

Conclusions

1. Pel que fa als mutants de l'hèlix I i II de la rodopsina:

1.1. La caracterització dels mutants de la posició 51 de la rodopsina mostra que l'augment de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït en aquesta posició provoca una disminució de l'estabilitat de la conformació inactiva i també de la conformació activa MetaII. Aquesta inestabilitat de la conformació activa es pot relacionar amb la capacitat del receptor d'activar la transducina. Així doncs, el mutant G51A bàsicament activa la transducina com el receptor Wt (95%). El mutant G51V presenta una capacitat d'activar la transducina del 20% i el mutant G51L no presenta activació de transducina.

1.2. L'estudi dels mutants de la posició 89 suggereix que, més que el volum de la cadena lateral introduïda en aquesta posició, el que tindria importància seria la càrrega de la cadena lateral de l'aminoàcid introduït. Els mutants G89D i G89K presenten una reducció del 50% i del 40% en la capacitat d'activar la transducina, respectivament.

1.3. Els mutants d'adRP G51V i G89D presenten un procés de fotoactivació anòmal, amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació. Aquests fotointermediaris alterats es troben en equilibri amb les espècies que absorbeixen a 380nm, descrites com a espècies actives MetaII. La forma activa d'aquests mutants és inestable respecte a la conformació activa del receptor Wt. El mutant G51V que presenta una conformació activa més inestable també presenta una capacitat menor d'activar la transducina.

1.4. Els dobles mutants G51V/E134Q i G51V/V300G presenten també un procés de fotoactivació anòmal. El doble mutant G51V/E134Q, però, presenta menys formació de fotointermediari alterat que el mutant G51V i un augment important en la capacitat d'activar la transducina (activació del 70% respecte el 20% del mutant G51V). La

introducció de la mutació E134Q en l'estructura del mutant G51V restableix parcialment la funcionalitat del receptor.

1.5. Els espectres de FTIR de diferència dels mutants G51V, G51V/E134Q i G51V/V300G mostren la formació d'un fotointermediari d'activació amb bandes espectrals característiques dels fotointermediaris MetaI i MetaII però amb diferències importants en la zona d'absorció de l'enllaç peptídic coneguda com a Amida I. En aquests mutants es proposa que el que observariem és la formació del fotointermediari descrit com a MetaIb.

Els mutants d'adRP G51V i G89D presentarien un desplaçament de l'equilibri existent entre les conformacions MetaIa, MetaIb i la MetaII cap al fotointermediari MetaIb. Aquest desplaçament de l'equilibri cap al fotointermediari inactiu MetaIb i la inestabilitat de la conformació activa d'aquests mutants podrien ser els defectes moleculars subjacents que disparen el conjunt de processos bioquímics que condueixen en darrer terme a la degeneració de la retina en l'adRP.

2. En l'estudi de la rodopsina regenerada amb l'anàleg 11-*cis*-7-metilretinal:

2.1. La rodopsina Wt regenerada amb 11-*cis*-7-metilretinal (7-metil-Rho) forma cromòfor de forma similar a la proteïna Wt regenerada amb el lligand natural, 11-*cis*-retinal, amb un desplaçament però de la $\lambda_{\text{màx}}$ a 490nm. La proteïna 7-metil-Rho presenta una estructura compacte entorn de la base de Schiff però una estabilitat de la conformació inactiva reduïda respecte la proteïna Wt regenerada amb 11-*cis*-retinal.

2.2. La proteïna 7-metil-Rho presenta un procés de fotoactivació anòmal, amb la formació d'un fotointermediari alterat a 485nm que és estable en el temps. La capacitat de la proteïna 7-metil-Rho d'activar a la transducina es veu reduïda en un 50% degut principalment a la formació d'aquest fotointermediari alterat.

2.3. El fotointermediari alterat que es forma en el procés de fotoactivació de la proteïna 7-metil-Rho es troba en equilibri amb la espècie que absorbeixen a 373nm. El mutant

E134Q regenerat amb 11-*cis*-7-metilretinal (7-metil-E134Q) també presenta un procés de fotoactivació anòmal amb la formació d'un fotointermediari alterat d'activació que es troba en equilibri amb la forma activa MetaII. L'equilibri entre el fotointermediari alterat i la forma activa es troba fortament desplaçat cap al fotointermediari en el cas de la proteïna 7-metil-Rho.

La introducció d'un grup metil en el C7 del retinal provoca una pertorbació estructural en l'entorn de la Met-207 que fa que el receptor quedi atrapat en un fotointermediari d'activació. Aquest fotointermediari d'activació podria ser la conformació MetaIa.

*Com a conclusió global dels fotointermediaris alterats obtinguts en l'estudi dels apartats 1 i 2 (mutants en l'hèlix I i II i rodopsina regenerada amb 11-*cis*-7-metilretinal) podem concloure que:*

l'equilibri existent entre les conformacions MetaI i MetaII seria complex, amb la participació de tres conformacions; MetaIa, MetaIb i MetaII. L'alteració d'aquest equilibri repercutiria en la funcionalitat del receptor. A més, aquest equilibri estaria controlat per una xarxa d'interaccions complex entre les hèlixes I, II i VII de la rodopsina i també per les interaccions entre la opsina i el retinal.

3. L'estudi de proteïnes mutants rodopsina-M3 muscarínic ha permès arribar a les següents conclusions:

3.1. S'han construït i expressat els mutants rodopsina-M3 de les nanses C-II i C-III. Tots els mutants rodopsina-M3 de l'estudi presenten una formació de cromòfor similar a la rodopsina Wt. A més, tots els mutants presenten el mateix comportament que el receptor Wt en front la il·luminació i posterior acidificació, suggerint que segueixen la mateixa cascada de fotoactivació que la proteïna Wt, formant-se probablement els mateixos fotointermediaris d'activació.

3.2. Els mutants simples de la nansa C-II presenten aproximadament la mateixa capacitat d'activar la transducina que el receptor Wt a excepció del mutant V138S que presenta una activació de transducina reduïda un 50% respecte la proteïna Wt.

3.3. Els mutants de la nansa C-III, mutants V227Y, AALS i V227Y/AALS, presenten una capacitat reduïda d'activar la transducina. El mutant V227Y presenta una activació de transducina relativa del 74% i el mutant AALS del 27%. La conjugació d'ambdós mutants, V227Y/AALS, fa que el receptor no sigui funcional. Aquests aminoàcids podrien estar formant un lloc comú d'interacció amb la transducina.

3.4. Els mutants conjugats de les nanses C-II i C-III, mutants VVA i VKVA, presenten una activació reduïda de transducina. El mutant VVA no presenta activació de transducina. El mutant VKVA presenta un màxim relatiu d'activació de transducina del 40%.

3.5. S'ha determinat la capacitat dels diferents mutants de les nanses C-II i C-III d'activar la proteïna $G_{i\alpha_q}$, proteïna G específica del receptor muscarínic M3. Cap dels mutants presenta, però, un augment en l'activació de proteïna $G_{i\alpha_q}$ respecte a la rodopsina Wt.

Els aminoàcids hidrofòbics Val-138, Val-227, Val250, Val254 i Ile-255 de la rodopsina participarien en el reconeixement i/o activació de la transducina. Aquestes interaccions hidrofòbiques jugarien un paper clau en la interacció rodopsina-transducina.