

Objectius

II

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat l'estudi del mecanisme molecular d'activació de la rodopsina i la seva interacció amb la transducina. Per tal d'assolir aquest objectiu, s'ha analitzat el paper estructural i funcional de les hèlices I i II de la rodopsina, així com el paper del retinal en el procés de fotoactivació del receptor. Per altra banda, també s'ha abordat la tasca de determinar quins aminoàcids poden estar implicats en l'especificitat de reconeixement de proteïna G. Aquests objectius genèrics s'han concretat en els següents objectius específics:

- I. **Esbrinar el paper de les Gly, en les hèlices I i II, en l'estructura i funció de la rodopsina. En particular, determinar aquest paper en relació a la malaltia degenerativa de la retina Retinosi Pigmentària causada per mutacions en aquestes glicines. Aquest objectiu s'han portat a terme en tres fases experimentals que han implicat:**
 - I.1. Expressió i caracterització dels mutants d'adRP G51A i G51V en l'hèlix I i G89D en l'hèlix II de la rodopsina, així com també altres mutants no naturals en aquestes posicions, per tal d'explorar la influència del canvi en la mida i en la càrrega de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït.
 - I.2. Caracterització dels fotointermediaris alterats d'activació que es formen en el procés de fotoactivació dels mutants G89D i G51V amb la finalitat de conèixer el conjunt de processos bioquímics que condueixen en darrer terme a la degeneració de la retina en l'adRP.

I.3. Determinació de la influència de les mutacions G51V i G89D en l'equilibri entre el fotointermediari Metarodopsina I i l'estat actiu Metarodopsina II, pas clau en el procés de fotoactivació del receptor.

II. Analitzar la influència de la introducció d'un grup metil en el C7 del retinal en l'estructura i funció de la rodopsina, per obtenir informació detallada del procés d'interacció entre l'opsina i el retinal. En particular, s'ha estudiat com afecta la presència d'un grup metil en la posició 7 del retinal sintètic 11-*cis*-7-metilretinal en les distintes conformacions de la rodopsina, tant en l'estat fonamental com en l'estat actiu del receptor. La consecució d'aquest objectiu ha implicat les següents fases experimentals:

II.1. Expressió i regeneració de la rodopsina amb l'11-*cis*-7-metilretinal per tal de determinar la influència de la introducció d'un grup metil en el C7 del retinal en la formació de cromòfor.

II.2. Caracterització de la forma inactiva dels receptors regenerats amb 11-*cis*-7-metilretinal i anàlisi del comportament d'aquests receptors en front la il·luminació.

II.3. Determinació de la funcionalitat dels receptors regenerats amb l'anàleg sintètic 11-*cis*-7-metilretinal.

III. Determinar quins aminoàcids de les nanses C-II i C-III es troben implicats en l'especificitat de reconeixement de la proteïna G per tal d'aprofundir en el mecanisme molecular d'activació dels receptors acoblats a proteïna G. En particular, s'han substituït alguns aminoàcids de les nanses C-II i C-III del fotoreceptor visual rodopsina pels aminoàcids corresponent del receptor muscarínic M3 humà, també pertanyent a la família A dels GPCRs. Això ha comportat:

III.1. Disseny i obtenció de mutants Rho-M3 (rodopsina-muscarínic M3) mitjançant l'intercanvi d'aminoàcids de les nanses C-II i C-III de la rodopsina pels aminoàcids corresponents del receptor muscarínic M3.

III.2. Expressió dels diferents mutants Rho-M3 en cèl·lules COS-1 i determinació de l'estabilitat de les conformacions inactives, de la reactivitat en front la hidroxilamina, de la capacitat de regeneració amb retinal i de l'estabilitat de la conformació activa d'aquests mutants.

III.3. Anàlisi de la funcionalitat dels receptors Rho-M3 tant per l'activació de transducina com per l'activació de proteïna $G_{q/11}$.