

Índex del Contingut

| | Pàgina |
|--|---------------|
| Índex general | i |
| Índex de figures | viii |
| Índex de taules | xiii |
| Abreviatures | xvi |
| Resum | xviii |
| Summary | xx |
| I.-Introducció | 1 |
| I.1.-Receptors acoblats a proteïna G | 3 |
| I.1.1.-Característiques estructurals | 4 |
| I.1.2.-Mecanisme d'activació i transducció del senyal | 4 |
| I.2.-La rodopsina: el receptor acoblat a proteïna G visual | 6 |
| I.2.1.-Característiques generals | 6 |
| I.2.2.-Localització | 7 |
| I.2.3.-Característiques estructurals | 9 |
| I.2.4.-Mecanisme de transducció del senyal | 13 |
| I.2.5.-Propietats espectroscòpiques de la rodopsina | 16 |
| I.2.6.-Importància del moviment de les hèlices 3 i 6 en l'activació de la rodopsina | 18 |
| I.2.7.-Malalties de la retina associades a mutacions de rodopsina | 19 |
| I.2.7.1.- La retinosi pigmentària | 19 |
| I.2.7.2.- La ceguesa nocturna congènita | 22 |
| I.3.-El zenc | 23 |
| I.3.1.-Importància del zenc en les funcions fisiològiques de l'organisme | 23 |
| I.3.2.-El zenc en l'ull | 24 |

| | |
|---|-----------|
| II.-Objectius | 29 |
| III.-Material i Mètodes | 33 |
| III.1.-Material general utilitzat | 35 |
| III.2.-Mètodes utilitzats per a l'obtenció, purificació i caracterització de rodopsines de ROS i recombinants | 36 |
| III.2.1.-Obtenció de rodopsina a partir de retines bovines | 36 |
| III.2.1.1-Extracció de ROS a partir de retines bovines | 37 |
| III.2.1.2.-Solubilització de ROS | 39 |
| III.2.1.3.-Rentat amb urea | 40 |
| III.2.1.4.-Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a sefarosa | 41 |
| III.2.1.4.1.-Diàlisi de l'anticòs Rho-1D4 | 42 |
| III.2.1.4.2.-Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a sefarosa | 42 |
| III.2.1.4.3.-Determinació de la capacitat d'unió de la reïna acoblada | 44 |
| III.2.1.5.-Purificació de rodopsina de ROS | 45 |
| III.2.2.-Material biològic procariota utilitzat per a l'obtenció de DNA recombinant | 46 |
| III.2.2.1.-Creació de cèl·lules DH5 α competents | 46 |
| III.2.2.2.-Transformació de les cèl·lules DH5 α competents | 47 |
| III.2.2.3.-Purificació de DNA plasmídic a petita escala | 48 |
| III.2.2.4.-Purificació de DNA plasmídic a gran escala | 50 |
| III.2.3.-Tècniques de DNA recombinant utilitzades per a la construcció de mutants de la rodopsina | 52 |
| III.2.3.1.-Mutagènesi de lloc dirigit | 52 |
| III.2.3.2.-Mutagènesi per <i>cassette</i> | 55 |
| III.2.3.2.1.-Construcció dels dobles mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q | 56 |
| III.2.3.2.2.-Construcció dels mutants en la posició T94 | 58 |
| III.2.4.-Obtenció de rodopsines recombinants | 61 |
| III.2.4.1.-Línia cel·lular | 62 |
| III.2.4.1.1.-Característiques generals | 62 |

| | |
|---|----|
| III.2.4.1.2.-Manteniment | 62 |
| III.2.4.1.3.-Congelació | 63 |
| III.2.4.1.4.-Descongelació | 64 |
| III.2.4.2.-Transfecció DNA d'opsina en cèl·lules COS-1 | 65 |
| III.2.4.3-Resuspensió del retinal | 68 |
| III.2.4.4.-Purificació de rodopsines recombinants | 69 |
| III.2.4.5.-Preparació de membranes de cèl·lules COS-1 | 70 |
| III.2.5.-Espectroscòpia UV-Vis per a la caracterització de rodopsina | 72 |
| III.2.5.1.-Característiques generals | 72 |
| III.2.5.2.-Condicions de mesura | 73 |
| III.2.5.3.-Assaigs espectroscòpics per a la caracterització de rodopsines recombinants i l'estudi de la influència de diversos factors en l'estabilitat de rodopsina de ROS | 74 |
| III.2.5.3.1.-Assaigs espectroscòpics per estudiar l'efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina | 74 |
| III.2.5.3.1.a-Estudi de l'estabilitat tèrmica de la forma inactiva de la rodopsina en presència de zenc i d'altres cations | 74 |
| III.2.5.3.1.b.-Estabilitat tèrmica de membranes de ROS en presència de zenc | 75 |
| III.2.5.3.1.c.-Càlcul dels paràmetres termodinàmics a partir de la desnaturalització tèrmica de la rodopsina en presència de zenc | 76 |
| III.2.5.3.1.d.-Assaig de regeneració de la rodopsina en presència de diferents concentracions de zenc | 77 |
| III.2.5.3.1.e.-Assaig de regeneració de membranes de ROS en presència de zenc | 78 |
| III.2.5.3.1.f.- Efecte del zenc en la formació de MetaIII | 79 |
| III.2.5.3.1.g.-Quarta derivada de l'espectre d'absorbància UV-Vis per observar l'efecte del zenc en l'entorn dels aminoàcids aromàtics de la rodopsina | 79 |
| III.2.5.3.2-Isomerització específica de l'11-cis-retinal unit a rodopsina sota condicions de desnaturalització tèrmica | 80 |

| | |
|---|----|
| III.2.5.3.2.a.-Estabilitat tèrmica del 11- <i>cis</i> -retinal | 81 |
| III.2.5.3.2.b-Comportament enfront la il·luminació de l'11- <i>cis</i> -retinal i el tot- <i>trans</i> -retinal | 81 |
| III.2.5.3.3.-Efecte del DM en l'estabilitat de la rodopsina | 82 |
| III.2.5.3.3.a.-Efecte de diferents concentracions de DM en l'estabilitat de MetaII | 82 |
| III.2.5.3.3.b-Formació de MetaIII en presència de diferents concentracions de DM | 83 |
| III.2.5.3.4-Characterització espectroscòpica dels mutants de la rodopsina associats a malalties de la retina | 84 |
| III.2.5.3.4.a.-Estabilitat tèrmica i reactivitat enfront la hidroxilamina en el mutant de la CNC T94I | 84 |
| III.2.5.3.4.b.-Característiques espectroscòpiques del mutant de la RP L46R | 85 |
| III.2.5.3.5.-Characterització espectroscòpica dels mutants de la rodopsina de la part citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6 | 85 |
| III.2.5.3.5.a.-Estabilitat tèrmica dels mutants en la posició 134, 247 i 251 | 85 |
| III.2.5.3.5.b.-Reactivitat enfront de la hidroxilamina dels mutants en la posició 134, 247 i 251 | 85 |
| III.2.6.-Determinació de l'estabilitat de MetaII per espectroscòpia de fluorescència | 85 |
| III.2.7.-Characterització electroforètica de les rodopsines recombinants mutades | 86 |
| III.2.7.1.-Característiques generals | 86 |
| III.2.7.2.-Preparació dels gels de SDS-PAGE | 87 |
| III.2.7.3.-Tinció de gels de SDS-PAGE | 89 |
| III.2.7.3.1.-Tinció de blau de <i>Coomassie</i> | 89 |
| III.2.7.3.2.-Tinció de plata | 90 |
| III.2.7.3.3.-Electrotransferència de proteïnes i detecció immuno específica | 92 |
| III.2.8.-Cromatografia líquida d'alta pressió per a la identificació dels retinals. | 93 |

| | |
|--|-----------|
| IV.-Resultats i discussió | 97 |
| IV.1.-Efecte de la temperatura, el zenc i l'entorn lipídic en la conformació de la rodopsina i el seu cromòfor | 99 |
| IV.1.1.-Obtenció de la rodopsina a partir de retines bovines | 99 |
| IV.1.1.1.-Extracció de ROS a partir de retines bovines | 99 |
| IV.1.1.2.- Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a CNBr-sefarosa i determinació de la seva capacitat d'unió | 100 |
| IV.1.1.3.- Purificació de la rodopsina a partir de ROS | 103 |
| IV.1.2.-Efecte del detergent DM en l'estabilitat de la rodopsina | 104 |
| IV.1.2.1.-Estabilitat de la MetaII a diferents concentracions de DM | 105 |
| IV.1.2.2.-Formació de la MetaIII en presència de diferents concentracions de DM | 107 |
| IV.1.2.3.-Com la afecta la concentració de detergent a l'estabilitat i l'activitat de la rodopsina? | 109 |
| IV.1.3.-Isomerització específica de l'11- <i>cis</i> -retinal unit a la rodopsina sota condicions de desnaturalització | 111 |
| IV.1.4.-Efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina | 115 |
| IV.1.4.1.-Estabilitat tèrmica de la forma inactiva de la rodopsina en presència de zenc i d'altres cations | 115 |
| IV.1.4.2.-Determinació dels paràmetres termodinàmics del procés de desnaturalització de la rodopsina en presència de zenc | 117 |
| IV.1.4.3.-Regeneració de la rodopsina en presència de diferents concentracions de zenc | 119 |
| IV.1.4.4.-Formació de la MetaIII en presència de zenc | 121 |
| IV.1.4.5.-Efecte del zenc en l'entorn dels aminoàcids aromàtics de la rodopsina a partir d'espectrofotometria de quarta derivada | 122 |
| IV.1.4.6.-Efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina i dels seus fotointermediaris | 124 |
| IV.2.-Efecte de mutacions en l'estabilitat de rodopsina | 125 |
| IV.2.1.-Mutacions associades a malalties de la retina | 125 |

| | |
|--|-----|
| IV.2.1.1.-Mutació L46R associada a la RP | 125 |
| IV.2.1.1.1.-Construcció del mutant L46R per mutagènesi dirigida | 126 |
| IV.2.1.1.2.-Anàlisi espectroscòpica del mutant L46R | 127 |
| IV.2.1.1.3.-Electroforesi de SDS-PAGE, electrotransferència de proteïnes i tinció en plata de membranes de COS-1 transfectades amb DNA L46R i WT | 129 |
| IV.2.1.1.4.-Efecte de la mutació L46R en l'estabilitat de la rodopsina i la seva implicació en el mecanisme molecular que causa la RP | 131 |
| IV.2.1.2.-Mutació de rodopsina associada a CNC T94I i altres mutacions en la posició 94 | 132 |
| IV.2.1.2.1.-Caracterització espectroscòpica de T94I, T94S, T94K i T94D | 132 |
| IV.2.1.2.2.-Estabilitat tèrmica dels mutants en la posició 94 | 135 |
| IV.2.1.2.3.-Reactivitat enfront de la hidroxilamina dels mutants en la posició 94 | 136 |
| IV.2.1.2.4.-Estabilitat de la conformació activa determinada per espectroscòpia de fluorescència dels mutants en posició 94 | 137 |
| IV.2.1.2.5.-Com pot la mutació T94I desencadenar la malaltia de CNC? | 138 |
| IV.2.2.-Efecte de les posicions 134, 247 i 251 en l'estabilitat i la conformació de la rodopsina | 139 |
| IV.2.2.1.-Construcció dels mutants en les posicions 134, 247 i 251 mitjançant mutagènesi dirigida i per <i>cassette</i> | 139 |
| IV.2.2.1.1.-Construcció dels mutants senzills, dobles i triples en les posicions 134, 247 i 251 mitjançant mutagènesi dirigida | 139 |
| IV.2.2.1.2.-Construcció dels mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q mitjançant mutagènesi per <i>cassette</i> | 142 |

| | |
|---|------------|
| IV.2.2.2.-Anàlisi espectroscòpica dels mutants de la zona citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6 | 144 |
| IV.2.2.2.1.-Espectres dels mutants de la zona citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6 | 144 |
| IV.2.2.2.2.-Estabilitat tèrmica dels mutants en les posicions 134, 247 i 251 | 155 |
| IV.2.2.2.3.-Reactivitat enfront de la hidroxilamina dels mutants 134, 247 i 251 | 158 |
| IV.2.2.2.4.-Com afecta la xarxa electrostàtica de les hèlices 3 i 6 a l'estabilitat de la rodopsina? | 158 |
| IV.2.2.3.-Importància de la zona citoplasmàtica en la unió de retinal | 161 |
| IV.3.-Extrapolació dels resultats obtinguts amb la rodopsina a la superfamília de GPCR | 172 |
| V.-Conclusions | 177 |
| VI.-Bibliografia | 183 |
| VII.-Annexos | 201 |
| VIII.-Agraïments | 213 |

Índex de Figures

| | Pàgina |
|--|---------------|
| I.-Introducció | |
| Fig. 1.1: Classificació dels GPCR | 3 |
| Fig. 1.2: Esquema general d'un GPCR | 4 |
| Fig. 1.3: Esquema del mecanisme d'activació d'un GPCR | 5 |
| Fig. 1.4: Esquema d'un ull on es mostren les tres túniques que el revesteixen | 7 |
| Fig. 1.5: Cèl·lules constituents de la retina | 8 |
| Fig. 1.6: Detall d'un bastó de la retina | 9 |
| Fig. 1.7: Estructura secundària de la rodopsina | 10 |
| Fig. 1.8: Estructura tridimensional de la rodopsina | 11 |
| Fig. 1.9: Detall de la butxaca del retinal de la rodopsina | 12 |
| Fig. 1.10: Pas de la llum a través de la retina | 13 |
| Fig. 1.11: Esquema del mecanisme de transducció del senyal iniciat per la llum | 15 |
| Fig. 1.12: A: El <i>11-cis-retinal</i> quan capta la llum s'isomeritza a la forma tot- <i>trans-retinal</i> . B: La captació de la llum per part del retinal, provoca un canvi en l'espectre d'absorció | 17 |
| Fig. 1.13: Espectres d'absorció d'una mostra de rodopsina abans d'il·luminar, després d'il·luminar i després de l'acidificació | 17 |
| Fig. 1.14: Fons de l'ull d'un individu malalt de la RP | 20 |
| Fig. 1.15: Visió d'un individu sa i un individu malalt de la RP | 20 |
| Fig. 1.16: Mutacions de rodopsina associades a la RP | 21 |
| Fig. 1.17: Estructura tridimensional de la rodopsina on es mostra la localització de la posició 46 | 22 |
| Fig. 1.18: Detall de l'entorn de la base de Schiff | 23 |
| Fig. 1.19: Funcions del zenc en la retina | 25 |
| Fig. 1.20: Zenc en l'estructura tridimensional de la rodopsina | 26 |
| III.-Material i Mètodes | |
| Fig. 3.1: Esquema general del procés de purificació de rodopsina a partir de retines | 36 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 3.2: Gradient de sacarosa després de la centrifugació durant el procés d'extracció de ROS | 38 |
| Fig. 3.3: Esquema del vector pMT4 on es mostren els llocs de tall d'EcoRI i Sall | 50 |
| Fig. 3.4: Esquema del vector pMT4 on s'assenyalen la posició 134 i 247 i les dianes de restricció dels enzims utilitzats en la construcció dels mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q | 56 |
| Fig. 3.5: Vector pMT4 on s'assenyalen les dianes de restricció d'EcoRI, BglII, NotI i XmnI i NcoI | 60 |
| Fig. 3.6: Esquema del procés de transfecció i de purificació de rodopsina recombinant expressada en cèl·lules COS-1 | 61 |
| Fig. 3.7: Seqüència del gen sintètic de l'opsina emprat | 66 |
| Fig. 3.8: Vector pMT4 que te insertat el gen de l'opsina flanquejat entre les dianes de restricció dels enzims EcoRI i NotI | 67 |
| IV.-Resultats i Discussió | |
| Fig. 4.1: Espectre de rodopsina de ROS solubilizada | 99 |
| Fig. 4.2: Espectre de l'anticòs Rho-1D4 | 101 |
| Fig. 4.3: Espectres de la rodopsina purificada a partir de la reïna acoblada amb l'anticòs Rho-1D4 | 101 |
| Fig. 4.4: Espectres d'absorció de les elucions de la rodopsina purificada | 103 |
| Fig. 4.5: Espectres obtinguts després d'acidificar rodopsina a diferents temps després d'il·luminar-la | 105 |
| Fig. 4.6: <i>Decay</i> de la MetaII determinat a partir del mètode d'acidificació a les diferents concentracions de DM. | 106 |
| Fig. 4.7: Espectres de la formació de la MetaIII a diferents concentracions de DM | 108 |
| Fig. 4.8: Seguiment del procés de desnaturalització tèrmica de rodopsina de ROS a 55°C | 110 |
| Fig. 4.9: Espectres de diferència entre abans i després d'il·luminar de a) 11- <i>cis</i> -retinal b) tot- <i>trans</i> -retinal c) rodopsina tractada a 55°C | 111 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 4.10 : Espectres de diferència d'abans i després d'il·luminar de a) 11- <i>cis</i> -retinal b) tot- <i>trans</i> -retinal i c) 11- <i>cis</i> -retinal tractat a 55°C | 112 |
| Fig. 4.11 : Cromatograma d'HPLC d'11- <i>cis</i> -retinal lliure i de rodopsina tractat a 55°C. En les abscisses es mostren el temps de retenció dels diferents retinals en 72% acetonitril aquós (volum/volum) i 0.015 M acetat amoni pH=5.5 | 113 |
| Fig. 4.12 : Corba de desnaturalització tèrmica de rodopsina en presència de 15 (Δ) i 50 (\bullet) μ M ZnCl ₂ respecte el control sense zenc (\square) a 55°C | 115 |
| Fig. 4.13 : Corba de desnaturalització tèrmica a 55°C de rodopsina en presència dels diferents cations a 50 μ M | 116 |
| Fig. 4.14 : Estabilitat tèrmica de rodopsina de membranes de ROS en absència i presència de zenc a 55°C | 117 |
| Fig. 4.15 : Gràfic d' <i>Arrhenius</i> de la desnaturalització tèrmica de rodopsina en absència de zenc i presència de 50 μ M de zenc | 118 |
| Fig. 4.16 : Regeneració de rodopsina en presència de diferents concentracions de zenc | 119 |
| Fig. 4.17 : Regeneració de rodopsina en membranes de ROS en presència i absència de zenc | 120 |
| Fig. 4.18 : Formació de la MetaIII en presència i absència de zenc. | 121 |
| Fig. 4.19 : Espectres de la quarta derivada de rodopsina en presència i absència de zenc | 122 |
| Fig. 4.20 : Esquema d'un espectre de quarta derivada on es marquen els màxims i mínims que corresponen a cadascun dels aminoàcids aromàtics | 123 |
| Fig. 4.21 : Gel d'agarosa a l'1% de comprovació de la digestió del DNA L46R purificat a partir de les colònies DH5 α | 126 |
| Fig. 4.22 : Cromatograma de la seqüència d'opsina-L46R. En el requadre es mostra el codó que codifica per R46 | 126 |
| Fig. 4.23 : Espectres de WT i L46R a 20°C | 127 |
| Fig. 4.24 : Ampliació de l'espectre de L46R a 20°C | 128 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 4.25 : Tinció en plata d'un gel de SDS-PAGE de les mostres de membrana de cèl·lules COS-1 transfectades amb DNA d'opsina WT i L46R | 129 |
| Fig. 4.26 : Western-Blot de membranes de COS-1 transfectades amb DNA d'opsina- L46R i WT | 130 |
| Fig. 4.27 : Espectres d'absorció de rodopsina WT, T94I, T94D, T94K i T94S a 20°C | 133 |
| Fig. 4.28 : Espectres d'il·luminació de rodopsina WT, T94I, T94S i T94D a 20°C | 134 |
| Fig. 4.29 : Estabilitat tèrmica dels mutants T94I, T94D i T94S a 37°C | 135 |
| Fig 4.30 : Reactivitat en front de la hidroxilamina en els mutants T94S, T94I i T94D a 20°C | 136 |
| Figura 4.31 : Gel d'agarosa a l'1% realitzat per a la comprovació de les mutacions en el DNA dels mutants T251E, i E134Q/T251E digerits amb NheI i MluI | 140 |
| Fig. 4.32 : Cromatograma de la seqüència de T251A | 140 |
| Fig. 4.33 : Cromatograma de la seqüència d'E134Q/T251A | 141 |
| Fig. 4.34 : Cromatograma de la seqüència d'E247A/T251K | 141 |
| Fig. 4.35 : Cromatograma de la seqüència d'E134Q/E247Q/T251E | 142 |
| Fig. 4.36 : Gel d'agarosa a l'1% per comprovar que els DNA E134Q/E247Q i E247Q/E247A de les colònies DH5α | 143 |
| Fig. 4.37 : Cromatograma de la seqüència de DNA E134Q/E247Q | 144 |
| Fig. 4.38 : Espectres de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q a 20°C | 145 |
| Fig 4.39 : Visió lateral (A i C) i des del citoplasma (B i D) del model de rodopsina mutant E134Q/E247A | 147 |
| Fig 4.40 : Espectre de rodopsina WT, T251A, T251E i T251K a 20°C | 148 |
| Fig. 4.41 : Espectres de rodopsina WT, E134Q/T251A, E134Q/T251E i E134Q/T251K a 20°C | 149 |
| Fig. 4.42 : Espectres de les rodopsines WT, E247A/T251A, E247A/T251E i E247A/T251K a 20°C | 150 |
| Fig. 4.43 : Espectres de les mostres WT, E247Q/T251A, E247Q/T251E i E247Q/T251K a 20°C | 151 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 4.44: Espectres de les rodopsines WT, E134Q/E247A/T251A, E134Q/E247A/T251E i E134Q/E247A/T251K a 20°C | 153 |
| Fig. 4.45: Espectres de les rodopsines WT, E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E i E134Q/E247A/T251K a 20°C | 154 |
| Fig. 4.46: Estabilitat tèrmica de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q a 45°C | 156 |
| Fig. 4.47: Reactivitat de la Hidroxilamina 30 mM pH=7.0 de rodopsines WT, E134Q, E247A, E134Q/E247A i E134Q/E247A/T251A a 20°C | 158 |
| Fig. 4.48: Espectres d'11- <i>cis</i> -retinal, 9- <i>cis</i> -retinal i tot- <i>trans</i> -retinal a 20°C | 162 |
| Fig. 4.49: Estructures del tot- <i>trans</i> -retinal (A), 9- <i>cis</i> -retinal (B), 11- <i>cis</i> -retinal (C) i β -ionona (D) | 163 |
| Fig. 4.50: Espectres de rodopsina WT, E134Q/E247A i E134Q/E247Q regenerats amb tot- <i>trans</i> -retinal a 20°C | 165 |
| Fig. 4.51: Espectres de rodopsina WT i E134Q/E247A en fosc regenerats amb 9- <i>cis</i> -retinal a 20°C | 166 |
| Fig. 4.52: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot- <i>trans</i> -retinal en fosc a pH=6.0 i 20°C | 167 |
| Fig. 4.53: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot- <i>trans</i> -retinal i acidificada a pH=8 i 20°C | 168 |
| Fig. 4.54: Espectres de rodopsina E134Q/E247A regenerada amb tot- <i>trans</i> -retinal a pH=4.0 i 20°C. | 168 |
| Fig. 4.55: Estructura tridimensional de rodopsina on es mostren les posicions d'unió del tot- <i>trans</i> -retinal i l'11- <i>cis</i> -retinal | 169 |
| Fig. 4.56: Detall del lloc II proposat per ser el lloc d'entrada del retinal | 170 |
| Fig. 4.57: Lloc III, que s'ha especulat per ser el lloc de sortida del tot- <i>trans</i> -retinal | 171 |
| Fig. 4.58: Estructura tridimensional de rodopsina on es mostren les posicions que flanquejarien la cavitat III, la posició d'E247 i la butxaca d'unió al retinal | 171 |

Índex de Taules

| | Pàgina |
|--|---------------|
| I.-Introducció | |
| Taula 1.1: Esquema dels diferents intermediaris generats durant el procés de fotoactivació i les respectives longituds d'ona | 14 |
| Taula 1.2: Comparació entre diferents GPCR de la seqüència d'aminoàcids del entorn del triplet D(E)RY | 18 |
| Taula 1.3: Concentració de zenc en les diverses capes cel·lulars constituents de l'ull | 24 |
| Taula 1.4: Capacitat d'altres ions per competir amb el zenc per la unió a rodopsina | 26 |
| III.-Material i Mètodes | |
| Taula 3.1: Mutants construïts per mutagènesi de lloc dirigit | 53 |
| Taula 3.2: Valors de les longituds d'ona d'absorbància màxima i coeficient d'extinció molar de 11- <i>cis</i> -retinal, tot- <i>trans</i> -retinal i 9- <i>cis</i> -retinal | 69 |
| Taula 3.3: Equacions utilitzades pel càlcul de paràmetres termodinàmics en l'estabilitat de rodopsina en presència i absència de zenc | 76 |
| IV.-Resultats i Discussió | |
| Taula 4.1: Quantitat de rodopsina purificada amb la reïna acoblada a l'anticòs Rho-1D4 | 102 |
| Taula 4.2: Relació A_{280nm}/A_{500nm} obtinguda en les diferents elucions de la rodopsina purificada | 104 |
| Taula 4.3: Temps de vida mitja de la Meta II a diferents concentracions de DM | 106 |

| | |
|--|-----|
| Taula 4.4. Percentatge de formació de MetaIII a diferents concentracions de DM | 107 |
| Taula 4.5. Paràmetres termodinàmics de rodopsina (Les unitats es troben en KCal/mol) | 118 |
| Taula 4.6. Longituds d'ona dels màxims i mínims de l'espectre de la quarta derivada de rodopsina en presència i absència de zenc (200 μ M) | 123 |
| Taula 4.7: Absorbància a $\lambda=500\text{nm}$ i ratio $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$ de rodopsina WT i L46R | 128 |
| Taula 4.8: Longitud d'ona d'absorbància màxima de les rodopsines WT, T94D, T94I, T94K i T94S | 133 |
| Taula 4.9: Taula que mostra els temps de vida mitja de la MetaII dels mutants en la posició 94 | 137 |
| Taula 4.10: <i>Ratios</i> de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q a 20°C | 146 |
| Taula 4.11: <i>Ratios</i> de rodopsina WT, T251A, T251E i T251K a 20°C. | 148 |
| Taula 4.12: <i>Ratios</i> dels espectres WT, E134Q/T251A, E134Q/T251E i E134Q/T251K a 20°C | 149 |
| Taula 4.13: <i>Ratios</i> dels espectres de les rodopsines WT, E247A/T251A, E247A/T251E i E247A/T251K a 20°C | 151 |
| Taula 4.14: <i>Ratios</i> dels espectres de les mostres del WT, E247Q/T251A, E247Q/T251E i E247Q/T251K a 20°C | 152 |
| Taula 4.15: <i>Ratios</i> dels espectres de rodopsines WT, E134Q/E247A/T251A, E134Q/E247A/T251E i E134Q/E247A/T251K a 20°C | 153 |
| Taula 4.16: <i>Ratios</i> dels espectres WT, E134Q/E247Q/T251A, E134Q/E247Q/T251E i E134Q/E247A/T251K a 20°C | 154 |
| Taula 4.17: Temps de vida mitja de rodopsina WT, E134Q, E247A, E247Q, E134Q/E247A i E134Q/E247Q a 45°C | 155 |
| Taula 4.18: Temps de vida mitja dels mutants T251A i T251K a 45°C | 157 |

| | |
|--|-----|
| Taula 4.19 : Temps de vida mitja dels mutants E247Q/T251A i E247Q/T251E a 45°C | 157 |
| Taula 4.20 : Valors d'absorbància i concentració de 9- <i>cis</i> -retinal, 11- <i>cis</i> -retinal i tot- <i>trans</i> -retinal a 20°C | 163 |
| Taula 4.21 : <i>Ratios</i> dels espectres de WT, E134Q/E247A i E134Q/E247Q regenerats amb tot- <i>trans</i> -retinal a 20°C | 164 |