Tot i les dificultats inherents a l'estudi de qualsevol enfermetat genètica degenerativa, mes grans en el cas de la RP degut a la seva gran heterogeneïtat, diferents grups de recerca de diferents països estan treballant amb diferents aproximacions terapèutiques amb l'esperança d'obtenir solucions a curt termini.

Algunes d'aquestes línies de recerca estan basades en la possibilitat d'actuar sobre els factors de transcripció que afecten a la síntesi de la rodopsina (factor NRL) o a altres gens que s'expressen en les cèl·lules fotoreceptores (factor CRX). Altres, estan desenvolupant tècniques com l'alliberament de gens potencialment terapèutics en els teixits de la retina, emprant vectors vírics o ribozimes, que actuen com a agents supressors de productes de la transcripció mutats.

Una altra aproximació terapèutica seria a nivell de modulació d'un dels efectes secundaris associats amb la patologia: l'apoptosis (mort cel·lular programada). Aquesta es, actualment, una de les línies d'investigació mes engrescadores degut a que hi ha dades experimentals que demostren que diferents factors de creixement (NGF, BDNF, CNTF i altres) augmenten la supervivència de les cèl·lules fotoreceptores. També, en aquest sentit hi ha estudis que demostren com la inhibició de factors claus desencadenants de l'apoptosi (com son les serin proteases de la família de les caspases), o factors anti-apoptòtics (com el gen p53 de baculovirus) generen una protecció envers l'apoptosi de les cèl·lules fotoreceptores.

Posiblement, una estratègia terapèutica òptima podria ser la combinació d'una teràpia sobre la lesió a nivell genètic primari i una altre a nivell de reprogramació del procés cel·lular, de manera que es minimitzessin les patologies secundàries (com l'apoptosi) produïdes per l'alteració genètica.

Al nostre entendre qualsevol pretensió terapèutica actual o futura haurà de partir d'un coneixement molecular exhaustiu del procés de fototransducció visual i d'altres processos bioquímics associats que tenen lloc en el epiteli pigmentari. Creiem que el treball fet en aquesta tesi es un exemple de com, utilitzant tècniques de biologia molecular *in vitro*, es pot obtenir informació rellevant que és necessària per desenvolupar moltes de les línies d'investigació –mes aplicada- que anteriorment s'han descrit.

VI. CONCLUSIONS

1. S'ha posat a punt la metodologia requerida de mutagènesi dirigida per a la construcció de mutants puntuals en el gen de l'opsina bovina.
2. S'han aconseguit expressar i obtenir rodopsines recombinants en membranes de cèl·lules COS-1. Les proteïnes, solubilitzades en DM, s'han purificat per cromatografia d'afinitat utilitzant l'anticòs monoclonal Rho 1D4. La rodopsina recombinant WT obtinguda presenta característiques electroforètiques, espectrals i funcionals anàlogues a la rodopsina purificada de ROS.
3. Els mutants en la posició 125 presenten un nivell d'expressió inferior al WT (entre el 95% i el 5%) i en general una disminució en la capacitat d'unió de retinal, més acusada per als mutants L125W, L125Y, L125E, L125P i L125D. Així mateix el màxim d'absorbància està desplaçat entre 3-8 nm. Aquests resultats indicarien que la Leu125 es troba a una localització pròxima al retinal.
4. Les mutacions a la posició 125 produeixen modificacions en la conformació de la proteïna en l'estat inactiu (fosc) provocant un augment en la reactivitat a la hidroxilamina respecte a la proteïna WT; sobretot en els mutants L125P, L125Y i L125W, a més d'una disminució de l'estabilitat tèrmica d'entre el 30-5% respecte la proteïna salvatge. Això indicaria que aquestes mutacions produeixen una conformació inactiva més inestable i menys compacta amb un major grau d'accessibilitat a la base de Schiff.
5. L'activació de la transducina es veu reduïda en augmentar la grandària del residu introduït, en especial en les substitucions L125Y i L125W que presenten una reducció del 50 % i 80% respectivament en la seva capacitat d'activar la transducina.

6. Així doncs, el conjunt de resultats obtinguts en caracterització dels mutants en la posició 125 indiquen que aquest residu és clau per mantenir l'estructura de la butxaca d'unió del cromòfor. Aquest posició afecta, a més de l'estructura, la senyalització del receptor degut a que modifica la conformació òptima de la butxaca d'unió del cromòfor en l'entorn de l'anell de β -ionona.
7. El mutant M44T presenta la mateixa capacitat de regenerar amb 11-*cis*-retinal i activa més la Gt que la proteïna WT. Aquesta mutació genera molt probablement un espai buit que pot ser ocupat per una molècula d'aigua i que pot pertorbar l'entorn hidrofòbic del retinal, afavorint la desprotonació de la base de Schiff quan s'il·lumina. En conseqüència, si la desprotonació de la base de Schiff es més ràpida, la capacitat d'aquest mutant d'interaccionar amb la proteïna Gt es pot veure incrementada.
8. Les mutacions transmembranals G114D, P171Q, H211R i la mutació intradiscal G106W s'expressen a un nivell molt baix i no uneixen retinal. Les mutacions modifiquen l'estructuració de les hèlixs corresponents i dificulten la formació del pont disulfur entre les Cys110 i Cys187, impedit la correcta formació de la butxaca d'unió del retinal. Degut al mal plegament són segurament retingudes i degradades en el reticle endoplasmàtic.
9. La mutació R135L localitzada a l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix III de la rodopsina presenta una regeneració amb cromòfor inferior, major reactivitat amb hidroxilamina i més inestabilitat a 55°C. Aquesta mutació redueix també la capacitat d'interaccionar amb transducina ja que pot trencar el pont salí existent entre el Glu134 i la Arg135, requerit per mantenir la rodopsina en la seva forma inactiva. La neutralització de l'Arg135 implicada en la interacció amb la Gt, provoca una alteració de la transducció de senyal. El triplet DRY (altament conservat en la família de GPCR) té un paper clau en el funcionament correcte de la rodopsina en el procés de transducció de senyal.

10. El mutant V137M, localitzat al costat citoplasmàtic de l'hèlix III de la rodopsina, presenta una activació de transducina superior a la de la proteïna WT, possiblement degut a que aquesta mutació modifica la conformació del *patch* hidrofòbic de valines conservat en l'estructura dels GPCR's, provocant un canvi estèric al costat citoplasmàtic que afavoreix la interacció dels residus 134-135 del triplet DRY amb la Gt.
11. Les mutacions L328P i A346P, localitzades a l'extrem C-terminal de la rodopsina, presenten una regeneració similar a la proteïna WT. En el cas de la proteïna L328P s'ha observat un lleuger increment de l'activació de transducina, degut a que la mutació afavoreix l'accessibilitat dels *loops* citoplasmàtics que interaccionen amb la Gt. En aquestes mutacions, el transport cap a la membrana plasmàtica pot estar alterat.
12. Les alteracions descrites en l'estructura i funcionament de les proteïnes mutades serien la causa del funcionament anòmal de la cèl·lula fotoreceptora. Les proteïnes mutades a la membrana poden donar lloc a una estructuració anormal dels discs. Aquesta estructura anormal de la membrana plasmàtica pot impedir el bescanvi de cèl·lules fotoreceptores ja que no són reconegudes pel sistema de degradació específic cel·lular, produint acumulacions que portarien a la degeneració de la retina i a la manifestació clínica de la RP.

VII. BIBLIOGRAFIA

Alkorta, I. & Du, P. *Sequence divergence analysis for the prediction of seven-helix membrane protein structures: II. A 3-D model of human rhodopsin*. Protein Eng, 1994. **7**, 1231-1238.

Andres, A., Kosoy, A., Garriga, P. & Manyosa, J. *Mutations at position 125 in transmembrane helix III of rhodopsin affect the structure and signalling of the receptor*. Eur J Biochem, 2001. **268**, 5696-704.

Antinolo, G., Sanchez, B., Borrego, S., Rueda, T., Chaparro, P. & Cabeza, J. C. *Identification of a new mutation at codon 171 of rhodopsin gene causing autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum Mol Genet, 1994. **3**, 1421.

Aton, B. R., Litman, B. J., & Jackson, M. L., *Isolation and identification of the phosphorylated species of rhodopsin*. Biochemistry, 1984. **23**, 1737-1741.

Ayuso, C., Trujillo, M. J., Robledo, M., Ramos, C., Benitez, J., Martin-Oses, F., del Rio, T. & Garcia-Sandoval, B. *Novel rhodopsin mutation in an autosomal dominant retinitis pigmentosa family: phenotypic variation in both heterozygote and homozygote Val137Met mutant patients*. Hum Genet, 1996. **98**, 51-54.

Ballesteros, J., Kitanovic, S., Guarnieri, F., Davies, P., Fromme, B. J., Konvicka, K., Chi, L., Millar, R. P., Davidson, J. S., Weinstein, H. & Sealfon, S. C. *Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**, 10445-10453.

Bayes, M., Martinez-Mir, A., Valverde, D., del Rio, E., Vilageliu, L., Grinberg, D., Balcells, S., Ayuso, C., Baiget, M. & Gonzalez-Duarte, R. *Autosomal recessive retinitis pigmentosa in Spain: evaluation of four genes and two loci involved in the disease*. Clin Genet, 1996. **50**, 380-387.

Bikker, J.A., Trumpp-Kallmeyer, S. & Humblet, C. *G-Protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design*. J Med Chem, 1998. **41**, 2911-2927.

Birge, R. R., Murray, L. P., Pierce, B. M., Akita, H., Balogh-Nair, V., Findsen, L. A. & Nakanishi, K. *Two-photon spectroscopy of locked-11-cis-rhodopsin: evidence for a protonated Schiff base in a neutral protein binding site*. Proc Natl Acad Sci USA, 1985. **82**, 4117-4121.

Blum, H., Beire, H. & Gross, H. G. *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1987. **8**, 93-99.

Borrego, S., Sanchez, B., Ruiz, A. & Antinolo, G. *Missense mutation A346P in the rhodopsin gene in one family with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum Mutat, 1996. **7**, 180-181.

- Boughman, J. A., Conneally, P. M. & Nance, W. E., *Population genetic studies of retinitis pigmentosa*. Am J Hum Genet, 1980. **32**, 223-235.
- Bownds, D., *Site of attachment of retinal in rhodopsin*. Nature, 1967. **216**, 1178-1181.
- Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**, 248-254.
- Chan, T., Lee, M. & Sakmar, T.P. *Introduction of hydroxyl-bearing amino acids causes bathochromic spectral shifts in rhodopsin. Amino acid substitutions responsible for red-green color pigment spectral tuning*. J Biol Chem, 1992. **267**, 9478-9480.
- Dohlman, H.G., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. *Structure and function of the beta 2-adrenergic receptor--homology with rhodopsin*. Kidney Int Suppl, 1987. **23**, S2-13.
- Dryja, T. P., & Li, T. *Molecular genetics of retinitis pigmentosa*. Hum Mol Genet, 1995. **4**, 1739-1743.
- Dryja, T. P., McGee, T. L., Reichel, E., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Yandell, D. W., Sandberg, M. A. & Berson, E. L. *A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentos.*, Nature, 1990a. **343**, 364-366.
- Dryja, T. P., Hahn, L. B., Cowley, G. S., McGee, T. L. & Berson, E. L. *Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**, 9370-9374.
- Dryja, T. P., McGee, T. L., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Olsson, J. E., Reichel, E., Sandberg, M. A. & Berson, E. L. *Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. N Engl J Med, 1990b. **323**, 1302-1307.
- Ferretti, L., Karnik, S. S., Khorana, H. G., Nassal, M. & Oprian, D. D. *Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986. **83**, 599-603.
- Filizola, M., Perez, J. J., & Carteni-Farina, M. *BUNDLE: a program for building the transmembrane domains of G-protein-coupled receptors*. J Comput Aided Mol Des, 1998. **12**, 111-118.
- Franke, R. R., Sakmar, T. P., Oprian, D. D. & Khorana, H. G. *A single amino acid substitution in rhodopsin (lysine 248----leucine) prevents activation of transducin*. J Biol Chem, 1988. **263**, 2119-2122.

- Franke, R. R., Konig, B., Sakmar, T. P., Khorana, H. G. & Hofmann, K. P. *Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin*. Science, 1990. **250**, 123-125.
- Fukuda, M.N., Papermaster, D. S. & Hargrave, P. A. *Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH2 terminus*. J Biol Chem, 1979. **254**, 8201-8207.
- Garcia-Quintana, D., Garriga, P. & Manyosa, J. *Quantitative characterization of the structure of rhodopsin in disc membrane by means of Fourier transform infrared spectroscopy*. J Biol Chem, 1993. **268**, 2403-2409.
- Garriga, P., Liu, X. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in point mutants at and in proximity to the site of the retinitis pigmentosa mutation Leu-125-->Arg in the transmembrane helix C*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**, 4560-4564.
- Gregory-Evans, K. & Weleber, R. G. *An eye for an eye: new models of genetic ocular disease*. Nat Biotechnol, 1997. **15**, 947-948.
- Haim M. *Prevalence of retinitis pigmentosa and allied disorders in Denmark. II. Systemic involvement and age at onset*. Acta Ophthalmol (Copenh). 1992. **70**, 417-426.
- Hamm, H. E., *How activated receptors couple to G proteins*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**, 4819-4821.
- Han, M., Lin, S. W., Minkova, M., Smith, S. O. & Sakmar, T. P. *Functional interaction of transmembrane helices 3 and 6 in rhodopsin. Replacement of phenylalanine 261 by alanine causes reversion of phenotype of a glycine 121 replacement mutant*. J Biol Chem, 1996a. **271**, 32337-32342.
- Han, M., Lin, S. W., Smith, S. O. & Sakmar, T. P. *The effects of amino acid replacements of glycine 121 on transmembrane helix 3 of rhodopsin*. J Biol Chem, 1996b. **271**, 32330-32336.
- Hargrave, P. A. & McDowell, J. H. *Rhodopsin and phototransduction*. Int Rev Cytol, 1992. **137B**, 49-97.
- Hargrave, P. A. & McDowell J. H. *Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors*. Faseb J, 1992. **6**, 2323-2331.
- Haw, J., Reeves, P. J., Klein-Seetharaman, J., Davidson, F. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: further elucidation of the role of the intradiscal cysteines, Cys-110, -185, and -187, in rhodopsin folding and function*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**, 1932-1935.

- Heckenlively, J. R., Rodriguez, J. A. & Daiger, S. P. *Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**, 84-91.
- Humphries, P., Farrar, G. J., Kenna, P. & McWilliam, P. *Retinitis pigmentosa: genetic mapping in X-linked and autosomal forms of the disease*. Clin Genet, 1990. **38**, 1-13.
- Hwa, J., Garriga, P., Liu, X. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: packing of the helices in the transmembrane domain and folding to a tertiary structure in the intradiscal domain are coupled*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**, 10571-10576.
- Inglehearn, C. F., Keen, T. J., Bashir, R., Jay, M., Fitzke, F., Bird, A. C., Crombie, A. & Bhattacharya, S. *A completed screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum Mol Genet, 1992. **1**, 41-45.
- Inglehearn, C. F., Tarttelin, E. E., Plant, C., Peacock, R. E., al-Magthteh, M., Vithana, E., Bird, A. C. & Bhattacharya, S. S. *A linkage survey of 20 dominant retinitis pigmentosa families: frequencies of the nine known loci and evidence for further heterogeneity*. J Med Genet, 1998. **35**, 1-5.
- Jager, F., Jager, S., Krutle, O., Friedman, N., Sheves, M., Hofmann, K. P. & Siebert, F. *Interactions of the beta-ionone ring with the protein in the visual pigment rhodopsin control the activation mechanism. An FTIR and fluorescence study on artificial vertebrate rhodopsins*. Biochemistry, 1994. **33**, 7389-97.
- Karnik, S. S. & Khorana, H. G. *Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187*. J Biol Chem, 1990. **265**, 17520-17524.
- Karnik, S. S., Sakmar, T. P., Chen, H. B. & Khorana, H. G. *Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988. **85**, 8459-8463.
- Kaushal, S. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Biochemistry, 1994. **33**, 6121-6128.
- Kaushal, S., Ridge, K. D. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**, 4024-4028.
- Khorana, H. G., *Rhodopsin, photoreceptor of the rod cell. An emerging pattern for structure and function*. J Biol Chem, 1992. **267**, 1-4.
- Krebs, W. & Kuhn, H. *Structure of isolated bovine rod outer segment membranes*. Exp Eye Res, 1977. **25**, 511-26.

Kuhn, H., *Early steps in the light-triggered activation of the cyclic GMP enzymatic pathway in rod photoreceptors*. Prog Clin Biol Res, 1984. **164**, 303-311.

Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**, 680-685.

Liang, C. J., Yamashita, K., Muellenberg, C. G., Shichi, H. & Kobata, A. *Structure of the carbohydrate moieties of bovine rhodopsin*. J Biol Chem, 1979. **254**, 6414-6418.

Liu, X., Garriga, P. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: correct folding and misfolding in two point mutants in intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**, 4554-4559.

Lynnes, A., Ernst, W., Quinlan, M., Glover, G., Arden, G. & Carter, R. M. *A clinical, physiological and electroretinographic survey of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Br J Ophthalmol, 1985. **69**, 326-339.

Marmor, M. F., Yao, X. Y. & Hageman, G. S. *Retinal adhesiveness in surgically enucleated human eyes*. Retina. 1994; **14**, 181-186.

Massof, R. W. & Finkelstein, D. *Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa*. Doc Ophthalmol, 1981. **51**, 289-346.

McInnes, R. R. & Bascom, R.A. *Retinal genetics: a nullifying effect for rhodopsin*. Nat Genet, 1992. **1**, 155-157.

Michel-Villaz, M., Saibil, H. R. & Chabre, M. *Orientation of rhodopsin alpha-helices in retinal rod outer segment membranes studied by infrared linear dichroism*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**, 4405-4408.

Millan, J. M., Fuchs, S., Paricio, N., Wedemann, H., Gal, A., Najera, C. & Prieto, F. *Gly114Asp mutation of rhodopsin in autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Mol Cell Probes, 1995. **9**, 67-69.

Min, K. C., Zvyaga, T. A., Cypess, A. M. & Sakmar, T. P. *Characterization of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mutations on the cytoplasmic surface affect transducin activation*. J Biol Chem, 1993. **268**, 9400-9404.

Mitchell, D. C., Kibelbek, J. & Litman, B. J. *Effect of phosphorylation on receptor conformation: the metarhodopsin I in equilibrium with metarhodopsin II equilibrium in multiply phosphorylated rhodopsin*. Biochemistry, 1992. **31**, 8107-8111.

Nakamachi, Y., Nakamura, M., Fujii, S., Yamamoto, M. & Okubo, K. *Oguchi disease with sectoral retinitis pigmentosa harboring adenine deletion at position 1147 in the arrestin gene*. Am J Ophthalmol, 1998. **125**, 249-251.

- Nathans, J. & Hogness, D. S. *Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1984. **81**, 4851-4855.
- Nathans, J., *Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene Schiff's base counterion in bovine rhodopsin*. Biochemistry, 1990. **29**, 9746-9752.
- Nathans, J., *Protein-chromophore interactions in rhodopsin studied by site-directed mutagenesis*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1990. **55**, 621-633.
- Oprian, D. D., Molday, R. S., Kaufman, R. J. & Khorana, H. G. *Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. **84**, 8874-8878.
- Osborne, H. B. & Navedryk-Viala, E. *The conformation of membrane-bound and detergent-solubilised bovine rhodopsin. A comparative hydrogen-isotope exchange study*. Eur J Biochem, 1978. **89**, 81-88.
- Ovchinnikov Yu, A., Abdulaev, N. G. & Bogachuk, A. S. *Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated*. FEBS Lett, 1988. **230**, 1-5.
- Ovchinnikov Yu, A., *Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships*. FEBS Lett, 1982. **148**, 179-191.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 2000, **289**, 739-745.
- Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J. & Adler, R. *Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**, 974-978.
- Reeves, P. J., Hwa, J. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin: kinetic studies of retinal binding to purified opsin mutants in defined phospholipid-detergent mixtures serve as probes of the retinal binding pocket*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**, 1927-1931.
- Reig, C., Llecha, N., Antich, J., Gean, E., Tejada, I., Molina, M., Reventos, J. & Carballo, M. *A missense mutation (211His-->Arg) and a silent (160Thr) mutation within the rhodopsin gene in a spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa family*. Hum Mol Genet, 1994. **3**, 195-196.
- Reig, C., Antich, J., Gean, E., Garcia-Sandoval, B., Ramos, C., Ayuso, C. & Carballo, M. *Identification of a novel rhodopsin mutation (Met-44-Thr) in a simplex case of retinitis pigmentosa*. Hum Genet., 1994. **94**, 283-286.

- Reig, C., Antich, J., Gean, E., Dante Heredia, C., Valverde, D., Baiget, M. & Carballo, M. *Identification of Arg-135-Leu mutation in the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Med Clin (Barc), 1996. **106**, 219-221.
- Reme, C. E., Wolfrum, U., Imsand, C., Hafezi, F. & Williams, T. P. *Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**, 2398-2404.
- Ridge, K., Lu, Z., Liu, X. & Khorana, H. G. *Structure and function in rhodopsin. Separation and characterization of the correctly folded and misfolded opsins produced on expression of an opsin mutant gene containing only the native intradiscal cysteine codons*. Biochemistry, 1995. **34**, 3261-3267.
- Ridge, K. D., Zhang, C. & Khorana, H. G. *Mapping of the amino acids in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin. Chemical reactivity in the dark state following single cysteine replacements*. Biochemistry, 1995. **34**, 8804-8811.
- Saibil, H., Chabre, M. & Worcester, D. *Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes*. Nature, 1976. **262**, 266-270.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R. & Khorana, H. G. *The role of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin in determining wavelength absorbance and Schiff base pKa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**, 3079-3083.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R. & Khorana, H. G. *Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989. **86**, 8309-8313.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R. & H.G. Khorana, H. G. *The role of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin in determining wavelength absorbance and Schiff base pKa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**, 3079-3083.
- Sakmar, T. P. *Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **59**, 1-34.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA, 1977. **74**, 5463-5467.
- Sardet, C., Tardieu, A. & Luzzati, V. *Shape and size of bovine rhodopsin: a small-angle x-ray scattering study of a rhodopsin-detergent complex*. J Mol Biol, 1976. **105**, 383-407.
- Shichi, H. & Somers, R. L. *Possible involvement of retinylidene phospholipid in photoisomerization of all-trans-retinal to 11-cis-retinal*. J Biol Chem, 1974. **249**, 6570-6577.

- Shichida, Y. & Imai, H. *Amino acid residues controlling the properties and functions of rod and cone visual pigments*. Novartis Found Symp, 1999. **224**, 142-153.
- Sung, C. H., Davenport, C. M. & Nathans, J. *Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain*. J Biol Chem, 1993. **268**, 26645-26649.
- Sung, C. H., Makino, C., Baylor, D., Nathans, J. *A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment*. J Neurosci, 1994. **14**, 5818-5833.
- Sung, C. H., Schneider, B. G., Agarwal, N., Papermaster, D. S. & Nathans, J. *Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**, 8840-8844.
- Sung, C. H., Davenport, C. M., Hennessey, J. C., Maumenee, I. H., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Nowakowski, R., Fishman, G., Gouras, P. & Nathans, J. *Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**, 6481-6485.
- Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K. & Stenkamp, R. E. *Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)*. Biochemistry, 2001. **40**, 7761-7772.
- Thompson, P. & Findlay, J. B. *Phosphorylation of ovine rhodopsin. Identification of the phosphorylated sites*. Biochem J, 1984. **220**, 773-780.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci USA. 1979. **76**, 4350-4354.
- Travis, G. H., *Insights from a lost visual pigment*. Nat Genet, 1997. **15**, 115-117.
- Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M. & Schertler, G. F. *Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices*. Nature, 1997. **389**, 203-206.
- Wald, G. & Brown, P. *The molar extinction of rhodopsin*. J. Gen. Physiol, 1935. **37**, 189-200.
- Weitz, C. J. & Nathans, J. *Histidine residues regulate the transition of photoexcited rhodopsin to its active conformation, metarhodopsin II*. Neuron, 1992. **8**, 465-472.
- Weitz, C. J. & Nathans, J. *Rhodopsin activation: effects on the metarhodopsin I-metarhodopsin II equilibrium of neutralization or introduction of charged amino acids within putative transmembrane segments*. Biochemistry, 1993. **32**, 14176-14182.

Weleber, R. G.. *Stargardt's macular dystrophy*. Arch Ophthalmol, 1994. **112**, 752-754.

Weleber, R.G. & Murphey, W. H. *Molecular advances in retinitis pigmentosa*. West J Med, 1991. **155**, 423-424.

Wilden, U. & Kuhn, H. *Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites*. Biochemistry, 1982. **21**, 3014-3022.

Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. & Kuhn, H. *Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin*. FEBS Lett, 1986. **207**, 292-295.