

Mutants Rodopsina-M3 Muscarínic i Especificitat de Reconeixement de Proteïna G

IV.4

IV.4.1. AMINOÀCIDS QUE DETERMINEN L'ESPECIFICITAT EN EL RECONeixEMENT DE PROTEÏNA G.

Els estudis del mecanisme molecular d'activació de la rodopsina, així com la seva interacció amb la proteïna G_t , són de gran interès per al coneixement de les bases moleculars del procés de fototransducció visual. S'ha descrit anteriorment que les nanses intracel·lulars C-II i C-III i el domini C-terminal de la proteïna participen en la interacció i activació de la proteïna G_t [Yamashita et al., 2000]. Un dels objectius que ens varem marcar inicialment va ser determinar els aminoàcids de les nanses C-II i C-III de la rodopsina implicats en la interacció i/o activació de la proteïna G_t , i per tant responsables de l'especificitat d'activació de la proteïna G_t , a partir de la substitució d'aquests aminoàcids pels aminoàcids homòlegs del receptor muscarínic M3 humà.

Els receptors muscarínics pertanyen a la superfamília de GPCRs, en concret a la subfamília A, a la qual també pertany la rodopsina. Aquests receptors es localitzen i realitzen la seva funció en el sistema nerviós parasimpàtic o colinèrgic. Els receptors muscarínics presenten un lloc d'unió a l'acetilcolina (neurotransmissor) en el domini TM, accessible des de la part extracel·lular del receptor. La unió d'aquest lligand indueix un canvi conformacional en el receptor que permet la unió, en el costat intracel·lular, de la proteïna G iniciant-se així la cascada de transducció del senyal [Tucek et al., 1998, Peralta et al., 1987]. Els receptors muscarínics es classifiquen en 5 subtipus que s'expressen de forma diferencial en els teixits. Els diferents subtipus es troben associats a diferents tipus de proteïnes G i a diferents sistemes de segon missatger. Els receptors muscarínics M1, M3 i M5 s'associen principalment a proteïnes G del tipus G_q/G_{11} que estimulen la hidròlisi de fosfoinositol mitjançant la fosfolipasa C, produint un increment de les concentracions dels segons

missatgers inositol trifosfat i diacilglicerol. Per altra banda, els receptors M2 i M4 estan associats principalment a proteïnes G_i/G_o que inhibeixen l'adenilat ciclase, provocant una disminució en la concentració d'AMPc. L'estudi d'aquests receptors és de gran interès ja que estan involucrats en el control de nombrosos processos fisiològics i patofisiològics com podrien ser l'Alzheimer i el Parkinson [Fodale et al., 2006; Piggott et al., 2003]. En concret, en aquest estudi treballarem amb el receptor muscarínic humà subtipus M3.

Diferents treballs portats a terme en el laboratori de J. Wess (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland USA) han permès la identificació dels dominis del receptor muscarínic M3 que participen en la determinació de l'especificitat d'unió a la proteïna $G_{q/11}$ [Kosteins et al., 1997; Blin et al., 1995; Liu et al., 1996b; Zeng et al., 1999]. Segons es descriu, la nansa C-II, els extrems N-terminal i C-terminal de la nansa C-III, i la regió proximal a la membrana del domini C-terminal del receptor participen en la interacció receptor-proteïna $G_{q/11}$. Aquests treballs demostren que el residu Tyr-254 del receptor M3 (N-terminal C-III) és essencial per a l'activació de proteïna $G_{q/11}$. Aquest residu es troba conservat en els receptors M1, M3 i M5 i és substituït per una Ser en els receptors M2 i M4. S'ha descrit, en el receptor muscarínic M3, que aquest aminoàcid, Tyr-254, conjuntament amb els aminoàcids Ala-488, Ala-489, Leu-492 i Ser-493 del C-terminal de la nansa C-III es troben interaccionant en l'estructura tridimensional, formant un lloc comú de reconeixement i d'unió a la proteïna $G_{q/11}$. Es descriu també que la substitució de la nansa C-II del receptor M2 per la nansa C-II del receptor M3 estimula la hidròlisi de fosfoinositol. Concretament, els 4 aminoàcids Ser-168, Arg-171, Arg-176 i Arg-183 de la nansa C-II del receptor M3 fan que el receptor tingui preferència per la proteïna $G_{q/11}$. Així doncs, els residus del receptor muscarínic M3 que jugarien un paper importants en l'activació de la proteïna $G_{q/11}$ serien els aminoàcids del triplet conservat DRY (165,166,167), Ser-168, Arg-171, Pro-172, Leu-173, Arg-176, Arg-183 de la nansa C-II, i els aminoàcids Tyr-254, Ala-488, Ala-489, Leu-492, Ser-493 de la nansa C-III.

Un altre estudi interessant, recentment publicat [Kim et al., 2005], prova la hipòtesi de l'existència d'un mecanisme comú d'activació pels GPCR. En l'estudi es varen construir diferents proteïnes quimèriques entre el receptor rodopsina i el receptor β_2 -adrenèrgic.

Aquestes quimeres conservaven l'estructura de la rodopsina, permetent la unió del cromòfor, però les nanses citoplasmàtiques del fotoreceptor varen ser intercanviades per les del receptor β_2 -adrenèrgic, amb la intenció que el receptor quimèric tingués la resposta específica del receptor adrenèrgic. Els resultats obtinguts en l'estudi mostraren que l'intercanvi de totes les nanses citoplasmàtiques afectava la formació de cromòfor i que la transducció del senyal depenia específicament de la longitud de les nanses intercanviades. La nansa C-III semblaria ser la més crítica i l'optimització d'aquest l'intercanvi els va permetre obtenir una quimera que presentava síntesi d'AMPC dependent de la llum.

IV.4.2. MUTANTS RODOPSINA-M3 MUSCARÍNIC.

Amb l'objectiu de canviar l'especificitat de reconeixement de la rodopsina activada, de la transducina a la proteïna G_q , es varen construir una sèrie de mutants en les nanses C-II i C-III de la rodopsina. Inicialment, es va realitzar un alineament de seqüència entre la rodopsina bovina i el receptor muscarínic M3 humà i es va determinar els aminoàcids a intercanviar entre ambdós receptors, tenint en compte els estudis fets prèviament (Figura IV.4.1) [Kosteins et al., 1997; Blin et al., 1995; Liu et al., 1996b; Zeng et al., 1999; Kim et al., 2005].

A

Nansa C-II

Rho	E	R	Y	V	V	C	K	P	M	S	N	F	R	F	G	E	N	-	-	H	
M3	D	R	Y	F	S	I	T	R	P	L	T	-	Y	R	A	K	R	T	T	K	R
M2	D	R	Y	F	C	V	T	K	P	L	T	-	Y	P	V	K	R	T	T	K	M

Nansa C-III

Rho	L	V	F	T	V	K	E	A	A	A	Q	Q	Q	E	S	A	T	T	Q	K	A	E	K	E	V	T	R	M	V	I
M3	I	Y	K	E	T	E	K	(-----)	I	K	E	K	K	A	A	Q	T	L	S											
M2	I	S	R	A	S	-	K	(-----)	S	R	E	K	K	V	T	R	T	I	L											

B

		340			345				350			
α_1 (340-350)		I	K	E	N	L	K	D	C	G	L	F
α_{12} (345-355)		I	K	N	N	L	K	D	C	G	L	F
α_q (343-353)		L	Q	L	N	L	K	E	Y	N	L	V

Figura IV.4.1. A. Seqüència aminoacídica de les nanses C-II i C-III dels receptors rodopsina, muscarínic M3 i muscarínic M2. Els aminoàcids que es varen intercanviar es troben emmarcats. B. Seqüència primària de l'extrem C-terminal de la subunitat α de la transducina i de les proteïnes G_i i G_q .

En la Figura IV.4.2. es mostra l'estructura secundària de la rodopsina amb els aminoàcids de les nanses C-II i C-III que es varen intercanviar pel aminoàcids corresponents del receptor muscarínic M3 (Figura IV.4.2.). En la nansa C-II de la rodopsina es varen introduir les mutacions V138S, K141R, R147A, H152R i V138S/K141R/H152R (VKH) i en la nansa C-III les mutacions introduïdes varen ser V227Y, V250A/T251A/V254L/I255S (AALS) i V227Y/AALS. Posteriorment, es varen construir els mutants conjugats de les nanses C-II i C-III V138S/V227Y/AALS (VVA) i V138S/K141R/V227Y/AALS (VKVA) amb la finalitat de determinar si aquests aminoàcids formen un lloc comú de reconeixement per a la proteïna G (Taula IV.4.1).

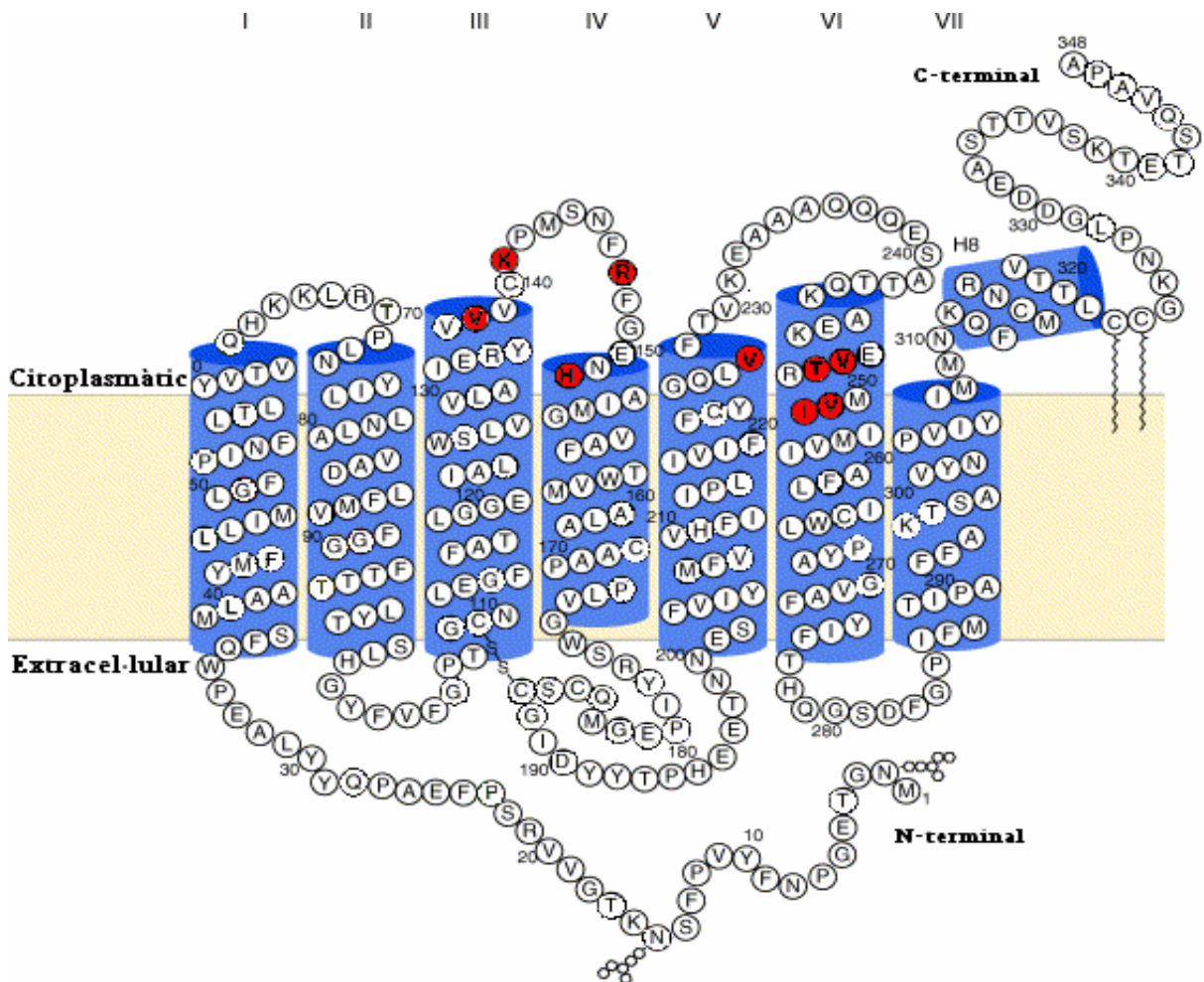


Figura IV.4.2. Estructura secundària de la rodopsina bovina. En vermell es mostren els aminoàcids de les nanses C-II i C-III que es varen intercanviar pels corresponents aminoàcids del receptor muscarínic M3 humà.

<i>Mutant</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Nansa</i>
V138S	V138S	C-II
K141R	K141R	C-II
R147A	R147A	C-II
H152R	H152R	C-II
V138S/K141R/H152R	VKH	C-II
V227Y	V227Y	C-III
V250A/T251A/V254L/I255S	AALS	C-III
V227Y/V250A/T251A/V254L/I255S	V227Y/AALS	C-III
V138S/V227Y/V250A/T251A/V254L/I255S	VVA	C-II, C-III
V138S/K141R/V227Y/V250A/T251A/V254L/I255S	VKVA	C-II, C-III

Taula IV.4.2.1. Mutants de l'estudi, abreviatura utilitzada per a cada mutant i localització en la proteïna rodopsina.

S'ha descrit anteriorment que l'extrem C-terminal de la subunitat α de la transducina (aminoàcids 340-350) interacciona amb les nanses C-II i C-III de la rodopsina fotoactivada [Acharya et al., 1997]. En concret l'aminoàcid Lys-341 seria fonamental per a l'interacció, així com els aminoàcids hidrofòbics Leu-344, Leu-349 i Phe-350 (Figura IV.4.1.B.) [Osawa et al. 1995; Garcia et al., 1995; Simonds et al., 1989; Dratz et al., 1993]. L'assaig d'activació de proteïna G_t i G_q s'ha fet utilitzant les tècniques d'espectroscòpia de fluorescència i radioactivitat. Per a l'assaig d'activació de transducina s'ha utilitzat la transducina purificada de retines bovines (vegeu *Materials i Mètodes*) i per tal de portar a terme l'assaig d'activació de proteïna G_q s'ha utilitzat una proteïna quimèrica $G_i\alpha_q$ que correspon a l'estructura de la subunitat α de la proteïna G_i però amb els últims 11 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la proteïna G_q . S'ha descrit que aquests aminoàcids determinen l'especificitat de reconeixement de la proteïna G pel receptor [Osawa et al. 1995; Garcia et al., 1995; Simonds et al., 1989; Dratz et al., 1993].

IV.4.2.1. MUTANTS RODOPSINA-M3 MUSCARÍNIC DE LA NANSA C-II.

Utilitzant la tècnica de mutagènesi de lloc dirigit es van construir els mutants de la nansa C-II; V138S, K141R, R147A, H152R i V138S/K141R/H152R (VKH). Les proteïnes mutades es varen expressar en cèl·lules COS-1 i posteriorment es varen purificar per cromatografia

d'immunoafinitat. Els espectres de les proteïnes regenerades amb 11-*cis*-retinal en foscor i els espectres obtinguts després de la il·luminació i acidificació ens mostren en la Figura IV.4.3.

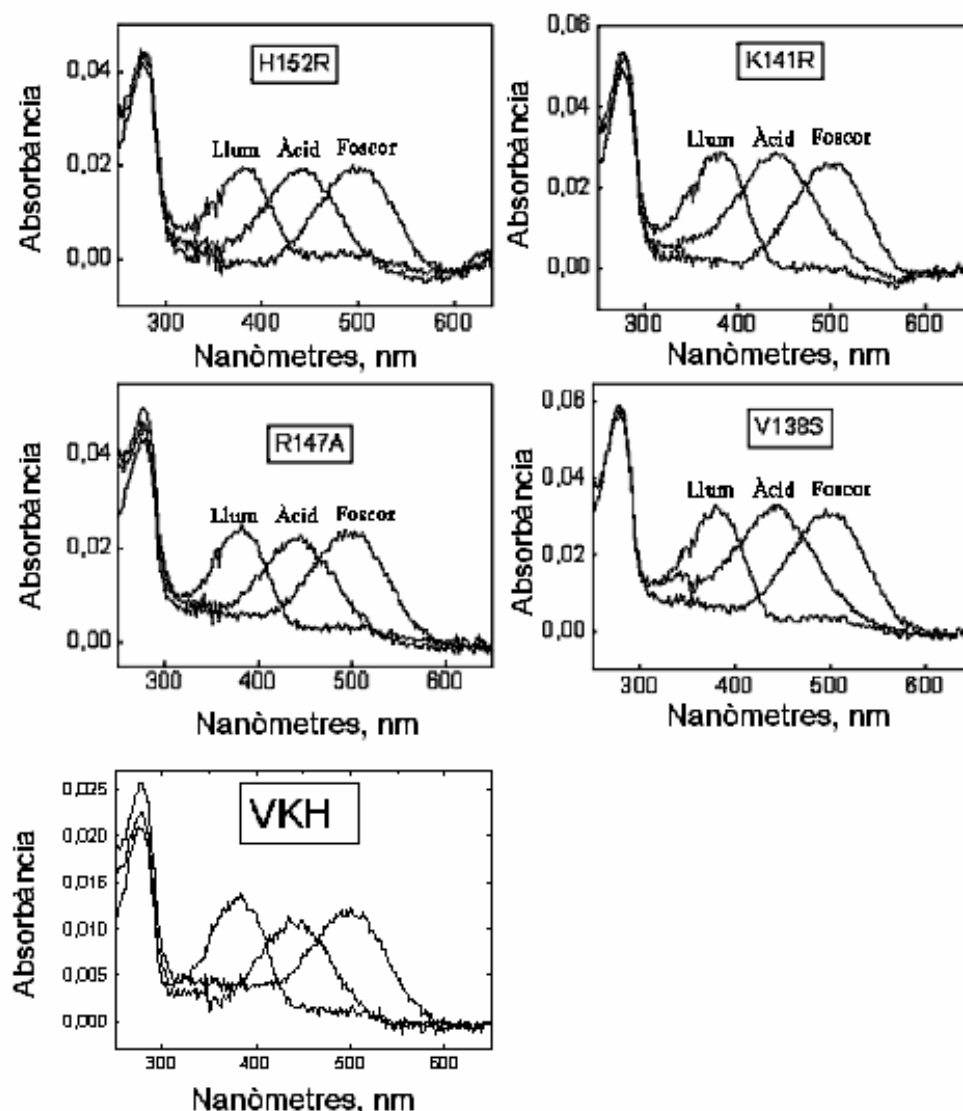


Figura IV.4.3. Espectres d'absorbància UV-visible dels mutants Rodopsina-M3 de la nansa C-II en foscor, després de la il·luminació i posterior acidificació de la mostra.

Els diferents mutants formen cromòfor i presenten el mateix comportament en front la il·luminació i acidificació que la proteïna Wt, suggerint que aquests mutants presenten la mateixa cascada de fotoactivació que el receptor Wt. El màxim d'absorció al UV-visible en foscor pels diferents mutants de la nansa C-II no difereix del màxim d'absorció de la conformació inactiva obtingut per la proteïna Wt, indicant que aquestes mutacions no introdueixen modificacions significatives en l'entorn del retinal (Taula IV.4.2).

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Longitud d'ona del màxim d'absorció</i>
WT	500nm
V138S	500nm
K141R	499nm
R147A	501nm
H152R	501nm
VKH	501nm

Taula IV.4.2. Màxims d'absorció a l'UV-visible pels mutants de la nansa C-II.

Estabilitat tèrmica a 55°C dels mutants de la nansa C-II

S'ha determinat l'estabilitat tèrmica de la conformació inactiva dels mutants a 55°C, per tal de determinar l'estabilitat del cromòfor de les proteïnes recombinants (Taula IV.4.3.).

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Estabilitat tèrmica relativa</i>
WT	1.00
V138S	1.18
K141R	1.09
R147A	1.33
H152R	1.27
VKH	0.79

Taula IV.4.3. Estabilitat tèrmica relativa dels diferents mutants de la nansa C-II respecte la proteïna Wt.

Els mutants de la nansa C-II, a excepció del mutant R147A, no presenten diferències en l'estabilitat relativa de la conformació inactiva a 55°C respecte a l'estabilitat de la forma inactiva del receptor Wt. Encara que el mutant H152R presenta un lleuger augment en l'estabilitat tèrmica (1.18) i el triple mutant VKH presenta una disminució en l'estabilitat de

la conformació inactiva (0.79) aquestes diferències no es poden considerar significatives, tenint en compte l'error experimental. En el cas del mutant R147A, aquest sí que presenta, un lleuger augment en l'estabilitat de la conformació inactiva a 55°C (1.33) comparat amb la proteïna Wt.

Reactivitat en front la hidroxilamina i estabilitat de la base de Schiff.

Les conformacions inactives dels mutants de la nansa C-II, igual que la conformació inactiva de la proteïna Wt, no presenten reactivitat en fosc en front la hidroxilamina (Taula IV.4.4.). Això ens indica que els mutants presenten una conformació compacte, en fosc, a l'entorn de la base de Schiff. Podem dir doncs, que aquestes mutacions en la nansa C-II no influeixen en la correcta formació de la butxaca d'unió al retinal.

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Reactivitat de la forma inactiva en front la hidroxilamina</i>	<i>Estabilitat relativa de la base de Schiff</i>
WT	No	1.00
V138S	No	0.96
K141R	No	0.56
R147A	No	1.21
H152R	No	0.77
VKH	No	N.D.

Taula IV.4.4. Reactivitat dels mutants de la nansa C-II en front la hidroxilamina i estabilitat relativa de la base de Schiff pels diferents mutants de la nansa C-II. (N.D: dada no disponible).

Per altra banda, també s'ha determinat l'estabilitat de la conformació activa d'aquests mutants seguint l'estabilitat de la base de Schiff en el temps (Taula VI.1.4). El mutant V138S presenta una estabilitat molt similar a la conformació activa de la proteïna Wt (0.96 pel mutant V138S i 1.00 pel Wt) i els mutants H152R i R147A, encara que es poden apreciar diferències, els valors d'estabilitat relativa obtinguts per aquests mutants respecte a la proteïna Wt no són significativament diferents (0.77 i 1.21, respectivament). El mutant K141R sí que presenta, però, una estabilitat de la conformació activa reduïda respecte a l'estabilitat de la conformació activa de la proteïna Wt d'aproximadament el 50%. Així

doncs, la introducció de la mutació K141R en l'estructura de la rodopsina desestabilitza la conformació activa del receptor.

IV.4.2.2. MUTANTS RODOPSINA-M3 MUSCARÍNIC DE LA NANSA C-III

Els mutants de la nansa C-III V227Y, AALS (V250A/T251A/V254L/I255S), i V227Y/AALS, conjuntament amb la proteïna recombinant Wt es varen expressar en cèl·lules COS-1, reconstituir amb el cromòfor 11-*cis*-retinal i immunopurificar segons es descriu en l'apartat de *Materials i Mètodes*. Els espectres UV-visible de les proteïnes recombinants purificades es varen registrar a 20°C i en foscor i es mostren en la Figura IV.4.3.

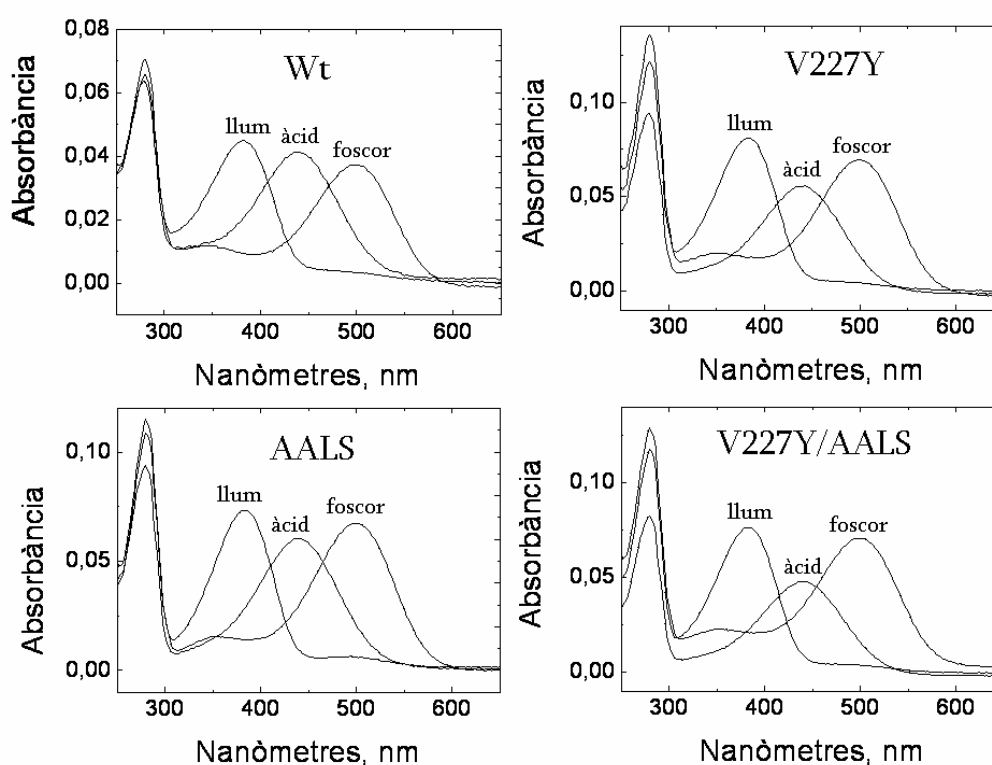


Figura IV.4.4. Espectres en foscor, després de la il·luminació i posterior acidificació dels mutants en la nansa C-III.

La il·luminació de les mostres es va realitzar durant 10s i finalment es va acidificar la mostra amb H_2SO_4 (Figura IV.4.4). El comportament dels mutants V227Y, AALS i V227Y/AALS en front la il·luminació i la posterior acidificació és el mateix que el de la proteïna Wt,

sugerint que els mutants segueixen la mateixa cascada de fotoactivació que la proteïna Wt formant-se, probablement, els mateixos fotointermediaris d'activació.

En la taula següent es mostren els màxim d'absorbància dels diferents mutants de la nansa C-III en fosc. No s'observen diferències significatives entre els màxims d'absorció obtinguts pels diferents mutants respecte el màxim d'absorbància obtingut per la proteïna Wt indicant que les mutacions introduïdes no afecten la formació de la butxaca d'unió al retinal (Taula IV.4.5.).

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Longitud d'ona del màxim d'absorció</i>
WT	500nm
V227Y	501nm
AALS	500nm
V227Y/AALS	501nm

Taula IV.4.5. Màxim d'absorbància al UV-visible per les proteïnes mutants de la nansa C-III.

Estabilitat tèrmica a 55°C dels mutants de la nansa C-III

L'estabilitat tèrmica de la conformació inactiva dels mutants de la nansa C-III s'ha determinat en paral·lel al càlcul de l'estabilitat de la conformació inactiva de la proteïna Wt (Taula IV.4.6.).

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Estabilitat tèrmica relativa a 55°C</i>
WT	1.00
V227Y	0.83
AALS	0.18
V227Y/AALS	0.21

Taula IV.4.6. Estabilitat tèrmica relativa dels mutants de la nansa C-III respecte a la proteïna Wt.

El mutant V227Y presenta una estabilitat tèrmica a 55°C lleugerament reduïda respecte a la proteïna Wt, del 0.83 (Wt 1.00), tot i que la disminució de l'estabilitat de la conformació inactiva d'aquest mutant no seria significativa, i la mutació no afectaria l'estabilitat de la forma inactiva del receptor. Els mutants AALS i V227Y/AALS, però, si que presenten una alteració important en l'estabilitat de la conformació inactiva, l'estabilitat tèrmica relativa al Wt per a les proteïnes AALS i V227Y/AALS és de 0.18 i 0.21, respectivament. La introducció d'aquestes mutacions en l'estructura de la proteïna desestabilitza la conformació inactiva del receptor.

Reactivitat en front la hidroxilamina i estabilitat de la base de Schiff

Els experiments de reactivitat en front la hidroxilamina, pels diferents mutants de la nansa C-III, es varen realitzar en paral·lel amb l'experiment fet per a la proteïna Wt. La reactivitat en front la hidroxilamina es va determinar seguint el decaïment de la banda d'absorció a 500nm que reflecteix la hidròlisi de la base de Schiff amb el temps. Els mutants de la nansa C-III no presenten reactivitat en front la hidroxilamina. L'accessibilitat de la hidroxilamina a la base de Schiff defineix el grau de compactació de la proteïna en l'entorn de la base de Schiff, així doncs, podem dir que les mutacions introduïdes no afecten el plegament de la proteïna entorn d'aquesta base de Schiff.

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Reactivitat de la forma inactiva en front la hidroxilamina</i>	<i>Estabilitat relativa de la base de Schiff</i>
WT	No	1.00
V227Y	No	0.75
AALS	No	0.96
V227Y/AALS	No	1.20

Taula IV.4.7. Reactivitat en front la hidroxilamina i $t_{1/2}$ de l'estabilitat base de Schiff per als diferents mutants de la nansa C-III de la rodopsina.

En la Taula IV.4.7. es mostra l'estabilitat relativa de la base de Schiff dels mutants de la nansa C-III. Les diferències observades en l'estabilitat de la conformació activa dels mutants AALS i V227Y/AALS respecte l'estabilitat de la forma activa de la proteïna Wt no es poden

considerar significatives. En el cas del mutant V227Y s'observa una reducció en l'estabilitat de la conformació activa, encara que aquesta no és molt important (0.75), respecte la proteïna Wt. La introducció de la mutació AALS en l'estructura del mutant V227Y millora l'estabilitat de la conformació activa de la proteïna (1.20), l'efecte en l'estabilitat de la conformació activa del receptor causat per la mutacions V227Y és veu compensat amb la introducció de la mutació AALS.

Regeneració dels mutants de la nansa C-III amb l'11-*cis*-retinal

S'ha determinat el percentatge de regeneració i el $t_{1/2}$ de la regeneració dels diferents mutants de la nansa C-III amb 11-*cis*-retinal. El mutant V227Y presenta un percentatge de regeneració i un $t_{1/2}$ similar a l'obtingut per a la proteïna Wt, del 85% i $t_{1/2}$ de 10.1min (86% i $t_{1/2}$ =12.7min per la proteïna Wt). En el cas dels mutants AALS i V227/AALS el percentatge de regeneració obtingut és menor del 63% i 64% ,respectivament, amb un augment del $t_{1/2}$ de regeneració (27.1min) en el cas del mutant AALS. La introducció de la mutacions AALS en l'estructura del receptor disminueix la regeneració de la proteïna amb el cromòfor 11-*cis*-retinal. La conjugació de les mutacions V227Y i AALS fa que, encara que no presenti un grau de regeneració màxim igual que el receptor Wt, el $t_{1/2}$ de regeneració sigui similar a l'obtingut per a la proteïna Wt (Taula IV.4.8.)

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>% de regeneració</i>	<i>t_{1/2} de regeneració</i>
WT	86	12.7 min
V227Y	85	10.1 min
AALS	63	27.1 min
V227Y/AALS	64	12 min

Taula IV.4.8. Percentatge de regeneració i $t_{1/2}$ de regeneració dels mutants en la nansa C-III amb el cromòfor 11-*cis*-retinal.

IV.4.2.3. MUTANTS CONJUGATS RODOPSINA-M3 DE LES NANSES C-II I C-III

També es varen construir els mutants conjugats de les nanses C-II i C-III V138S/V227Y/AALS (VVA) i V138S/K141R/V227Y/AALS (VKVA) amb la finalitat de determinar si aquests aminoàcids formen un lloc comú de reconeixement per a la proteïna G. Els diferents mutants conjugats es varen expressar en cèl·lules COS-1 i es varen purificar per columna d'immunoafinitat. En la Figura IV.4.5. es mostren els espectres de les proteïnes recombinants purificades.

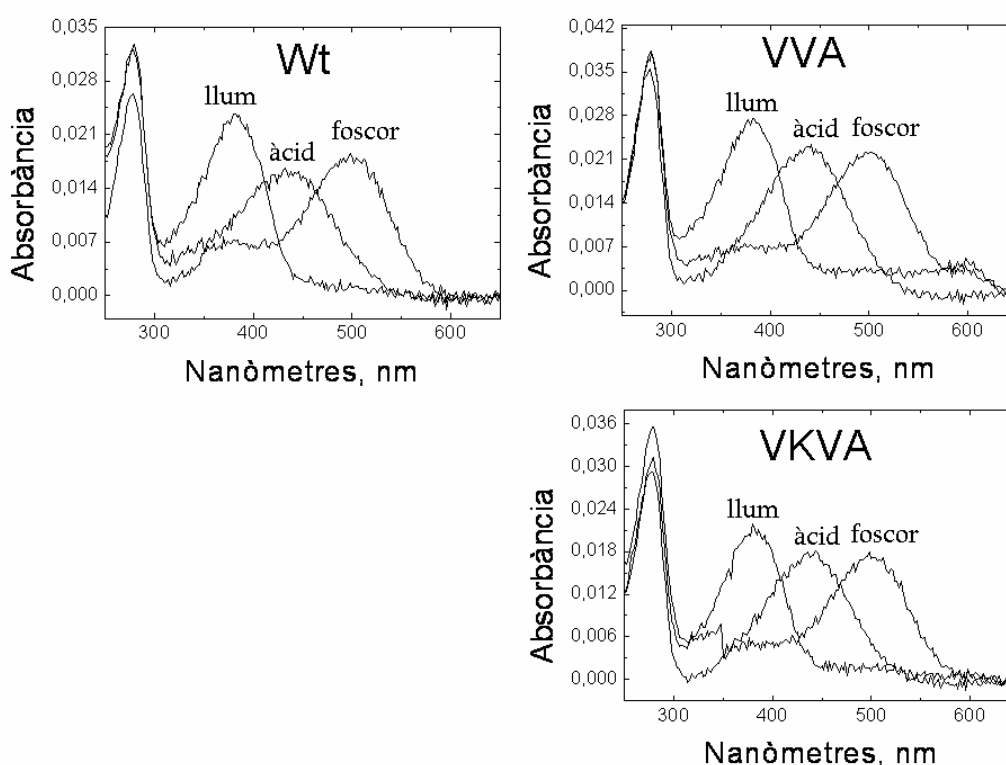


Figura IV.4.5. Espectres en foscor, després de la il·luminació i posterior acidificació dels mutants conjugats de les nansa C-II i C-III.

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Longitud d'ona del màxim d'absorció</i>
WT	500nm
VVA	501nm
VKVA	500nm

Taula IV.4.9. Màxim d'absorció al UV-visible de mutants conjugats de les nanses C-II i C-III.

Ambdós mutants, VVA i VKVA, formen cromòfor de forma similar a la proteïna Wt i presenten el mateix comportament en front la il·luminació i posterior acidificació que el receptor Wt, suggerint que segueixen la mateixa cascada de fotoactivació que la rodopsina Wt. Aquests mutants conjugats no presenten diferències significatives en el màxim d'absorció al UV-visible en fosc respecte al receptor Wt, això ens indica que probablement la introducció d'aquestes mutacions no influeixen en la formació de la butxaca d'unió el retinal (Taula IV.4.9.).

Estabilitat tèrmica a 55°C dels mutants conjugats de les nanses C-II i C-III

L'estabilitat intrínscica de les proteïnes VVA i VKVA es va determinar per comparació amb l'estabilitat de la conformació inactiva de la proteïna Wt a 55°C. Ambdós mutants presenten una estabilitat de la conformació inactiva reduïda respecte la proteïna Wt d'aproximadament el 50% (Taula IV.4.10.). La introducció d'un nombre important de mutacions en l'estructura del receptor afectaria l'estabilitat de la conformació inactiva del receptor.

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Estabilitat tèrmica relativa a 55°C</i>
WT	1.00
VVA	0.49
VKVA	0.49

Taula IV.4.10. Estabilitat tèrmica relativa a 55°C dels mutants VVA i VKVA respecte la proteïna Wt

IV.4.3. ACTIVACIÓ DE PROTEÏNA G

IV.4.3.1. ACTIVACIÓ DE TRANSDUCINA

La capacitat dels diferents mutants per activar la proteïna G_t s'ha mesurat per espectroscòpia de fluorescència en el cas dels mutants C-II, mutants C-III i mutants conjugats de les nanses

C-II i C-III, i per la tècnica de radioactivitat en el cas dels mutants de la nansa C-III, observant-se concordança entre els resultats obtinguts amb les dues tècniques utilitzades.

Pels mutants de la nansa C-II s'ha determinat el màxim d'activació de transducina dels diferents mutants en fosc (D) i després d'il·luminar (L) utilitzant la tècnica de radioactivitat, segons el $GTP\gamma S^{35}$ que resta unit a la proteïna G_t (Figura IV.4.6.). Pel que fa als resultats obtinguts per les proteïnes il·luminades (L), els mutants K141R, R147A i H152R presenten un màxim d'activació de transducina després de la il·luminació de 1.07, 1.00 i 0.92, respectivament (Taula IV.4.10). Podem dir doncs, que aquests mutants presenten la mateixa capacitat d'activar la transducina que el receptor Wt. El mutant V138S presenta, però, una activació de transducina reduïda d'aproximament un 50% respecte a la proteïna Wt. S'ha descrit anteriorment, que la Val-138 conjuntament amb els residus Tyr-136, Val-137, Val-139 formarien un lloc clau de reconeixement per la transducina i que mutacions en aquestes posicions provocarien una disminució en l'activació de transducina [Acharya et al., 1997; Sheikh et al., 1996; Farrens et al., 1996].

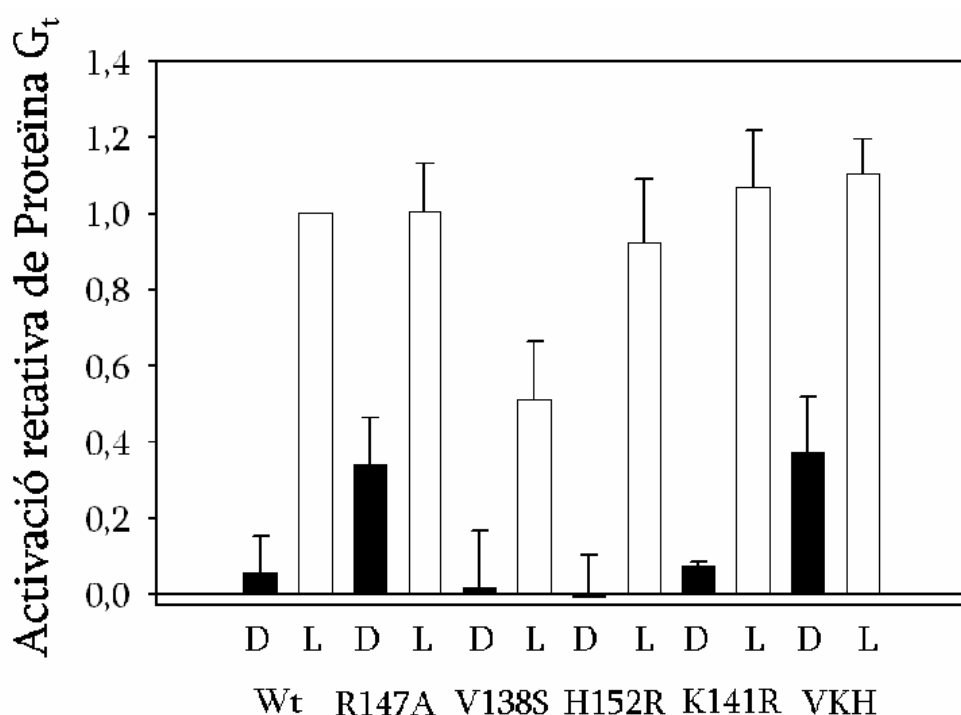


Figura IV.4.6. Màxim d'activació relativa de proteïna G_t pels diferents mutants de la nansa C-II en fosc (D) i després d'il·luminar (L).

Així doncs, la Val-138 seria un aminoàcid important pel reconeixement i/o activació de transducina i la Lys-141 i la His-152, a diferència del que s'observa pels receptors muscarínic, no tindrien un paper clau en la interacció i/o activació de proteïna G_t. Per altra banda, s'havia hipotetitzat que l'Arg-147 seria un aminoàcid clau en l'activació de transducina [Acharya et al., 1997] però la introducció de la mutació R147A no modifica la capacitat del receptor d'activar la transducina. Els resultats obtinguts suggereixen que l'Arg-147 no seria un aminoàcid clau per l'activació tal i com s'havia hipotetitzat. La capacitat del mutant VKH d'activar la transducina, després de la fotoactivació, és de 1.10. La conjugació de les mutacions V138S, K141R i H152R no impedeix el reconeixement i activació de la transducina per part del receptor (Figura IV.4.6.). Si que s'observa, però, que l'activitat basal (en fosc. D) dels mutants VKH i R147A (0.37 i 0.34, respectivament) és superior a l'activitat basal de la proteïna Wt. (0.09). La introducció d'aquestes mutacions facilitaria l'activació de transducina sense la prèvia activació del receptor per la llum. L'eliminació de la càrrega en la posició 147 (mutant R147A), nansa C-II, podria afavorir la interacció, en fosc, de la transducina amb el receptor traduint-se en un augment de l'activitat basal del receptor. En el cas de la mutació VKH, l'augment de l'activitat basal creiem que seria deguda a la introducció de les mutacions K141R i H152R, però s'hauria de comprovar a través de la construcció i expressió dels dobles mutants corresponents. La introducció de dues Arg en la nansa C-II podrien provocar un canvi conformacional en la configuració de la nansa i afavorir la interacció de la proteïna G_t en fosc.

Per altra banda, la capacitat dels mutants de la nansa C-III d'activar transducina es va determinar mitjançant espectroscòpia de fluorescència. Les longituds d'ona d'excitació i emissió utilitzades per a l'experiment van ser 295nm (escletxa, 0,4nm) i 340nm (escletxa, 4nm), respectivament. La concentració de rodopsina utilitzada va ser de 2nM i la de transducina de 250nM, en tampó 20mM BTP pH=7.5, 130mM NaCl, 1mM MgCl, 0,01%DM i 5µM GTPγS. Les corbes de fluorescència obtingudes pels diferents mutants es mostren en la Figura IV.4.7. A partir d'aquestes corbes de fluorescència es va determinar les velocitats inicials d'activació i els valors màxim d'activació relatius a la proteïna Wt pels diferents mutants de la nansa C-III (Taula IV.4.11.). Les velocitats inicials es varen determinar

utilitzant els primers 60s de l'experiment. El mutant V227Y presenta una reducció en la velocitat inicial d'activació de transducina d'aproximadament el 25% (0.74). El mutant AALS presenta una velocitat inicial d'activació de 0.15 i el mutant V227Y/AALS presenta una velocitat inicial d'activació del 0.02. El màxim valor d'activació de transducina per aquests mutants és de 0.74, 0.27 i 0.08, mutants V227Y, AALS i V227Y/AALS, respectivament. La introducció de la mutació V227Y en l'estructura del receptor no afecta gaire l'activació de transducina. Pel contrari, la mutació AALS sí que causa un efecte important en la funcionalitat del receptor, amb una disminució d'aproximadament el 70% en la capacitat del receptor d'activar de transducina. La conjugació de les mutacions V227Y i AALS fa que la proteïna no presenti activació de transducina. Tal i com s'havia descrit prèviament pel receptor muscarinic M3 [Blin et al., 1995] podria ser que aquests aminoàcids es trobessin interaccionant en l'estructura tridimensional i que estiguessin formant un lloc comú de reconeixement per a la proteïna G.

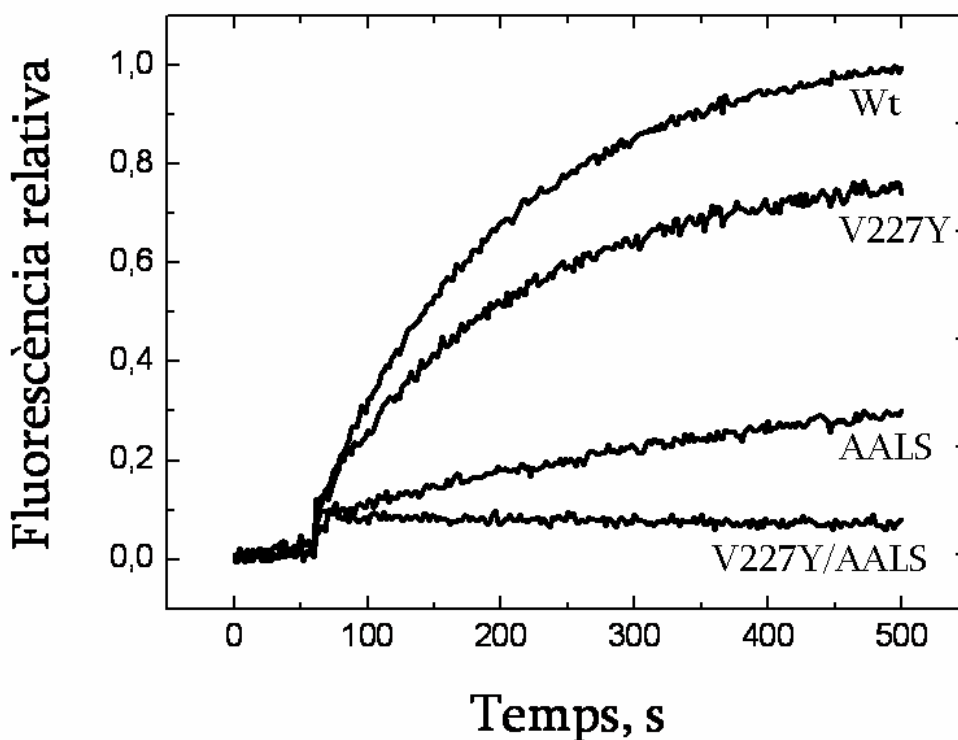


Figura IV.4.7. Corbes d'activació de transducina per les proteïnes WT, V227Y, V/AALS i AALS.

<i>Proteïna recombinant</i>	<i>Velocitat inicial d'activació</i>	<i>Màxima activació de G_t</i>
WT	1.00	1.00
V227Y	0.73	0.74
AALS	0.15	0.27
V227Y/AALS	0.02	0.08

Taula IV.4.11. Velocitats inicials d'activació i màxims d'activació de transducina pels diferents mutants de la nansa C-III.

La capacitat dels diferents mutants conjugats de les nanses C-II i C-III d'interaccionar i/o activar la transducina es va determinar mitjançant la tècnica de radioactivitat (Figura IV.4.8.).

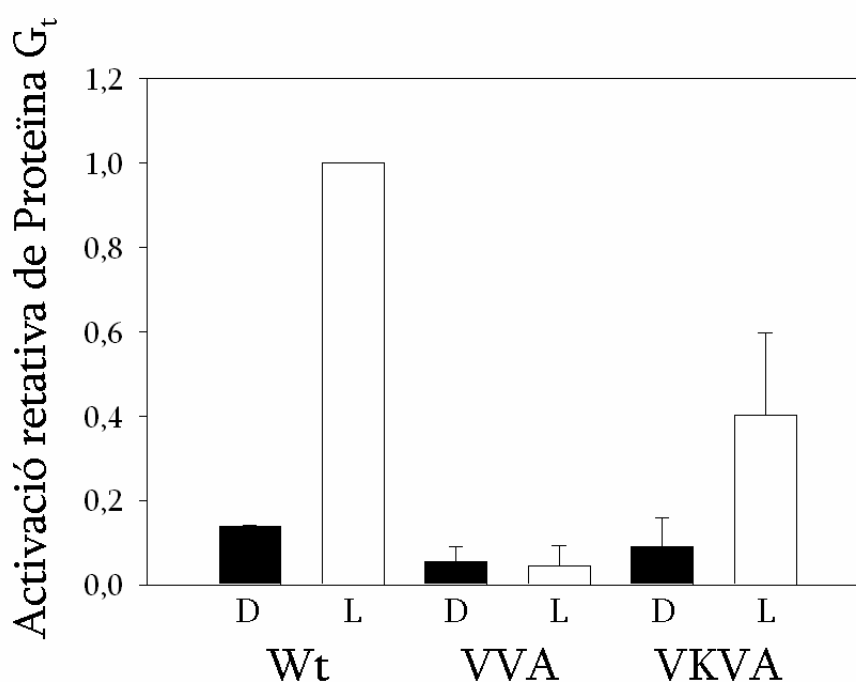


Figura IV.4.8. Màxim d'activació relativa de proteïna G_t pels diferents mutants conjugats de les nanses C-II i C-III en fosc (D) i després d'il·luminació (L).

El mutant VVA no presenta capacitat d'activar la transducina, amb un màxim d'activació després de la il·luminació de 0.04 respecte a la proteïna Wt fotoactivada agafada com a

referència (1.00). El mutant simple V138S ja presenta, per si sol, una activació de transducina reduïda, d'aproximadament el 50% i el mutant V227Y/AALS no presenta tampoc activació de transducina. La conjugació d'aquestes mutacions dona lloc a un receptor no funcional. Per altra banda, el mutant conjugat VKVA presenta una activació de transducina, després de la fotoactivació, de 0.40. La introducció d'una Arg en la posició 141, nansa C-II, restabliria parcialment el reconeixement i/o activació de la transducina, possiblement no com a conseqüència d'un canvi estructural en el receptor sinó a que la introducció de la mutació K141R en l'estructura del mutant VVA podria provocar un canvi en el patró d'interaccions rodopsina-transducina.

IV.4.3.2. ACTIVACIÓ DE PROTEÏNA G_q

Per tal de portar a terme els experiments d'activació de proteïna G_q s'ha utilitzat la proteïna quimèrica G_{iα_q} (Calbiochem). Aquesta quimera està construïda sobre l'estructura de la proteïna G_{iα} però presenta els últims 11 aminoàcids del C-terminal de la proteïna G_q. S'ha descrit que aquests aminoàcids determinen l'especificitat de reconeixement de la proteïna G pel receptor [Osawa et al. 1995; Garcia et al., 1995; Simonds et al., 1989; Dratz et al., 1993]. La rodopsina no presenta capacitat de reconeixement i/o activació de proteïna G_q però en els nostres resultats experimentals observem per la proteïna Wt fotoactivada un augment de la quantitat de GTPγS³⁵ que resta unit a la proteïna G_{iα_q} respecte a la proteïna en fosc. Aquest fet es podria atribuir a que la rodopsina reconeix de forma parcial a la proteïna G_{iα_q} degut a que es tracta d'una proteïna quimèrica i que la rodopsina sí que presenta capacitat d'activar la proteïna G_i. L'activació de G_{iα_q} per part de la proteïna Wt fotoactivada representa un 45% de l'activació de G_i que presenta la proteïna Wt. Així doncs, la discussió dels resultats es farà per comparació amb els resultats obtinguts per la rodopsina Wt

La capacitat dels mutants de la nansa C-II d'activar la proteïna G_{iα_q} es va determinar segons la tècnica de radioactivitat (Figura IV.4.9.). Els diferents mutants de la nansa C-II presenten una capacitat d'activar la proteïna G_{iα_q} molt similar a la rodopsina Wt. El mutant K141R presenta, però, una lleugera disminució de la capacitat d'interaccionar i/o activar la proteïna G_{iα_q} respecte la proteïna Wt (0.67). Pel mutant VKH s'observa un lleuger augment de

l'activació relativa de proteïna $G_i\alpha_q$ però no es pot considerar un augment significatiu. Els diferents mutants de la nansa C-II de la rodopsina no presenten una capacitat major d'activar la proteïna $G_i\alpha_q$ que la rodopsina Wt.

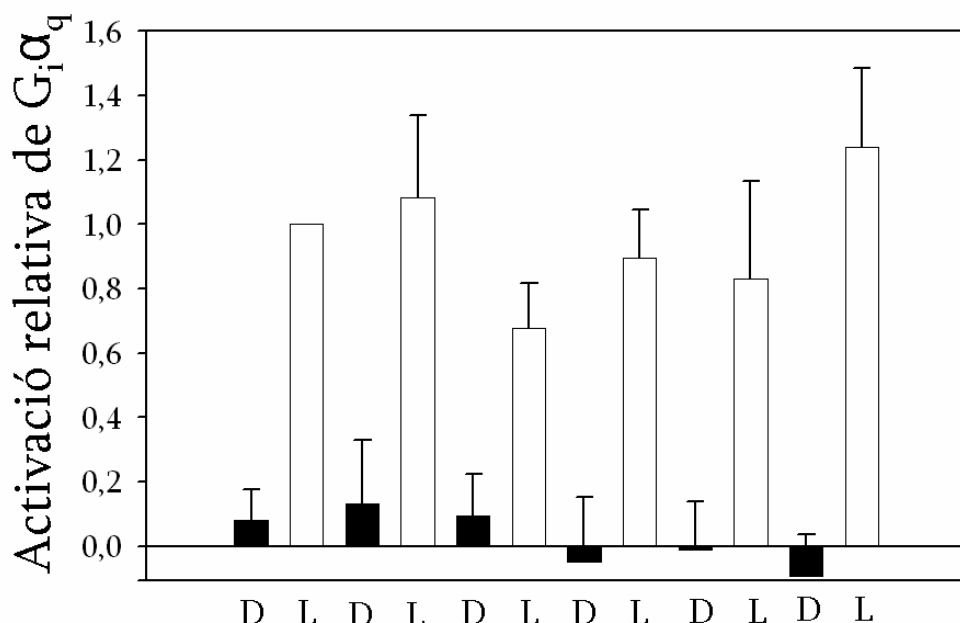


Figura IV.4.9. Màxim d'activació relativa de proteïna $G_i\alpha_q$ pels diferents mutants de la nansa C-II en fosc (D) i després d'il·luminar (L).

Per altra banda, la capacitat dels mutants de la nansa C-III d'activar la proteïna $G_i\alpha_q$ es va determinar per espectroscòpia de fluorescència. L'experiment es va realitzar utilitzant les mateixes condicions d'assaig d'activació de proteïna G_i (apartat de *Materials i Mètodes*). La funcionalitat de la proteïna $G_i\alpha_q$ es va determinar també per fluorescència, afegint NaF i $AlCl_3$ de forma seqüencial amb aproximadament 20s entre addicions (a una concentració final de 3.7mM i 100 μ M, respectivament). Al formar-se el complex $G_{\alpha}\cdot GDP\cdot AlF_4^-$ s'observa un augment de fluorescència que ens indica que la proteïna és funcional (no es mostra). Les corbes de fluorescència de l'assaig d'activació de proteïna $G_i\alpha_q$ dels mutants de la nansa C-III es mostren en la figura següent (Figura IV.4.10.).

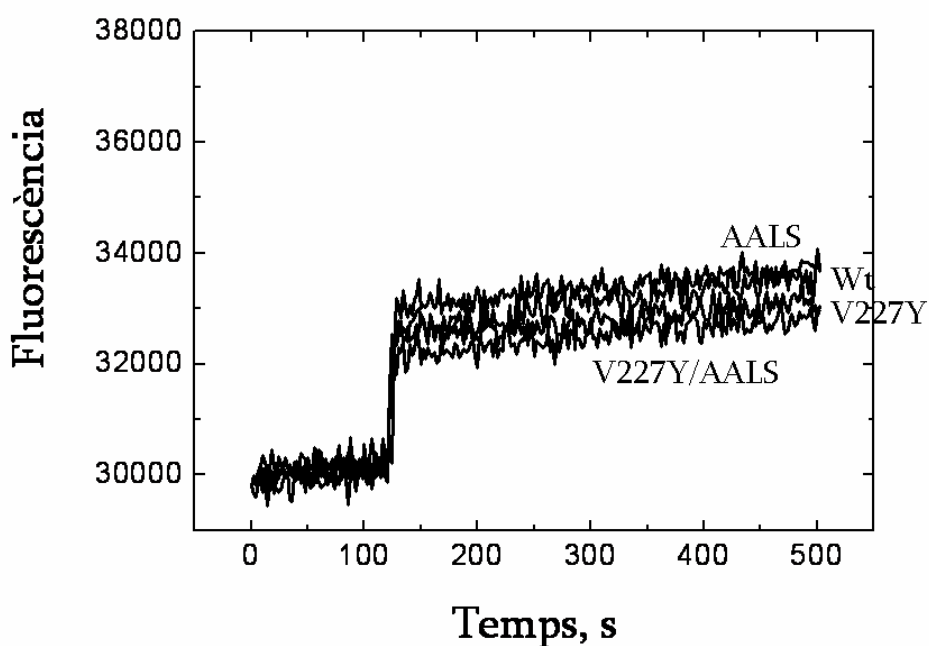


Figura IV.4.10. Corbes d'activació de proteïna $G_{i\alpha/q}$ per les proteïnes WT, V227Y, V/AALS i AALS.

Els diferents mutants de la nansa C-III, igual que la proteïna Wt, no presenten activació de proteïna $G_{i\alpha/q}$. La introducció d'aquestes mutacions en la nansa C-III no és suficient per que es doni el reconeixement i activació de la proteïna $G_{i\alpha/q}$. La combinació d'aquestes mutacions V227Y i AALS aboleix però l'activació de la proteïna G_t indicant que aquests aminoàcids participarien en el reconeixement i/o activació de la transducina.

La capacitat dels mutants conjugats de les nanses C-II i C-III d'interaccionar i/o activar a la proteïna $G_{i\alpha/q}$ s'ha determinat mitjançant la tècnica de radioactivitat (Figura IV.4.11). Ambdós mutants, VVA i VKVA, presenten una disminució important en l'activació de proteïna $G_{i\alpha/q}$ respecte al receptor Wt d'aproximadament un 70%. La introducció de les mutacions en les nanses C-II i C-III no facilita l'activació de proteïna $G_{i\alpha/q}$ per part del receptor. La conjugació d'aquestes mutacions no crearia un lloc de reconeixement i activació per a la proteïna $G_{i\alpha/q}$.

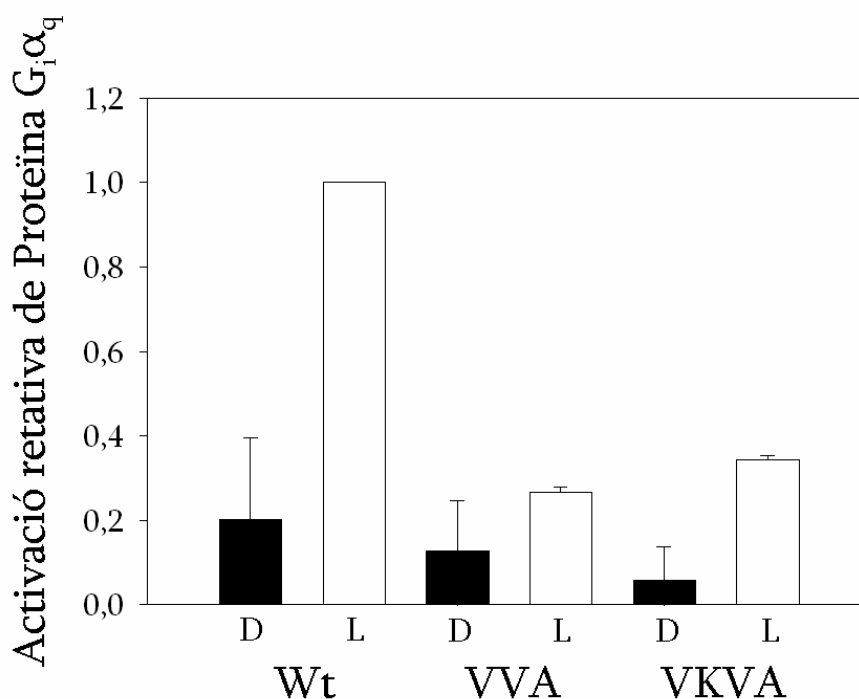


Figura IV.4.11. Màxim d'activació relativa de proteïna $G_{\alpha q}$ pels diferents mutants conjugats de les nanses C-II i C-III en fosc (D) i després d'il·luminar (L).

IV.4.4. DISCUSSIÓ

La rodopsina fotactivada (MetaII) és capaç de catalitzar l'intercanvi de GDP/GTP en la transducina. Diferents estudis mostren que hi hauria dos llocs d'unió de la transducina a la rodopsina fotoactivada. Un seria el C-terminal de la subunitat α i l'altre l'extrem C-terminal farnesilat de la subunitat γ [Garcia et al., 1995; Hamm et al., 1988; Herrmann et al., 2004; Morizumi et al., 2003]. L'extrem C-terminal de la subunitat α de la transducina s'uniria específicament a les nanses C-II i C-III de la rodopsina fotoactivada [Acharya et al., 1997]. Concretament, s'ha hipotetitzat que els residus Tyr136, Val137, Val138 i Val139 de la nansa C-II i els residus Glu247, Lys248, Glu249, Val250 i Thr251 de la nansa C-III formarien un lloc comú d'unió al C-terminal de la subunitat α de la transducina [Acharya et al., 1997]. En la formació del fotointermediari actiu de la rodopsina, MetaII, té lloc el moviment de l'hèlix VI respecte al nucli de la regió transmembrana. Aquest moviment causa l'obertura del cantó citoplasmàtic de l'hèlix VI [Farrens et al., 1996] i com a conseqüència s'exposen alguns residus citoplasmàtics d'aquesta hèlix, residus que serien necessaris per a l'activació de la

transducina [Altenbach et al., 1996; Dunham and Farrens 1999; Klein-Seetharaman et al., 1999]. El moviment de l'hèlix VI en el procés de fotoactivació del receptor ha estat descrit també en altres GPCR que s'activen per la unió del lligand, suggerint que el moviment d'aquesta hèlix VI seria un fet conservat en la senyalització d'aquesta superfamília de receptors [Gether and Kobilka 1998]. S'ha proposat que l'extrem C-terminal de la subunitat α de la transducina s'uniria als residus citoplasmàtics de l'hèlix VI que s'exposen degut al moviment d'aquesta hèlix [Janz and Farrens, 2004]. En concret, es donarien contactes hidrofòbics que controlarien la afinitat de la interacció rodopsina-transducina.

Els diferents mutants construïts de les nanses C-II i C-III s'expressen i formen cromòfor de forma similar a la proteïna Wt. El comportament en front la il·luminació i posterior acidificació pels diferents mutants és el mateix que s'observa per a la proteïna Wt, suggerint doncs, que aquests mutants presenten la mateixa cascada de fotoactivació que el receptor Wt. Cap dels mutants simples de les nanses C-II i C-III presenta inestabilitat de la conformació inactiva a 55° respecte a la proteïna WT. Si que presenten, però, una reducció en l'estabilitat de la conformació inactiva a 55° els mutants AALS (0.18), V227Y/AALS (0.21), VVA (0.49) i VKVA (0.49). La introducció d'aquestes mutacions en l'estructura del receptor podria afectar l'empaquetament de la proteïna traduint-se en una reducció de l'estabilitat de la conformació inactiva. També s'ha determinat l'estabilitat de la conformació activa MetaII per els mutants de la nansa C-II i C-III obtenint-se només una disminució significativa de l'estabilitat de la conformació activa pel mutant K141R (0.56), tot i que aquest factor no afecta l'activació de transducina per part d'aquest mutant que és igual que la de la proteïna Wt.

S'ha analitzat la capacitat d'aquests mutants d'activar la transducina. Els mutants de la nansa C-II presenten un màxim d'activació de transducina similar a l'obtingut per la proteïna Wt, a excepció del mutant V138S que presenta una reducció d'aproximadament el 50% en l'activació de transducina. S'ha descrit anteriorment que aquest aminoàcid, conjuntament amb els residus Tyr-136, Val-137 i Val-139 de la nansa C-II, formaria un lloc clau per a la interacció i/o activació de la transducina [Acharya et al., 1997]. Així doncs, la introducció d'una Ser en la posició 138 de la rodopsina provocaria una disminució en la funcionalitat del receptor degut a la pertorbació d'aquest motiu funcional. L'assaig d'activació de transducina

pels mutants de la nansa C-III mostra que les mutacions introduïdes causen una disminució important en la funcionalitat del receptor. La mutació puntual V227Y presenta una disminució del valor màxim d'activació d'aproximadament el 30% (0.74) i el mutant AALS presenta un màxim d'activació de 0.27 respecte la proteïna Wt (1.00). La conjugació d'aquestes mutacions, mutant V227Y/AALS, fa que el receptor perdi per complet la capacitat d'activar la transducina. Podria ser que la Val-227 conjuntament amb els residus de l'extrem C-terminal de la nansa C-III (Val-250, Thr-251, Val-254 i Ile-255) formessin un lloc comú de reconeixement per a la transducina, i la conjugació d'aquestes mutacions alterés per complet la configuració aquest lloc d'unió traduint-se en una pèrdua total de la funcionalitat del receptor. En el cas dels mutants conjugats de les nanses C-II i C-III observem que el mutant VVA no presenta capacitat d'activar la transducina i que la introducció d'una Arg en la posició 141 del mutant VVA recuperaria parcialment la capacitat del receptor d'activar la transducina fins un 40%, aquest augment es podria atribuir a que la introducció de la mutació K141R causaria un canvi en el patró d'interaccions de la rodopsina i la transducina.

També es va determinar la capacitat dels diferents mutants rodopsina-M3 muscarínic d'activar la proteïna $G_{i\alpha_q}$. Cap dels mutants d'estudi presenta, però, un augment en la capacitat d'activar la proteïna $G_{i\alpha_q}$, proteïna G específica del receptor muscarínic M3, respecte la rodopsina Wt. La introducció de les diferents mutacions en el receptor rodopsina no causa un canvi d'especificitat en el reconeixement i/o activació de proteïna G, si que s'observa però un canvi en la capacitat d'aquests mutants d'activar la transducina. Els conjunt de resultats obtinguts suggereixen que els residus hidrofòbics dels extrems N-terminal i C-terminal de les nanses C-II i C-III de la rodopsina estarien implicats en el reconeixement i/o activació de la transducina. En concret els aminoàcids hidrofòbics Val-138 del N-terminal de la nansa C-II (conjuntament amb la Val-137 i Val-139), Val-227 del N-terminal de la nansa C-III i els residus Val-250, Val-254 i Ile-255 del C-terminal de la nansa C-III participarien en la interacció i/o activació de la proteïna G. Aquest conjunt d'aminoàcids hidrofòbics que s'exposarien durant el procés de fotoactivació del receptor formarien un lloc comú de reconeixement per a la proteïna G i les interaccions hidrofòbiques que es formarien serien claus per a la interacció rodopsina-transducina. Aquest conjunt d'interaccions hidrofòbiques podrien determinar també la interacció d'altres GPCRs amb la seva corresponent proteïna G.