
Índex

ÍNDEX	i-iv
ABREVIATURES	v-vi
RESUM/SUMMARY	vii-x
I. INTRODUCCIÓ	1-50
I.1.El receptor visual: La rodopsina	3
I.1.1. Receptors acoblats a proteïna G	3
I.1.1.1. Característiques estructurals	4
I.1.1.2. Mecanisme d'activació i transducció de la senyal	5
I.1.2. Receptor rodopsina	6
I.1.2.1. Característiques generals	6
I.1.2.2. Localització	7
I.1.2.3. Característiques estructurals de la rodopsina	9
I.1.2.4. Fotointermediaris d'activació	18
I.1.2.5. Mecanisme d'activació de la rodopsina	21
I.1.2.6. Mecanisme de transducció de senyal	23
I.1.2.7. Cicle visual dels retinoides	24
I.1.2.8. Propietats espectroscòpiques de la rodopsina	26
I.1.2.9. Malalties de la retina associades a mutacions en la rodopsina	28
I.2. New prospects for drug discovery (IV)	33
I.2.1. Structural and functional aspects relevant to drug design	35
I.2.2. Novel drug design	42
I.2.2.1. Ligand-based drug design	42
I.2.2.2. Structure-based drug design	43
I.2.2.3. Molecular modeling of GPCR	44
I.2.2.4. Future prospects	48

II. OBJECTIUS	51-56
III. MATERIALS I MÈTODES	57-74
III.1. Obtenció de proteïnes natives	59
III.1.1. Obtenció de rodopsina a partir de retines bovines	59
III.1.2. Extracció de transducina a partir de retines bovines	60
III.2. Esquema general dels mètodes utilitzats per a l'obtenció de rodopsina recombinant	61
III.3. Vector pMT4 i gen de l'opsina	61
III.4. Tècniques d'ADN recombinant per a l'obtenció de mutants	62
III.5. Purificació d'ADN plasmídic	64
III.6. Expressió de la proteïna opsina	64
III.7. Purificació de rodopsina recombinant	65
III.8. Tècniques espectroscòpiques per a la caracterització de la rodopsina	66
III.8.1. Espectroscòpia UV-visible	66
III.8.1.1. Formació de cromòfor, comportament en front l'acidificació i la il·luminació	66
III.8.1.2. Reactivitat en front la hidroxilamina	67
III.8.1.3. Estabilitat tèrmica de les proteïnes recombinants	68
III.8.1.4. Estabilitat de la base de Schiff	68
III.8.1.5. Regeneració de la rodopsina	69
III.8.2. Espectroscòpia de fluorescència	69
III.8.2.1. Assaig d'activació de transducina mitjançant espectroscòpia de fluorescència	70
III.8.2.2. Estabilitat de la conformació activa MetaII per espectroscòpia de Fluorescència	71
III.8.3. Espectroscòpia d'infraroig	72
III.9. Tècnica de radioactivitat per l'assaig d'activació de transducina	74
IV. RESULTATS	75-146
IV.1. Structural and functional role of helices I and II in rhodopsin (I)	77

IV.1.1. Novel interplay evidenced by mutations at Gly-51 and Gly-89	77
IV.1.2. Expression and characterization of mutations at position 51 in helix I	79
IV.1.3. Expression and characterization of mutations at position 89 in helix II	83
IV.1.4. Discusion	85
IV.2. Mutants d'adRP i alteracions en el procés de fotoactivació	91
IV.2.1. Mutants G51V i G89D i alteracions en el procés de fotoactivació	91
IV.2.2. Caracterització dels fotointermediaris alterats d'activació dels mutants G51V i G89D	93
IV.2.3. Caracterització dels mutants G51V/E134Q i G51V/V300G	96
IV.2.4. Discussió	104
IV.3. Methylation at C7 of 11- <i>cis</i> -retinal affects rhodopsin activation (VI)	109
IV.3.1. 11- <i>cis</i> -retinal chromophore and artificial visual pigments	109
IV.3.2. Ros rhodopsin regeneration with 11- <i>cis</i> -7-methylretinal	111
IV.3.3. Expression and characterization of 7-methyl-rho	112
IV.3.4. G protein activation	117
IV.3.5. Molecular modelling	118
IV.3.6. Role of Met207 in the conformational change upon rhodopsin activation	121
IV.4. Mutants rodopsina-M3 muscarínic i especificitat de reconeixement de proteïna G	123
IV.4.1. Aminoàcids que determinen l'especificitat en el reconeixement de proteïna G	123
IV.4.2. Mutants rodopsina-M3 muscarínic	125
IV.4.2.1. Mutants rodopsina-M3 muscarínic de la nansa C-II	127
IV.4.2.2. Mutants rodopsina-M3 muscarínic de la nansa C-III	131
IV.4.2.3. Mutants conjugats rodopsina-M3 de les nanses C-II i C-III	135
IV.4.3. Activació de proteïna G	136
IV.4.3.1. Activació de transducina	136
IV.4.3.2. Activació de proteïna G _q	141
IV.4.4. Discussió	144

V. DISCUSSIÓ GENERAL	147-158
VI. CONCLUSIONS	159-164
VII. BIBLIOGRAFIA	165-188
ANNEX	189-192
AGRAÏMENTS	193-198