

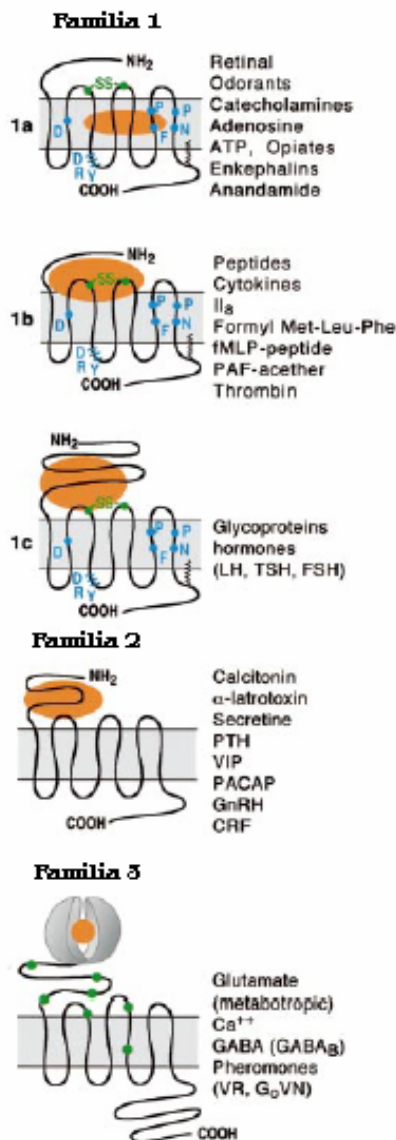
I.INTRODUCCIÓ

I.1.-Receptors acoblats a proteïna G

Els receptors acoblats a proteïna G (*G-protein coupled receptors*, GPCR) són una superfamília de receptors de membrana transductors de senyal constituïda per més de 1000 membres, i en vertebrats representen aproximadament un 1% de la informació codificada pel genoma humà (Bockaert *et al.*, 1999).

Aquests receptors actuen com a dianes farmacològiques, d'aquí la importància de l'estudi dels seus mecanismes d'activació i inactivació.

La superfamília és molt extensa i es classifica evolutivament en diverses famílies que es diferencien pel lligand que iniciarà tot el mecanisme d'activació (Fig. 1.1) (Bockaert *et al.*, 1999).



La família 1. Es desglossa en tres subfamílies en funció del lloc d'unió del lligand. En la subfamília 1a petits lligands s'uneixen a dins de les set hèlices transmembrana; en la subfamília 1b els petits pèptids s'associen a les nanses extracel·lulars, al domini N-terminal i a les parts més exteriors de les hèlices transmembrana; i en la subfamília 1c els petits pèptids s'uneixen al domini N-terminal, que és molt llarg, i també a una cavitat formada per les hèlices 3 i 4 (Trumpp-Kallmeyer *et al.*, 1995).

La família 2 la formen els receptors activats pels pèptids llargs (com el glucagó) i presenten un extrem N-terminal llarg que participa en la unió amb el lligand.

La família 3 està constituïda per receptors de glutamats (metabotrópic), el GABA_β i es caracteritzen per presentar una nansa extracel·lular molt llarga.

Fig. 1.1: Classificació dels GPCR (Bockaert *et al.*, 1999).

I.1.1.- Característiques estructurals

Els GPCR són una superfamília de receptors integrals de membrana que presenten com element distintiu 7 hèlices- α d'entre 22 a 28 aminoàcids cadascuna que travessen la membrana i estan unides entre elles per nanses hidrofíliques (Fig. 1.2). Un dels elements responsables de l'estabilització dels receptors és un pont disulfur format per dues cisteïnes entre les nanses extracel·lulars 2 i 3. L'extrem N-terminal, que es localitza a la part extracel·lular i és on es produeix la unió amb el lligand, no presenta seqüència senyal i conté aminoàcids glicosilats. L'extrem C-terminal es troba a la part citoplasmàtica i es caracteritza per presentar llocs de fosforilació. En determinats receptors s'ha observat que poden dimeritzar i/o oligomeritzar, com per exemple el β_2 -adrenèrgic (Herbert et al., 1996), el receptor m3 muscarínic (Zeng i Wess, 1999) i la rodopsina (Fotiadis et al., 2003 i Liang et al., 2003) i heteroligomeritzar, com l' α_{1a} i α_{1b} -adrenèrgic (Stanasila et al., 2003).

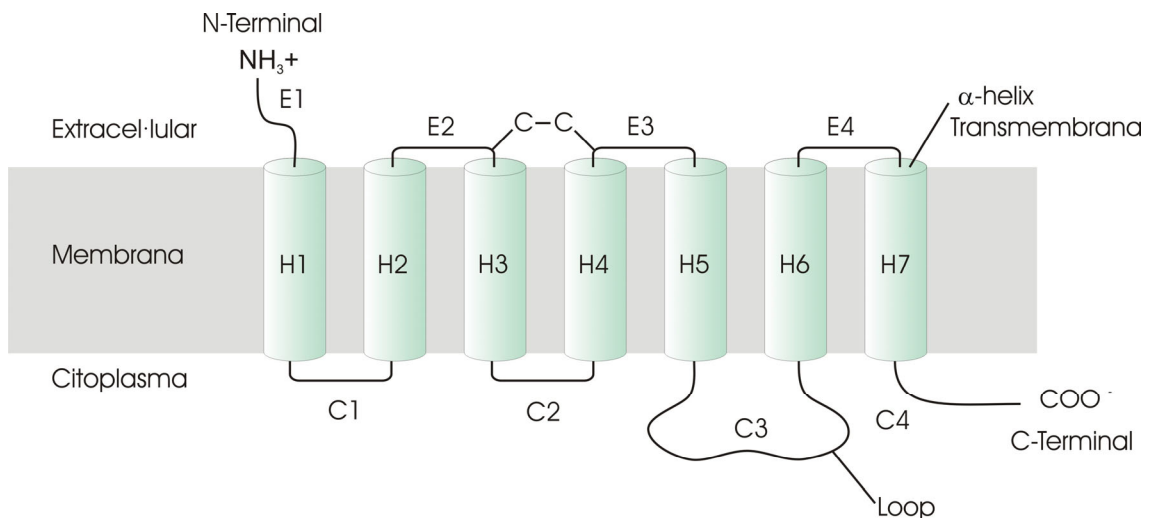


Fig. 1.2: Esquema general d'un GPCR. Es poden observar les set hèlices que travessen la membrana, l'extrem N-terminal orientat en la regió extracel·lular i el C-terminal que es situa a la part intracel·lular.

I.1.2.- Mecanisme d'activació i transducció del senyal

Els GPCR presenten un mecanisme d'activació comú, iniciat per un lligand que en funció de la seva naturalesa es classifica com a: i) no peptídic, com per

exemple la histamina o les prostaglandines, ii) peptídic com la calcitonina, el glucagó o l'oxitocina i iii) sensitius com les substàncies odorants (Strosberg, 1991).

El mecanisme d'activació és iniciat quan el lligand s'uneix al receptor i li provoca un canvi conformacional que li permetrà unir-se a la proteïna G. En la figura 1.3 podem observar els diferents lligands dels GPCR i com el receptor s'uneix a la proteïna G, la qual activarà o inhibirà determinades reaccions cel·lulars.

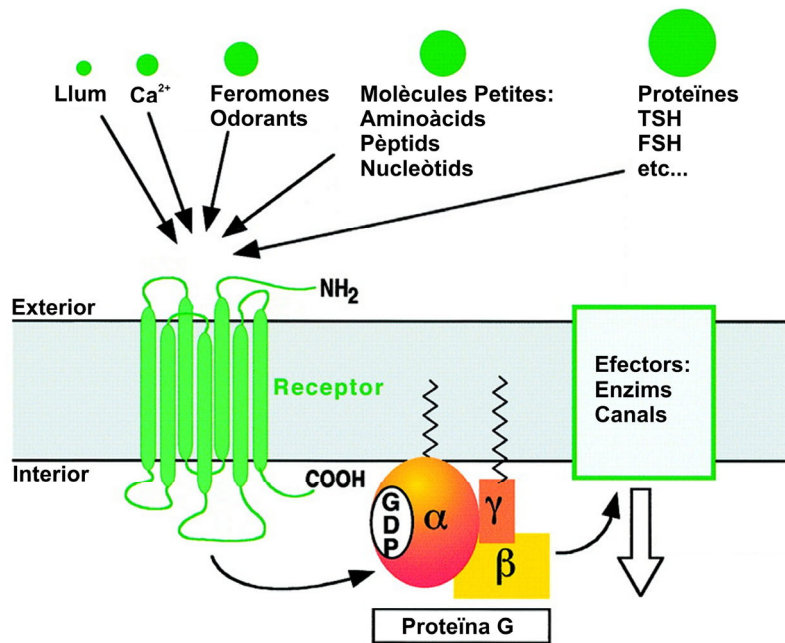


Fig. 1.3: Esquema del mecanisme d'activació d'un GPCR (Bockaert *et al.*, 1999).

En general el canvi conformacional produït en els GPCR a causa de la unió amb el lligand afecta a la conformació de les nanses intracel·lulars 2 i 3, que són un dels punts de reconeixement i d'activació de la proteïna G. En rodopsina s'ha observat que la regió N-terminal de la segona nansa és molt important per a l'activació de la proteïna G mentre que la tercera és la responsable de la interacció i la selectivitat (Yamashita *et al.*, 2000), en l' α_2 -adrenèrgic, en canvi, la segona nansa actua també cooperant amb la tercera, ja que ambdues serveixen per a l'activació de la proteïna G (Eason i Ligget 1996).

La inactivació dels receptors es realitza mitjançant diferents quinases que els fosforilen, en el cas de rodopsina és la rodopsina-quinasa, o bé per la internalització dels receptors, entre d'altres mecanismes. La proteïna G, proteïna heterotrimèrica unida a un nucleòtid de guanina, està constituïda per tres subunitats, la α , la β i la γ . La subunitat α és la que presenta l'activitat GTPasa, i reconeix per una regió al receptor i per l'altre un enzim capaç de desencadenar reaccions intracel·lulars. Les subunitats β i γ actuen regulant l'activitat de l'altra subunitat tot i que també s'hi han associat d'altres funcions. Per exemple s'ha observat que la rodopsina també s'uneix a la subunitat β de la proteïna G (Kelleher i Johnson, 1988).

Els receptors poden unir-se a diferents proteïnes G que són de diferents tipus en funció de la subunitat α que les constitueixen. En mamífers hi ha descrites 20 tipus diferents de subunitats α , 4 de β i 7 de δ (Alberts *et al.*, 1994).

I.2.-La rodopsina: el receptor acoblat a proteïna G visual

I.2.1.- Característiques generals

La rodopsina és un dels membres més estudiats de la superfamília de GPCR. La seva estructura ha estat resolta mitjançant difracció de raigs-X a una resolució de 2.8Å i 2.6 Å i s'observen les 7 hèlices transmembrana i un pont disulfur a la regió extracel·lular (Palczewski *et al.*, 2000; Teller *et al.*, 2001).

El mecanisme d'activació de la rodopsina difereix respecte d'altres membres coneguts d'aquesta superfamília en que aquesta no requereix de la unió amb el lligand per activar-se ja que el té unit en la forma inactiva. Per acció de la llum, el lligand, que està unit estretament a la proteïna, canvia la conformació, modificant la part proteica que permet l'activació de la proteïna G. Aquesta activació desencadena una cascada de reaccions enzimàtiques permetent la transformació del senyal lluminós en un senyal elèctric que és captat pel nervi òptic, a través del qual arribarà fins al cervell.

I.2.2.-Localització

La rodopsina es localitza en una de les tres túniques que formen els ulls dels vertebrats, és concretament a la més interna, que s'anomena retina (Fig. 1.4) (Ruiz *et al.*, 2001).

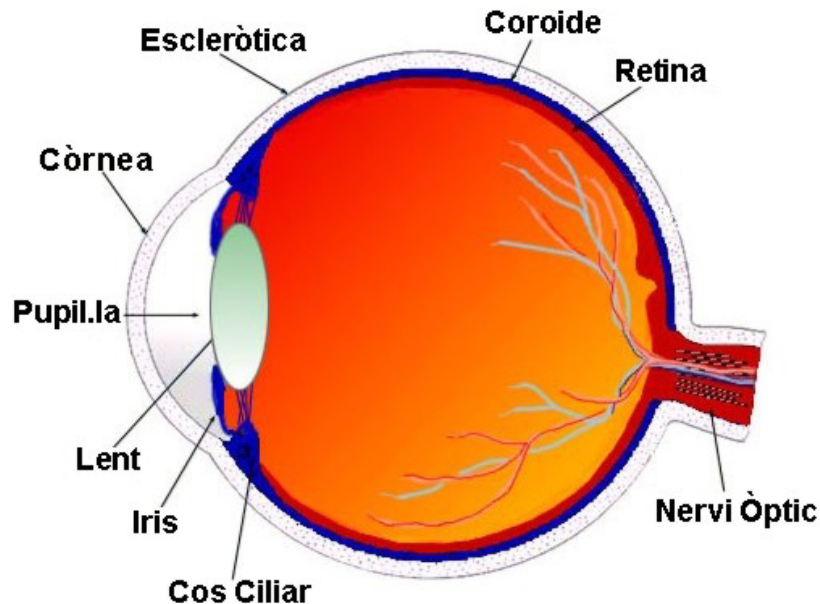


Fig. 1.4: Esquema de l'ull on es mostren les tres túniques que el revesteixen des de l'exterior fins a l'interior; la escleròtica, la coroides i la retina.

La retina revesteix l'ull i està formada per diversos tipus de cèl·lules on s'hi inclouen les cèl·lules de l'epiteli pigmentari, les cèl·lules fotoreceptores, responsables de la captació de la llum, les cèl·lules de Müller, les cèl·lules horitzontals, les cèl·lules bipolars, les cèl·lules amacrines i finalment les cèl·lules ganglionars, els axons de les quals formaran el nervi òptic (Fig. 1.5).

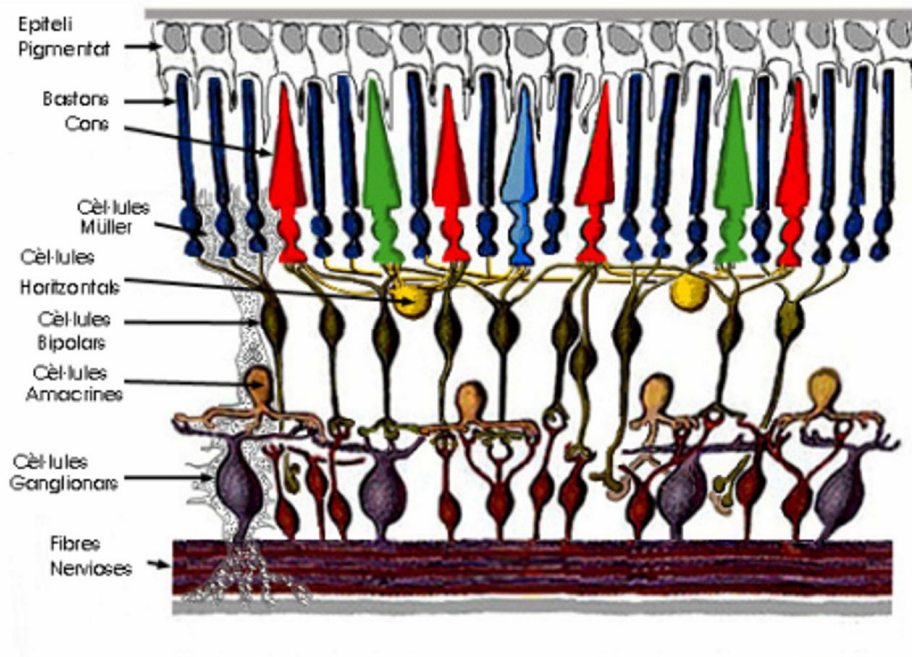


Fig. 1.5: Cèl·lules constituents de la retina, es poden observar els bastons (blau fosc) i els cons (vermell, blau i verd), responsables de la captació de la llum.

Hi ha 2 tipus de cèl·lules fotoreceptores; els bastons i els cons. Els primers són responsables de la visió *escotòpica* mentre que els segons permeten la visió *fotòpica* (Sakmar, 1998). La rodopsina es troba en els bastons i és el fotopigment responsable de la captació de la llum.

Els bastons de la retina estan constituïts per dues parts: el segment intern, que conté els orgànuls cel·lulars necessaris per a la supervivència de la cèl·lula com el nucli i mitocondris, entre d'altres i el segment extern (*rod outer segment*, ROS) el qual presenta un conjunt de discs aplanats generats a partir del cil·lium, regió que separa el segment intern del segment extern (Fig. 1.6). La rodopsina es localitza majoritàriament en les membranes dels discs de ROS, constituint el 85% de la proteïna total present en els discs. La proteïna també es troba a la membrana plasmàtica del bastó, el que representa un 60% de la proteïna total en la cèl·lula (Molday, 1998).

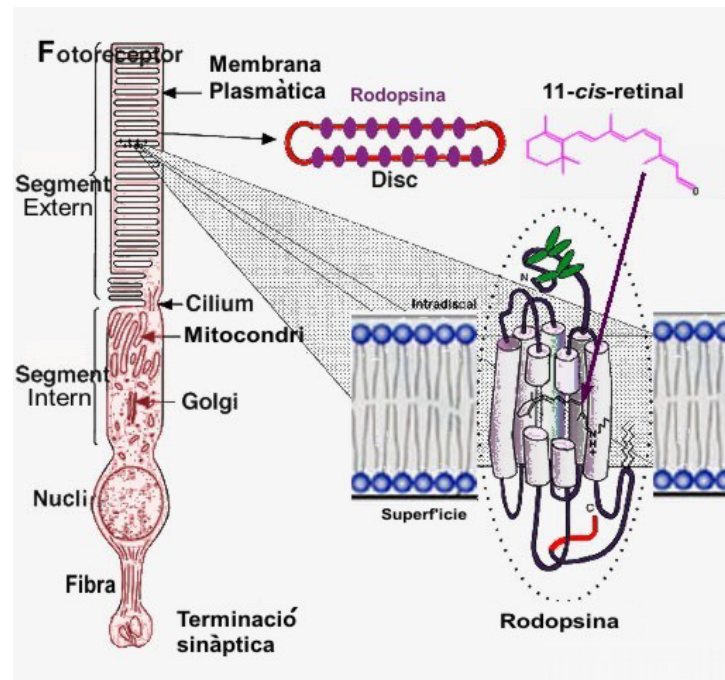


Fig. 1.6: Detall d'un bastó de la retina, anomenat per la seva forma característica de bastó, amb la rodopsina en la membrana del disc (Hargrave, 2001).

I.2.3.- Característiques estructurals

La rodopsina està constituïda per dues parts, la part proteica anomenada opsina i la part cromofòrica, l'11-*cis*-retinal. La unió entre ambdues parts es realitza mitjançant base de Schiff protonada entre el grup aldehid del retinal i el grup amino de la cadena lateral de la K296. La càrrega positiva es troba contrarestada en la proteïna per un aminoàcid proper carregat negativament. En els casos de rodopsina bovina i humana és l'E113 (Sakmar *et al.*, 1989 i Nathans, 1990) però en la línia evolutiva de rodopsina s'ha vist que aquest aminoàcid ha anat variant, per exemple, en invertebrats s'ha observat que l'encarregat de contrarestar la base de Schiff protonada correspondria en rodopsina bovina a l'E181 i s'ha suposat que una espècie ancestral dels vertebrats va adquirir l'E113 (Terakita *et al.*, 2004). En rodopsina bovina s'ha vist que l'aminoàcid 181 és important ja que modula l'estabilitat de la conformació activa, anomenada Metarodopsina II (MetaII) (Yan *et al.*, 2002).

L'opsina presenta un pes molecular de 40000 daltons (Da) i està constituïda per 348 aminoàcids que es troben distribuïts en tres regions. La regió extracel·lular

en la que es pot remarcar la presència de tres nanses; d'un pont disulfur, format per C110 i C187, que és un element responsable de l'estabilitat de la conformació inactiva (Davidson *et al.*, 1994), i dues Asn glicosilades (aminoàcids 2 i 15). S'ha vist que mentre mutacions de rodopsina en N2 no alteren el plegament, el transport cel·lular ni la funció per activar a la proteïna G, mutacions en N15, afecten el plegament, el transport fins a la membrana i l'activació de la proteïna G (Kaushal *et al.*, 1994). La regió intracel·lular està formada per quatre nanses, on la segona i la tercera actuen en l'activació i/o unió de la proteïna G (Yamashita *et al.*, 2000) i la part N-terminal de la quarta nansa que en modularia la unió (Marin *et al.*, 2000). En aquest domini a més a més hi podem trobar dues Cys palmitoilades (C322 i C323) que es troben ancorades a la membrana i que permeten la formació de la quarta nansa (Konig *et al.*, 1989) que conté una vuitena hèlix paral·lela a la membrana. La regió transmembrana amb les set hèlices és una estructura molt compacta on es troba la K296 que és la responsable de la unió amb l'11-*cis*-retinal (Fig 1.7).

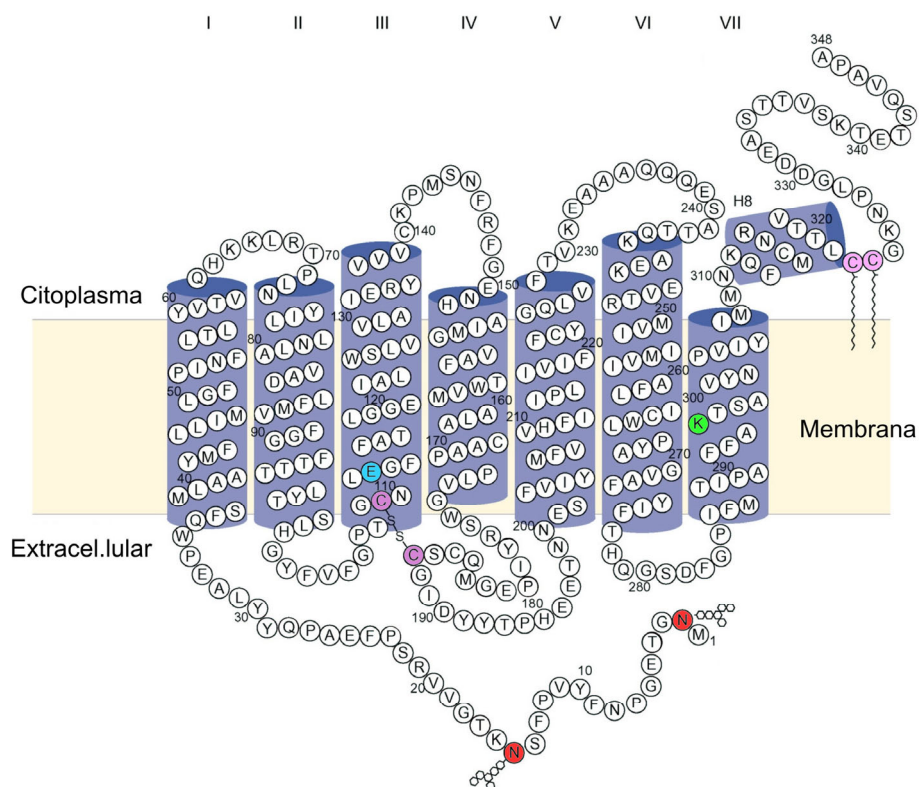


Fig. 1.7: Estructura secundària de la rodopsina. En blau fosc es mostren les 7 hèlices transmembrana i els tres dominis; extracel·lular, citoplasma i membrana. En verd es marca la K296, en blau l'E113, en vermell les N2 i N15 glicosilades i en lila es marquen les cisteïnes palmitoilades i les implicades en el pont disulfur (Abdulaev, 2003).

Els aminoàcids de la regió transmembrana han estat classificats en diverses categories segons si estaven implicats en l'estabilització del retinal dins de la proteïna o bé si actuaven d'intermediaris entre el canvi conformacional del retinal per l'acció de la llum i la part intracel·lular per a la interacció amb la proteïna G (Sakmar, 1998). En l'hèlix 3, hi ha el triplet d'aminoàcids ERY que és un element molt conservat en els GPCR (D(E)RY(S)) i és important en l'activació de la proteïna G. Més endavant s'aprofundirà en l'estudi d'aquesta regió.

L'*11-cis*-retinal està en contacte amb la proteïna per la K296 i pels aminoàcids que l'envolten dins la butxaca d'unió en l'interior de la proteïna, anomenada butxaca del retinal, que l'estabilitzen i transfereixen el canvi produït per la isomerització del retinal a l'opsina després de l'absorció d'un fotó de llum (Fig. 1.8).

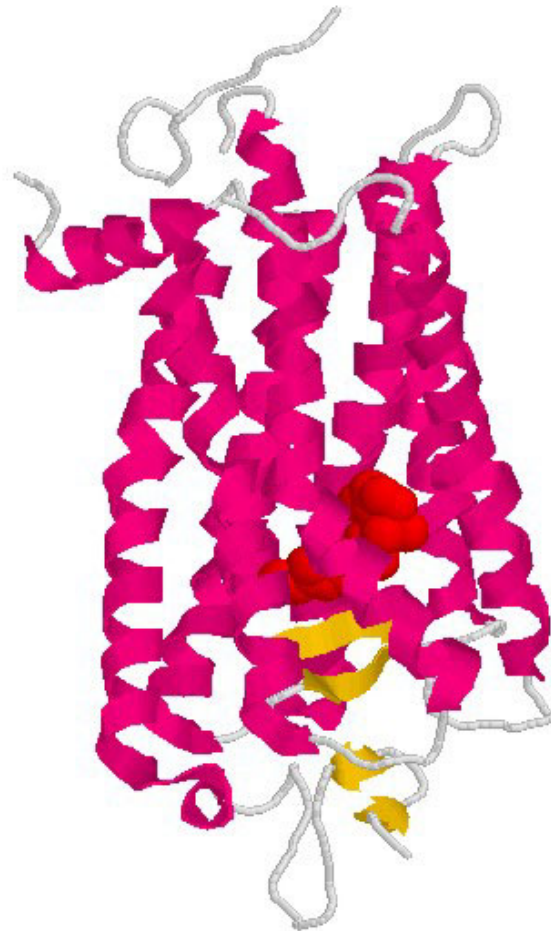


Fig. 1.8: Estructura tridimensional de la rodopsina. En rosa es mostren les hèlices- α , en groc els fulls- β i l'*11-cis*-retinal en vermell.

Els aminoàcids que formen la butxaca del retinal són M44, L47, T94, A117, T118, G121, E122, E181, M207, H211, F212, F261, Y268, A269, W265, F293, A295 i K296 (Fig. 1.9).

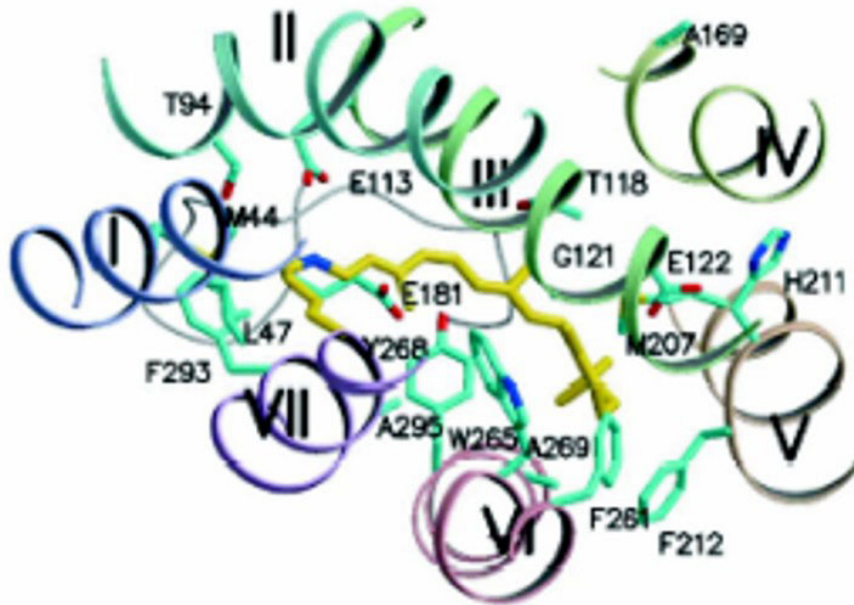


Fig. 1.9: Detall de la butxaca del retinal de la rodopsina. Es poden observar els diferents aminoàcids implicats en l'estabilització del retinal dins de la proteïna (Palczewski *et al.*, 2000).

Un element important en la rodopsina és la presència d'aigua en la seva estructura. En l'estructura cristal·lina de la bacteriorodopsina, una bomba de protons dependent de la llum que està present en la membrana del bacteri *Halobacterium salinarum* i responsable de la seva fototaxi, s'han observat molècules d'aigua que estableixen determinades zones de la proteïna (Luecke *et al.*, 1999). En l'estructura tridimensional de la rodopsina, ja s'havia observat la presència de molècules d'aigua però sense definir-ne cap funció concreta. Posteriorment s'ha determinat que juga un paper de mitjancer en les xarxes d'interaccions electrostàtiques de la conformació inactiva i activa de la rodopsina (Okada *et al.*, 2002).

I.2.4.- Mecanisme de transducció del senyal

El procés d'activació de la rodopsina s'inicia per la llum, que en arribar a l'ull, incideix en la retina i és captada per les cèl·lules fotorreptores, cons i bastons, mitjançant els pigments que contenen (Fig. 1.10).

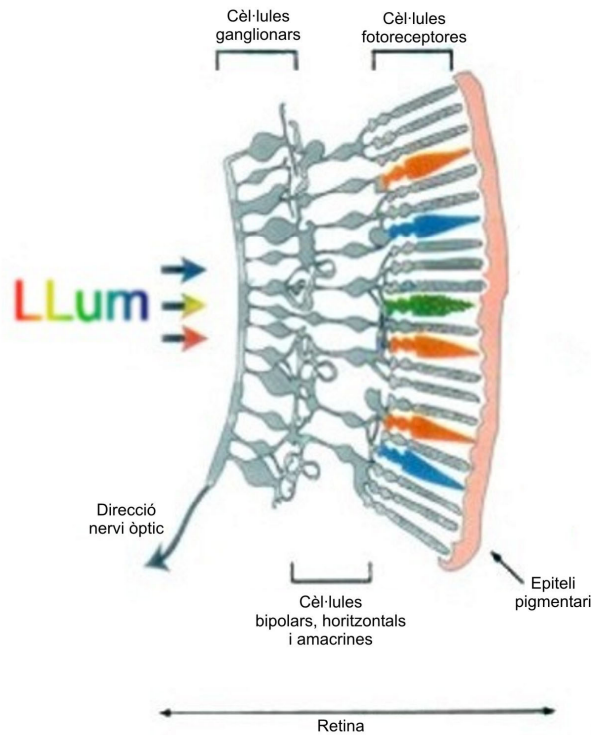
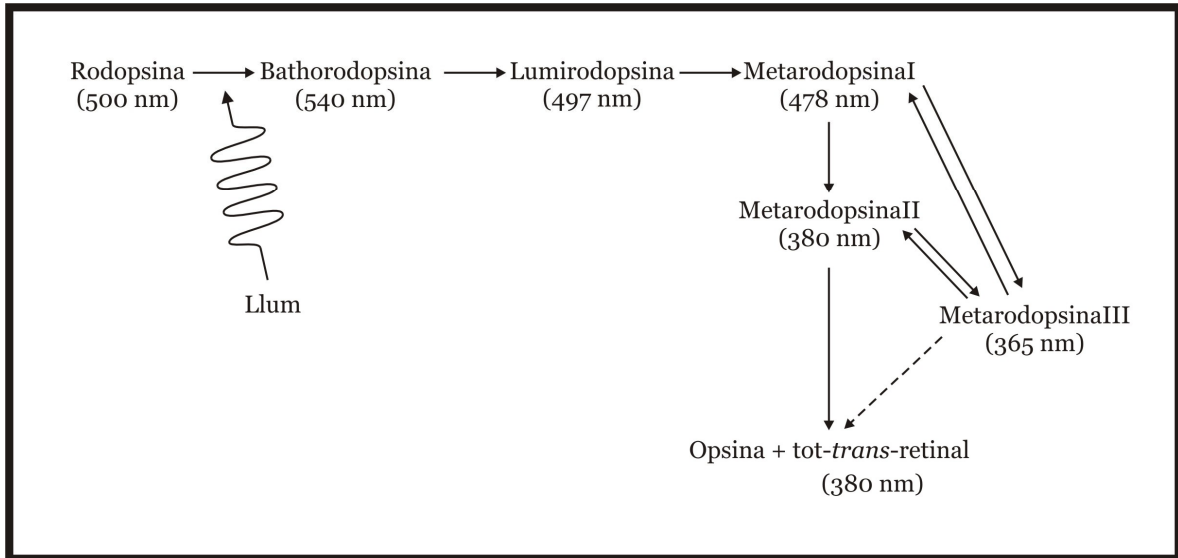


Fig. 1.10: Pas de la llum a través de la retina, travessa les diferents capes cel·lulars fins arribar a les cèl·lules fotorreptores.

La llum és captada per l'11-*cis*-retinal, que s'isomeritza a tot-*trans*-retinal passant per diferents intermediaris. Aquesta reacció és de les més ràpides de la naturalesa i es produeix en l'ordre de femtosegons. Les diferents espècies químiques que participen en aquesta reacció es presenten en la taula 1.1. L'11-*cis*-retinal capta la llum i provoca que la rodopsina es transformi en diferents intermediaris fins arribar a Metarodopsina I (MetaI). Aquesta pot derivar a la forma activa, MetaII, o bé a Metarodopsina III (MetaIII) (Vogel *et al.*, 2004). La MetaII, pot separar-se en opsina i tot-*trans*-retinal o bé derivar cap a MetaIII, que actuaria de reservori d'opsina unida a tot-*trans*-retinal (Heck *et al.*, 2003). I

la MetaIII podria formar de nou MetaI, MetaII o bé per una hidròlisi més lenta es separaria el tot-*trans*-retinal de l'opsina.



Taula 1.1: Esquema dels diferents intermediaris generats durant el procés de fotoactivació i les respectives longituds d'ona. Cadascun d'aquests intermediaris es pot detectar treballant a baixes temperatures per aturar el procés a diferents punts. (-----> hidròlisi lenta) (Sakmar, 1998; Heck *et al.* 2003 i Vogel *et al.*, 2004).

Un cop s'ha assolit l'estat en que l'opsina i el tot-*trans*-retinal estan separats, el retinal és regenerat de nou a 11-*cis*-retinal en les cèl·lules de l'epiteli pigmentari. Quan la rodopsina és activa, reconeix i s'uneix a la seva proteïna G, anomenada transducina.

Quan la rodopsina ha interaccionat amb la transducina, la subunitat α d'aquesta, es separa de les subunitats β i γ i activa la fosfodiesterasa 6 que és un enzim que hidrolitza el GMPc present en els ROS convertint-lo en GMP. Aquesta reacció impedeix que els canals de calci dependents de GMPc continuïn oberts i en conseqüència els nivells d'aquest catió a l'interior de la cèl·lula fotoreceptora disminueixen. Per mantenir els nivells de calci, la cèl·lula disposa d'un canal intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que permet l'entrada de calci a canvi de sodi. Es produeix doncs en la cèl·lula una disminució de sodi provocant la hiperpolarització de la membrana, la qual es transduirà a la membrana de les cèl·lules de les capes superiors de la retina fins al nervi òptic on el senyal serà enviat al cervell (Moday, 1998). Aquest procés s'esquematitza en la figura 1.11.

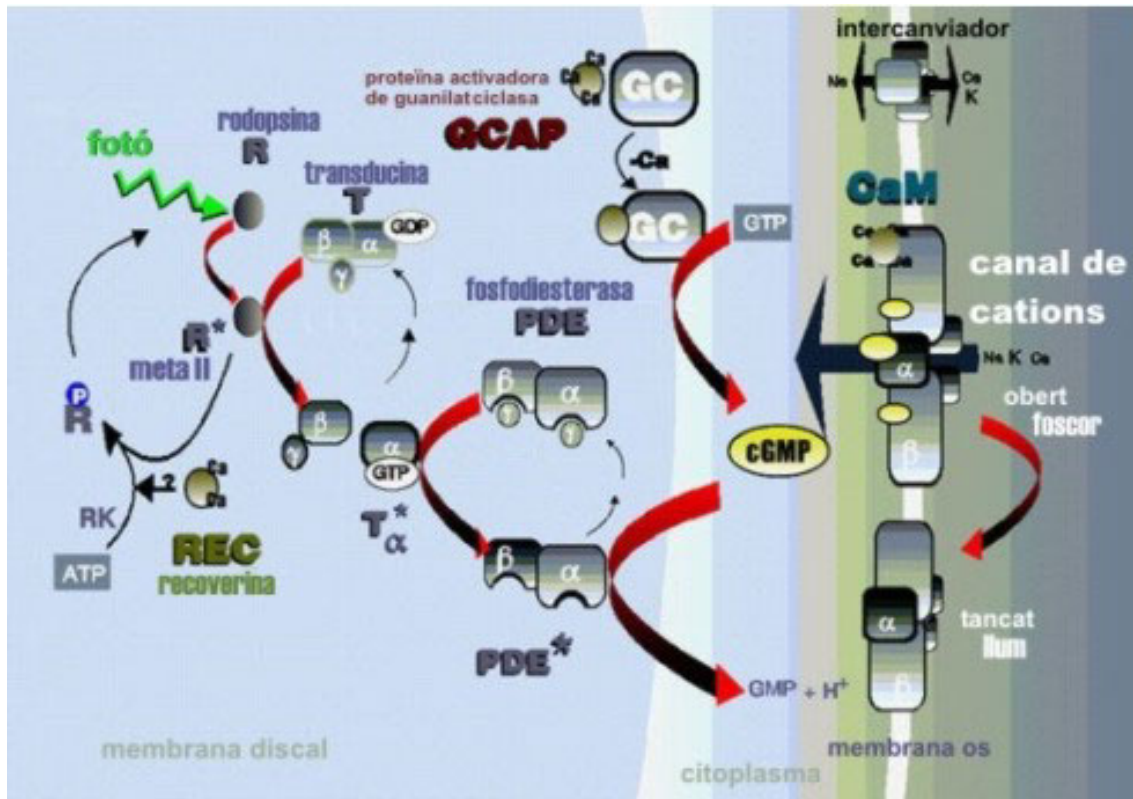


Fig. 1.11: Esquema del mecanisme de transducció del senyal iniciat per la llum. L'asterisc ens mostra les proteïnes que es troben activades; GC, guanilat ciclasa; RK, rodopsina quinasa; OS: *outer segment*).

El final de la fotoactivació es produeix quan la rodopsina és inactivada per una fosforilació depenent d'ATP en el seu extrem C-terminal mitjançant l'enzim rodopsina quinasa. La rodopsina fosforilada és reconeguda per una proteïna anomenada S-antigen o arrestina, que forma part d'una família d'arrestines, que són responsables de la regulació de l'activitat dels GPCR. Aquesta proteïna és la segona de les proteïnes solubles que hi ha en més quantitat en el segment extern dels bastons i també s'ha localitzat en les cèl·lules de l'epiteli pigmentari (Nicolas *et al.*, 2000). Els punts d'unió de l'arrestina amb la rodopsina són S251 i S252 de l'arrestina amb els aminoàcids d'entre 340 i 348 de la rodopsina (Smith *et al.*, 2004).

El recent descobriment de la dimerització de la rodopsina (Fotiadis *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003) ha matisat aquest mecanisme d'activació, sobretot en el pas en que la rodopsina activa s'uneix a la transducina. Se sap que la part intracitoplasmàtica d'una molècula de rodopsina és massa petita per ancorar les tres subunitats de la proteïna G (Wessling-Resnick i Johnson, 1987) en canvi la

superfície intracel·lular proporcionada pel dímer si que permetria encabir-les. També recentment s'ha especulat que una de les rodopsines del dímer permetria l'activació de la transducina mentre que l'altre actuaria de suport físic per ancorar les altres subunitats (Filipeck *et al.*, 2004). Apart de la dimerització de rodopsina, s'ha vist que la membrana dels discs i de les cèl·lules fotoreceptores presenten uns *clusters*, anomenats rais (*rafts*) formats per un cert nombre de rodopsines (dímers) i lípids que permetria concentrar la resposta de la llum a llocs concrets de la membrana explicant el perquè tantes molècules de rodopsina poden activar alhora poques molècules de transducina (Nair *et al.*, 2002).

I.2.5.- Propietats espectroscòpiques de la rodopsina

L'11-*cis*-retinal, el cromòfor de la rodopsina, en solució etanòlica presenta un pic d'absorció en l'ultraviolat-visible (UV-Vis) a una longitud d'ona de 376 nm mentre que quan es troba unit a l'opsina, presenta un màxim a 500 nm (Fig. **1.12B**). Aquestes diferències en la longitud d'ona són degudes al canvi en l'entorn del retinal.

Es pot seguir el canvi de conformació quan la rodopsina és il·luminada mitjançant espectrofotometria UV-Vis. Quan la proteïna es troba en conformació inactiva presenta un màxim d'absorció a 500 nm a causa de l'entorn del retinal dins la proteïna i per la base de Schiff protonada, mentre que en MetaII presenta un màxim d'absorbància a 380 nm donat pel tot-*trans*-retinal encara unit a la apoproteïna en un entorn diferent que quan la proteïna és en conformació inactiva i a la desprotonació de la base de Schiff (Fig. **1.12A**). La base de Schiff es reprotona si s'afegeix àcid a la mostra de rodopsina i s'observa que es produeix un desplaçament del màxim pic d'absorbància a 440 nm el qual ens permetrà quantificar quina proporció del pic detectat a 380 nm correspon a l'estat MetaII i diferenciar-lo de la contribució del tot-*trans*-retinal que ja s'ha alliberat.

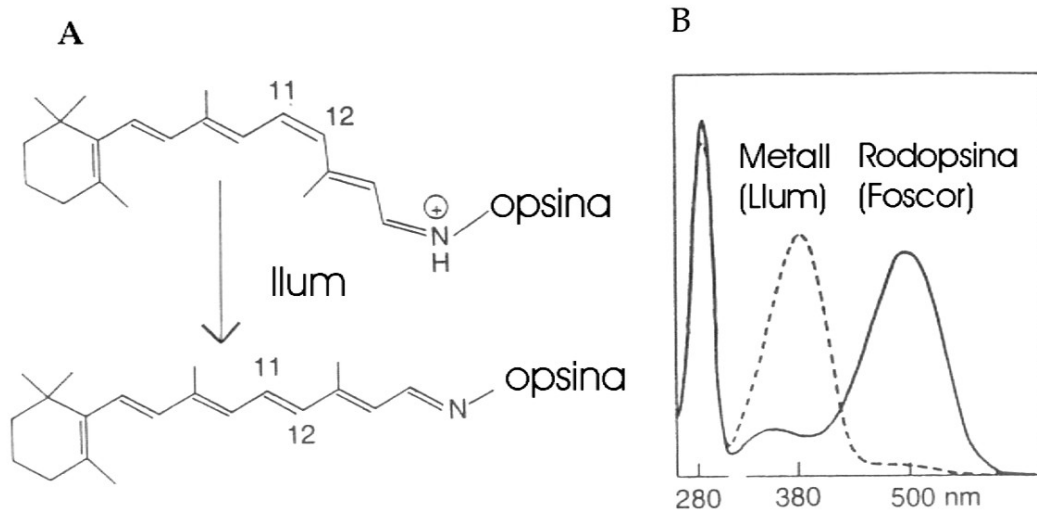


Fig. 1.12: **A:** El *11-cis-retinal* quan capta la llum s'isomeritza a la forma *tot-trans-retinal*. **B:** La captació de la llum per part del retinal, provoca un canvi en l'espectre d'absorció.

El canvi en l'espectre d'absorció entre la rodopsina en foscor (500 nm), il·luminada (380 nm) i després d'haver afegit àcid per tal de reprotonar la base de Schiff (440 nm) es mostren a la figura 1.13.

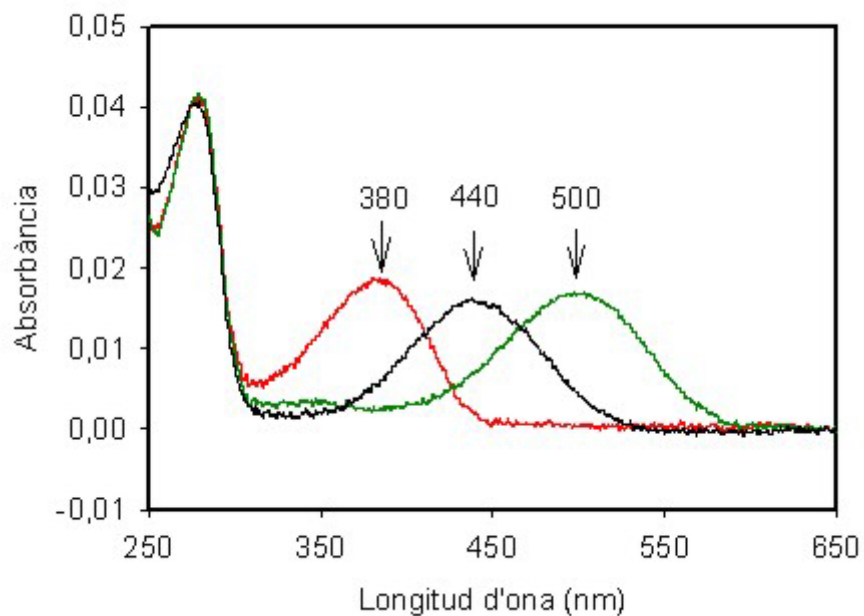


Fig. 1.13: Espectres d'absorció d'una mostra de rodopsina abans d'il·luminar (verd), després d'il·luminar (vermell) i després de l'acidificació (negre).

I.2.6.- Importància del moviment de les hèlices 3 i 6 en l'activació de la rodopsina

En el procés d'activació dels GPCR, s'ha vist que el moviment relatiu de les hèlices 3 i 6 hi juga un paper molt important. En rodopsina s'ha descrit que la isomerització de l'11-*cis*-retinal provoca una reorganització dels contactes entre les hèlices 3 i 6 i un moviment acoblat entre les hèlices 5, 6 i 7 així com canvis en les nanses citoplasmàtiques, que són els responsables de la interacció i activació de la transducina (Farrens *et al.*, 1996 i Patel *et al.*, 2004). Tal i com s'ha comentat anteriorment, en l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix 3 hi ha la presència d'un triplet d'aminoàcids altament conservat que és el D(E)RS(Y), en la taula 1.2 es pot observar la seqüència d'aquesta regió en diferents GPCR.

Tipus de Receptor	Seqüència
β2-Adrenèrgic Humà	DVLCVTASIE ^T LCVIAV DRY
β2-Adrenèrgic Rata	DVLCVTASIE ^T LCVIAV DRY
β1-Adrenèrgic Gall d'indi	DVLCVTASIE ^T LCVIAL DRY
β1-Adrenèrgic Humà	DVLCVTASIE ^T LCVIAL DRY
Muscarínic Colinèrgic Rata M1	DYVASNASVMNLL LISFDRY
Muscarínic Colinèrgic Rata M2	DYVVSNASVMNLL LIISFDRY
Muscarínic Colinèrgic Rata M3	DYVASNASVMNLL VISFDRY
Muscarínic Colinèrgic Rata M4	DYVVSNASVMNLL LIISFDRY
Opsina Bovina	ATLGGEIALW SLVVLAIERY
Opsina Humana	ATLGGEIALW SLVVLAIERY

Taula 1.2: Comparació de la seqüència d'aminoàcids de l'entorn del triplet D(E)RY entre diferents GPCR (Fraser *et al.*, 1988).

En rodopsina, aquest triplet el formen els aminoàcids E134-R135-Y136 on s'ha descrit que el parell iònic 134-135 és important per a l'activació de la transducina (Franke *et al.*, 1990). Qualsevol canvi en aquesta interacció no només pot afectar a l'activació de la proteïna G (Arnis *et al.* 1994) sinó també a la glicosilació de la proteïna (Jansen *et al.* 1991). La rodopsina presenta 3 valines (V137-V138-V139), que donada la seva hidrofobicitat impedeixen el contacte d'aquest parell iònic amb el citoplasma (Ballesteros *et al.* 1998).

En l'estructura tridimensional de la rodopsina, els aminoàcids més propers al triplet de l'extrem citoplasmàtic són l'E247 i la T251 de l'hèlix 6 (Teller *et al.*, 2001). S'ha vist que mutacions en aquestes posicions en altres membres de la superfamília promouen la seva activitat constitutiva, com en el β_2 -adrenèrgic (Ballesteros *et al.*, 2001), el 5-hidroxitriptamina 2A (Shapiro *et al.*, 2002) en la posició 247 i el μ -opioid (Huang *et al.*, 2002) en la posició 251, entre d'altres.

En aquest treball es caracteritzen mutants de rodopsina en les posicions 134, 247 i 251 per tal d'estudiar quin és l'efecte de la xarxa electrostàtica entre les hèlices 3 i 6 en la conformació i estabilitat de la proteïna.

I.2.7- Malalties de la retina associades a mutacions de rodopsina

I.2.7.1.- La retinosi pigmentària

La retinosi pigmentària (RP) és una malaltia ocular que engloba diverses malalties similars tant genèticament com en els símptomes clínics. La seva incidència és d'una de cada 5000 persones (Kalloniatis i Fletcher, 2004).

Els malalts de RP es caracteritzen per patir una degeneració gradual de les cèl·lules fotoreceptores iniciada en els bastons, i posteriorment de les membranes externes de la retina i en estats més avançats es pot presentar atròfia de les cèl·lules del epitel·li pigmentari; atenuació dels vasos sanguinis que conflueixen en la retina, dipòsits pigmentaris, despigmentació i pal·lidesa del disc òptic (Fig. 1.14).

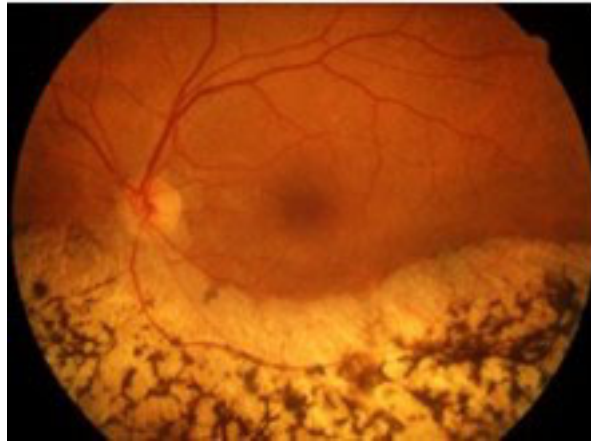


Fig. **1.14**: Fons de l'ull d'un individu malalt de l'RP. En la part inferior es mostren els dipòsits pigmentaris característics de la malaltia.

Els malalts també es caracteritzen per presentar reduïda la visió nocturna i la mig perifèrica i en etapes molt avançades es produeix l'efecte túnel. En la figura **1.15** observem les diferències existents entre la visió d'un individu sa respecte la d'un individu malalt de l'RP.

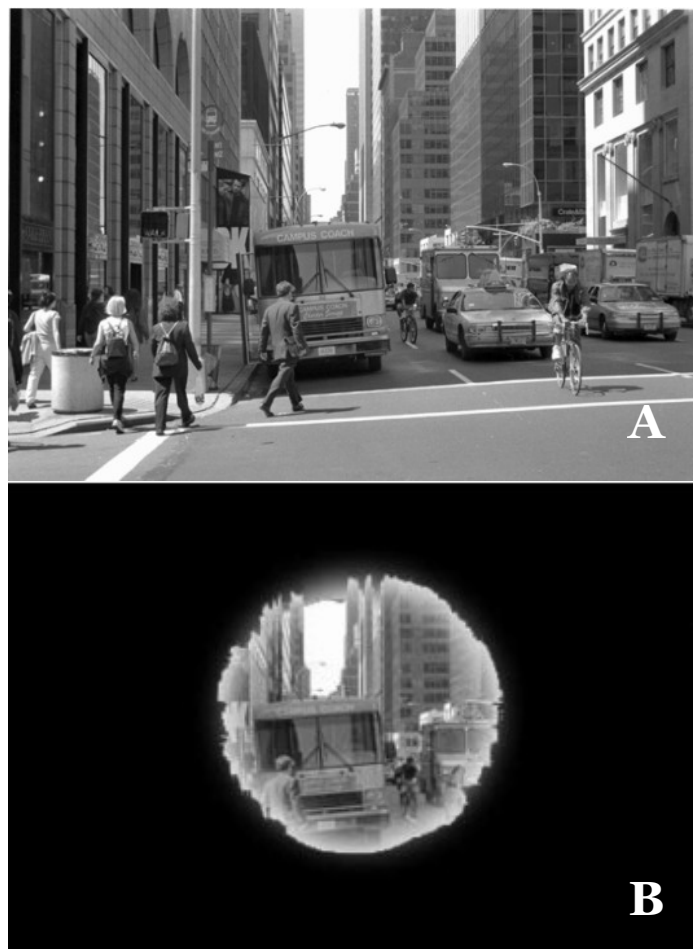


Fig. **1.15**: Visió d'un individu sa (A) i malalt de l'RP (B) a on s'aprecia l'efecte túnel.

La transmissió de l'RP és hereditària i pot classificar-se en RP transmesa per herència autosòmica dominant (31% de afectats), autosòmica recessiva (16 %), lligada al sexe (9 %) que es la manifestació més severa i en casos esporàdics (44 %) (Heckenlively *et al.*, 1988 i Kalloniatis i Fletcher, 2004).

S'han localitzat més de 150 mutacions que afecten al gen de la rodopsina i poden afectar al seu plegament, a la seva funció i en alguns casos poden donar lloc a proteïnes truncades (Fig. 1.16) (Farrar *et al.*, 2002).

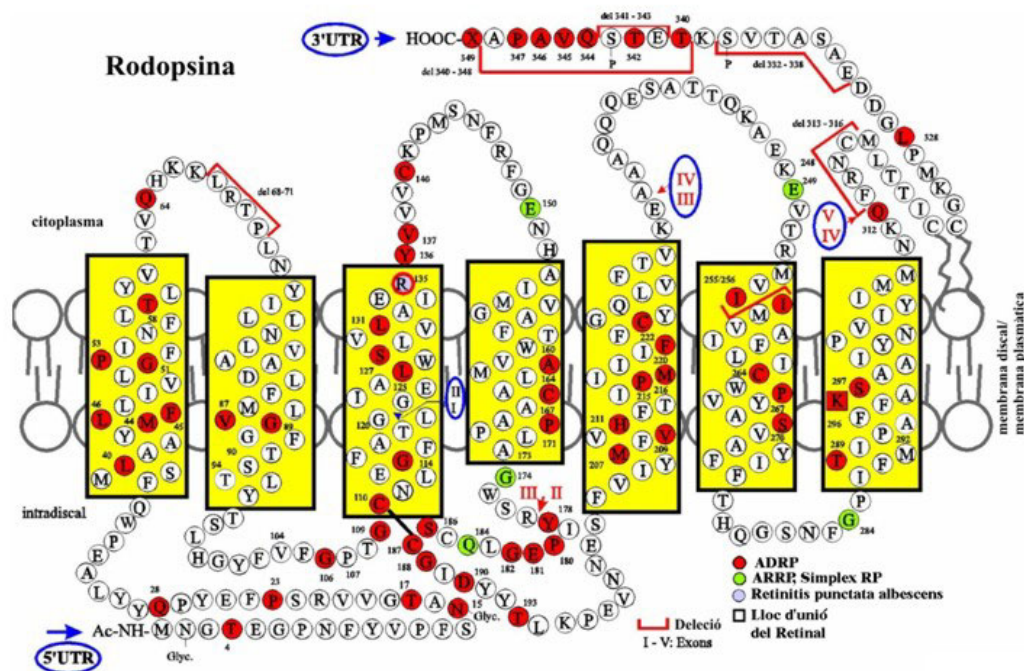


Fig. 1.16: Mutacions de rodopsina associades a l'RP (ADRP, autosomal dominant RP i ARRP, autosomal recessive RP).

Les mutacions localitzades en rodopsina s'han classificat de diverses maneres, en són exemples les classificacions proposades per Sung (Sung *et al.*, 1991) i Doi (Doi *et al.*, 1990) .

No s'ha descrit cap teràpia efectiva per a l'RP però des de fa anys s'ha utilitzat la vitamina A com a suplement nutricional per reduir els efectes de la malaltia (Berson, 2000). Actualment s'estan estudiant aproximacions de teràpia gènica i trasplantaments de cèl·lules de la retina per curar definitivament la malaltia (Lu *et al.*, 2002; Sagdullaev *et al.*, 2003). En aquest treball es caracteritzarà espectroscòpicament i electroforèticament el mutant L46R (Rodriguez *et al.*,

1993) que es troba localitzat a la primera hèlix transmembrana encarat cap a la membrana (Fig. 1.17).

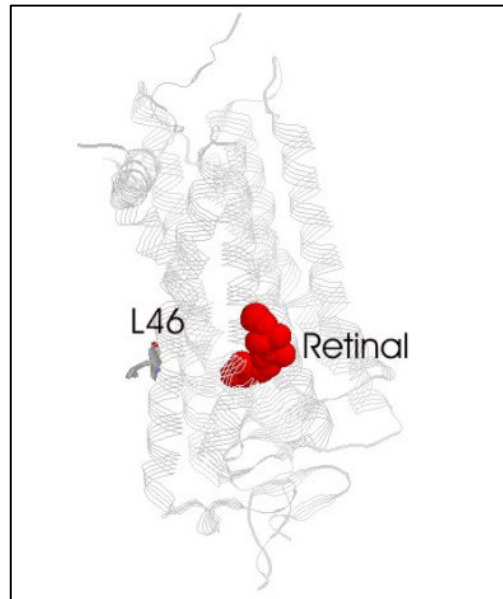


Fig. 1.17: Estructura tridimensional de la rodopsina on es mostra la localització de la posició 46. Es representa el retinal i la L46 en la primera hèlix de la proteïna.

I.2.7.2.- La ceguesa nocturna congènita

La ceguesa nocturna congènita (CNC) és una malaltia que presenta una simptomatologia semblant als estadis primaris de l'RP però els malalts tenen afectada només la seva visió en la foscor i mantenen la visió diürna al llarg de tota la vida. No s'ha detectat degeneració de les cèl·lules de la retina, almenys fins edats avançades (Sieving *et al.*, 1995).

És una malaltia genèticament classificada com a autosòmica dominant i recessiva i lligada al sexe. Fins a l'actualitat, s'han localitzat tres mutacions en rodopsina que provoquen la malaltia i són; G90D (Rao *et al.*, 1994), T94I (al-Jandan *et al.*, 1999) i A292E (Dryja *et al.*, 1993) que es transmeten mitjançant un patró d'herència autosòmica dominant.

Els treballs realitzats en G90D (Rao *et al.*, 1994) i A292E (Dryja *et al.*, 1993), demostren que aquests aminoàcids poden competir amb el contraió de la base de Schiff, l'E113, per la seva proximitat. La mutació en T94 també es troba localitzada en l'entorn de la base de Schiff, tal i com es pot observar en la figura 1.18.

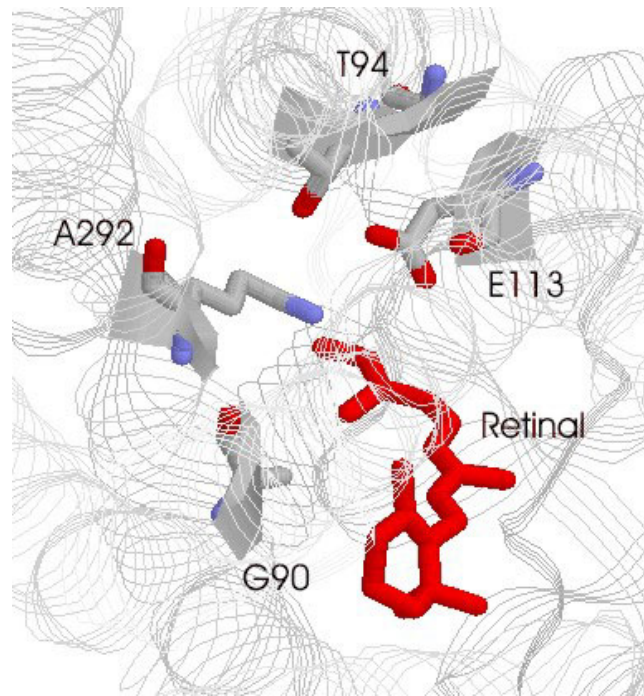


Fig. 1.18: Detall de l'entorn de la base de Schiff. Es pot observar en detall la proximitat dels diferents aminoàcids involucrats en la CNC.

En aquest treball es caracteritza el mutant de CNC T94I i la posició 94 en general construint diversos mutants per evidenciar com aquesta posició és important en la xarxa electrostàtica estabilitzadora a l'entorn de la base de Schiff (Janz i Farrens, 2004).

I.3.-El zenc

I.3.1.-Importància del zenc en les funcions fisiològiques de l'organisme

El zenc és un element essencial en plantes i animals, en l'home el contingut de zenc és aproximadament de 2 grams. Deficiències en zenc poden provocar pèrdues de pes, retard en el creixement, anorèxia, maduració sexual retardada i altres disfuncions en l'organisme (Grahn *et al.*, 2001). Es troba present en moltes funcions fisiològiques realitzant un paper estructural i catalític. Per exemple s'ha trobat en almenys 300 metal·loenzims que requereixen zenc unit en els llocs actius per realitzar la seva activitat com la fosfatasa alcalina i l'alcohol deshidrogenasa. És transportat a través del plasma per diverses

proteïnes, com l'albumina, i s'ha descrit una família de transportadors de zenc (Wu *et al.*, 1993). Es diposita intracel·lularment a la retina, al múscul, en els ossos, en el cabell, en el fetge i a la pell. L'ull és el teixit en que hi ha la concentració més elevada de zenc, on el catió es troba distribuït amb una certa heterogeneïtat a les diferents capes cel·lulars (Taula 1.3).

+ Zn ²⁺	- Zn ²⁺
retina>coroide>cos ciliar> iris>nervi òptic>escleròtica>còrnia>crystal·lí	

Taula 1.3: Concentració del zenc en les diverses capes cel·lulars constituents de l'ull (Grahn *et al.*, 2001).

1.3.2.- El zenc a l'ull

En els teixits oculars, hi ha gran part d'enzims que requereixen zenc per poder realitzar la seva activitat, especialment en l'epiteli pigmentari de la retina, cos cil·liar, el cristal·lí i les fibres de Müller. S'han observat elevats nivells de zenc en la fracció proteica de ROS aïllats de retines bovines en experiments "in vitro" i s'ha vist que la incorporació del zenc en aquesta fracció és depenent de la llum (Tam *et al.*, 1976).

En la figura 1.19 es citen els processos en que es troba implicat el zenc; un d'ells és el metabolisme de la Vitamina A on participa en la biosíntesi de la proteïna d'unió al retinol i en la conversió enzimàtica del retinol a retinal (Leure-duPree, 1981). També podria influir en la conformació de determinades proteïnes de membrana, en la interacció proteïna-membrana i pot regular la transducció del senyal, ja que s'ha vist que pot augmentar la fosforilació de la rodopsina (Shuster *et al.*, 1996).

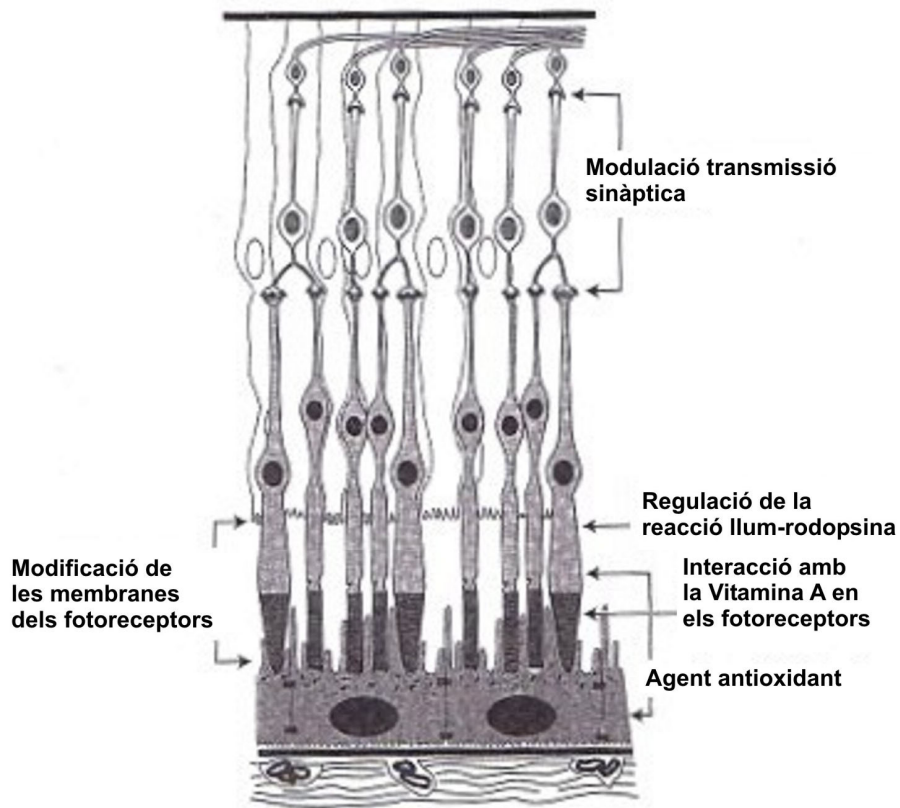


Fig. **1.19**: Funcions del zinc en la retina. El zinc pot actuar en diferents punts de la retina, sobretot a nivell dels fotorceptors realitzant funcions antioxidants, reguladores o modificadores de les propietats de la membrana plasmàtica (Grahn *et al.*, 2001).

Experiments de competició realitzats en ROS determinen que la rodopsina pot unir zinc en la part extracel·lular i de forma selectiva. En la taula **1.4**, podem observar la capacitat dels ions per unir-se als llocs d'unió del zinc en rodopsina il·luminada situada en membranes de discs on el zinc s'uneix a rodopsina de manera específica i l'únic competidor és el coure (Shuster *et al.*, 1992).

Competidor	Unió de Zenc (%)
Cap	100
Cadmi	62
Calci	98
Cobalt	64
Coure	6.7
Plom	83
Magnesi	101
Manganès	99
Zenc	5.4
EDTA	5.3

Taula 1.4: Capacitat d'ions per competir amb el zenc en la rodopsina (Shuster et al, 1992).

També s'ha observat el zenc unit en l'estructura tridimensional de la rodopsina (Palczewski *et al.*, 2000) (Fig. 1.20).

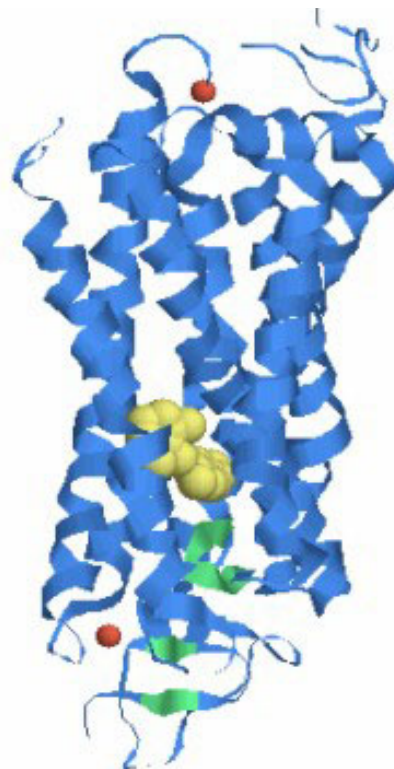


Fig. 1.20: El zenc en l'estructura de la rodopsina (Palczewski *et al.*, 2000). En vermell, es pot observar els àtoms de zenc, en blau les hèlix α , en verd els fulls β i en groc el retinal.

Deficiències en zenc poden provocar alteracions en ROS i causar anomalies en l'adaptació a la llum (Leure-duPree i McClain, 1982). Relacionat amb les malalties retinodegeneratives com l'RP, s'ha observat que suplementos de zenc en malalts han presentat millores en la simptomatologia clínica de la seva malaltia (Berson, *et al.* 2000).

En aquest treball s'estudiarà l'efecte del zenc en l'estabilitat de la conformació activa i inactiva de la rodopsina.