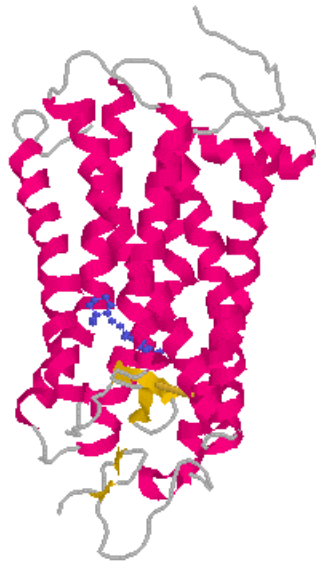


Tesi Doctoral

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL I
FUNCIONAL DE MUTANTS DE RODOPSINA
ASSOCIATS A RETINOSI PIGMENTÀRIA



Ana Andrés Perni
Març, 2002

Unitat de Biofísica
Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL I FUNCIONAL DE MUTANTS DE RODOPSINA ASSOCIATS A RETINOSI PIGMENTÀRIA

Memòria presentada per Ana Andrés Perni per optar al grau de Doctor en Ciències
Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biofísica del Departament de
Bioquímica i de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota
la direcció dels doctors Joan Manyosa Ribatallada i Pere Garriga Solé:

V.i.p.

V.i.p.

Dr. Joan Manyosa Ribatallada

Dr. Pere Garriga Solé

Bellaterra, Març del 2002

ÍNDIX

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓ | 1 |
| I.1. ESTRUCTURA DE LA RETINA | 1 |
| I.2. RODOPSINA: PROTEÏNA FOTORECEPTORA DE LA RETINA | 3 |
| I.2.1. Estructura i funció de la rodopsina | 3 |
| I.2.1.1. Propietats espectrals de la rodopsina | 8 |
| I.2.1.2. Fotointermediaris | 9 |
| I.2.2. La rodopsina i el procés de fototransducció visual | 10 |
| I.2.3. La rodopsina com a model de la superfamília de receptors de membrana acoblats a proteïna G (G protein coupled receptors, GPCR) | 13 |
| I.3. RETINOSI PIGMENTÀRIA: UNA MALALTIA DEGENERATIVA HEREDITÀRIA DE LA RETINA | 14 |
| I.3.1. Introducció | 14 |
| I.3.2. Característiques clíniques i classificació genètica de la Retinosi Pigmentària (RP) | 14 |
| I.3.3. Mutacions en el gen de la rodopsina associades a RP | 17 |
| I.3.3.1 Classificació bioquímica dels mutants de rodopsina associats a RP | 18 |
| II. OBJECTIUS | 20 |
| III. MATERIALS I MÈTODES | 22 |
| III.1. EQUIPAMENT GENERAL | 22 |
| III.1.1. Instrumental emprat | 22 |
| III.1.2. Materials emprats | 22 |
| III.2. MATERIAL BIOLÒGIC EMPRAT I LA SEVA UTILITZACIÓ | 24 |
| III.2.1. Cultiu bacterià | 24 |
| III.2.1.1. Vector emprat i gen de la opsina | 24 |
| III.2.1.2. Medis i condicions de cultiu | 26 |
| III.2.1.3. Conservació de soques i plàsmids | 27 |
| III.2.2. Cultiu cel·lular eucariota | 27 |
| III.2.2.1. Descripció i característiques de la línia cel·lular | 27 |
| III.2.2.2. Condicions de creixement de la línia cel·lular | 27 |
| III.2.2.3. Protocols emprats en cultiu cel·lular | 28 |
| III.3. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES NATIVES | 29 |
| III.3.1. Extracció de rodopsina a partir de retines bovines | 29 |
| III.3.2. Solubilització de la rodopsina en dodecil maltòsid (DM) | 31 |

| | |
|---|-----------|
| III.3.3. Purificació de l'anticòs Rho-1D4 a partir de sobrenedants de cultius d'hibridomes..... | 31 |
| III.3.4. Acoblament de l'anticòs a la Sepharosa activada per CNBr i comprovació de la capacitat d'unió amb proteïna nativa (<i>Binding capacity</i>)..... | 33 |
| III.3.5. Extracció de la proteïna G transducina a partir de retines bovines | 34 |
| III.4. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS | 37 |
| III.4.1. Esquema general del mètode per a l'obtenció de les rodopsines recombinants mutades. | 37 |
| III.4.2. Clonatge i manipulació de DNA | 38 |
| III.4.2.1. Competència i transformació de cèl·lules d' <i>E.Coli</i> | 38 |
| III.4.2.2. Preparacions de DNA plasmídic | 39 |
| III.4.2.2.1. Mètode de lisi alcalina | 39 |
| III.4.2.2.2. <i>Maxiprep</i> | 40 |
| III.4.2.3. Mutagènesi dirigida..... | 40 |
| III.4.2.3.1. Mutagènesi dirigida per reemplaçament tipus "cassette" | 40 |
| III.4.2.3.2. Digestions amb enzims de restricció | 41 |
| III.4.2.3.3. Electroforesi i recuperació de DNA dels gels d'agarosa | 41 |
| III.4.2.3.4. Estimació de la concentració de DNA en gels d'agarosa | 43 |
| III.4.2.3.5. Unió d'oligonucleòtids sintètics | 43 |
| III.4.2.3.6. Lligació de fragments de DNA..... | 43 |
| III.4.2.4. Mutagènesi dirigida per reacció en cadena de la polimerasa (Polimerase chain reaction, PCR)..... | 44 |
| III.4.2.5. Seqüenciació de DNA | 45 |
| III.4.3. Expressió i purificació de proteïnes recombinants | 45 |
| III.4.3.1. Transfecció en cèl·lules COS-1 pel mètode de DEAE-Dextrà..... | 45 |
| III.4.3.2. Purificació de les proteïnes recombinants..... | 46 |
| III.4.3.2.1. Regeneració de les opsines recombinants en membrana amb 11- <i>cis</i> -retinal i solubilització en DM..... | 46 |
| III.4.3.2.2. Purificació de les proteïnes recombinants per cromatografia d'immunoafinitat | 47 |
| III.4.3.3. Preparació i regeneració de les proteïnes recombinants en membranes de cèl·lules COS-1 | 47 |
| III.5. CARACTERITZACIÓ ELECTROFORÈTICA I ESPECTROSCÒPICA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS..... | 48 |
| III.5.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida | 48 |
| III.5.1.1. Tinció del gel de poliacrilamida amb blau de <i>coomassie</i> | 49 |
| III.5.1.2. Tinció del gel de poliacrilamida amb plata | 50 |
| III.5.2. Electrotransferència de proteïnes (<i>Western Blot</i>)..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| III.6. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS PER ESPECTROSCÒPIA D'ULTRAVIOLAT-VISIBLE (UV-Vis) | 51 |
| III.6.1. Introducció a l'espectroscòpia UV-Vis | 51 |
| III.6.2. Preparació de les mostres i condicions espectrals | 52 |
| III.6.3. Assaig de blanqueig i acidificació de les proteïnes recombinants | 53 |
| III.6.4. Assaig de reactivitat amb hidroxilamina | 53 |
| III.6.5. Assaig d'estabilitat tèrmica de les proteïnes recombinants | 54 |
| | |
| III.7. ASSAIG D' ACTIVACIÓ DE LA TRANSDUCINA PER LA RODOPSINA MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA. | 54 |
| III.7.1. Introducció a l'espectroscòpia de fluorescència | 54 |
| III.7.2. Característiques i condicions de l'assaig | 56 |
| III.7.3. Assaig d' interacció rodopsina-transducina per espectroscòpia de fluorescència | 56 |
| | |
| IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ | 58 |
| | |
| IV.1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES NATIVES | 58 |
| IV.1.1. Obtenció de rodopsina a partir de retines bovines | 58 |
| IV.1.2. Obtenció de la proteïna G Transducina | 59 |
| IV.1.3. Obtenció de l'anticòs monoclonal Rho-1D4 | 62 |
| | |
| IV.2. DISSENY I OBTENCIÓ DE RODOPSINES RECOMBINANTS | 64 |
| IV.2.1. Selecció de les mutacions | 64 |
| IV.2.2. Estratègies de construcció dels mutants en E.Coli | 65 |
| IV.2.2.1. Mutants realitzats per mutagènesi tipus "cassette" | 66 |
| IV.2.2.2. Mutants realitzats per PCR | 68 |
| IV.2.3. Purificació de rodopsines recombinants en DM. Obtenció de rodopsina WT a partir de cèl·lules COS-1. | 70 |
| | |
| IV.3. MUTANTS DE RODOPSINA ASSOCIATS AMB RP | 72 |
| IV.3.1. <i>ESTUDIS ESTRUCTURALS</i> | 72 |
| IV.3.1.1. Caracterització per espectroscòpia UV-Vis | 72 |
| IV.3.1.2. Caracterització electroforètica | 81 |
| IV.3.1.3. Comportament de les proteïnes mutants amb la il·luminació i l' acidificació del medi | 84 |
| IV.3.1.4. Reactivitat de les proteïnes mutants a l'hidroxilamina a la foscor | 86 |
| IV.3.1.5. Estabilitat tèrmica de les proteïnes mutades | 88 |

| | |
|---|-----|
| IV.3.2. <i>ESTUDIS FUNCIONALS</i> | 91 |
| IV.3.2.1. Funcionalitat de les proteïnes mutants de rodopsina associades a RP | 91 |
| IV.3.3. <i>TAULA DE RESULTATS GENERALS DE LES MUTACIONS ASSOCIADES A RP</i> | 94 |
| IV.4. MUTANTS EN LA POSICIÓ 125 DE L'HÈLIX III DE LA RODOPSINA | 95 |
| IV.4.1. <i>ESTUDIS ESTRUCTURALS</i> | 95 |
| IV.4.1.1. Caracterització per espectroscòpia UV-Vis | 95 |
| IV.4.1.2. Caracterització electroforètica..... | 99 |
| IV.4.1.3. Comportament de les proteïnes mutades amb la il·luminació i l'acidificació del medi | 101 |
| IV.4.1.4. Reactivitat de les proteïnes mutades a l'hidroxilamina a la foscor | 103 |
| IV.4.1.5. Estabilitat tèrmica de les proteïnes mutants | 104 |
| IV.4.2. <i>ESTUDIS FUNCIONALS</i> | 106 |
| IV.4.2.1. Funcionalitat de les proteïnes mutants en la posició 125 de l'hèlix III de la rodopsina | 106 |
| IV.4.3. <i>TAULA DE RESULTATS GENERALS DE LES MUTACIONS EN LA POSICIÓ 125</i> | 108 |
| V. DISCUSSIÓ GENERAL | 109 |
| V.1. Efecte de les mutacions puntuals en el gen de la rodopsina associades a RP | 109 |
| V.1.1. Mutacions en el domini transmembrana de la rodopsina..... | 109 |
| V.1.2. Mutacions en el domini intradiscal de la rodopsina..... | 117 |
| V.1.3. Mutacions al domini citoplasmàtic de la rodopsina..... | 118 |
| V.2. Efecte de mutacions en la posició 125 de l'hèlix III de la rodopsina en la conformació de la butxaca d'unió del retinal..... | 120 |
| V.3. Biologia molecular i perspectives terapèutiques de la RP..... | 124 |
| VI. CONCLUSIONS | 126 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 129 |

ABREVIATURES

| | |
|------------------|--|
| A | Absorbància |
| aa | Aminoàcid |
| adRP | Retinosi Pigmentària autosòmica dominant |
| Amp | Ampicil·lina |
| arRP | Retinosi Pigmentària autosòmica recessiva |
| BCIP | Bromocloroindolil fosfat |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> (Albúmina de sèrum boví) |
| DEMEM | <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i> |
| DM | Dodecil maltòsid |
| DNA | Àcid desoxiribonucleic |
| DO | Densitat òptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| ϵ | Coefficient d'extinció molar |
| EDTA | Etilendiaminotetraacetat de sodi |
| ER | Enzim de restricció |
| FBS | <i>Foetal bovine serum</i> (Sèrum boví fetal) |
| fs | Femtosegon |
| FTIR | Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier |
| Glu | L-Glutamina |
| GMP _c | Guanidin monofosfat cíclic |
| Gt | Proteïna G transducina |
| GTP | Guanosin trifosfat |
| GTP γ S | Guanosin 5'-O-(3-Tiotrifosfat) |
| IPTG | β -D-isopropil-tiogalactopiranòsid |
| Kb | Kilobase |
| KDa | Kilodalton |
| LB | Medi de cultiu Luria-Bertani |
| Meta II | Metarodopsina II |
| ms | milisegon |
| MW | <i>Molecular weighth</i> (Massa molecular) |

| | |
|-----------|---|
| NBT | <i>Nitro Blue tetrazolium</i> |
| pb | Parell de bases |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa |
| PDE | Fosfodiesterasa |
| Pen | Penicil·lina |
| PMSF | Fenil-metil-sulfonilfluorur |
| Rho | Rodopsina |
| RNAsa | Ribonucleasa A |
| ROS | <i>Rod outer segments</i> (segments externs de bastons) |
| RP | Retinosi Pigmentària |
| rpm | Revolucions per minut |
| SBW | <i>Spectral band width</i> (amplada de banda espectral) |
| SDS | Dodecilsulfat de sodi |
| Strep | Estreptomicina |
| $t_{1/2}$ | Temps de vida mitja |
| TAE | EDTA 2mM, Tris-acetat 40mM, pH 8,0 |
| TE | Tampó Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometà |
| UV | Ultraviolat |
| V_f | Volum final |
| Vis | Visible |
| WT | <i>Wild type</i> (tipus salvatge) |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid |

I.INTRODUCCIÓ

I.1. ESTRUCTURA DE LA RETINA

La retina és un teixit molt especialitzat, sensible a la llum, que recobreix quasi totalment l'interior del globus ocular (Figura 1) i és en ella on tenen lloc les primeres etapes del procés de la visió. Està formada bàsicament per dues capes, una capa estreta anomenada epitel·li pigmentari i una capa més gruixuda denominada “retina neural” formada per diverses capes de cèl·lules. Aquesta capa neural és la responsable de la resposta a la llum, i a l'epitel·li pigmentari tenen lloc els processos bioquímics necessaris per l'aportament nutricional que requereix aquest procés.

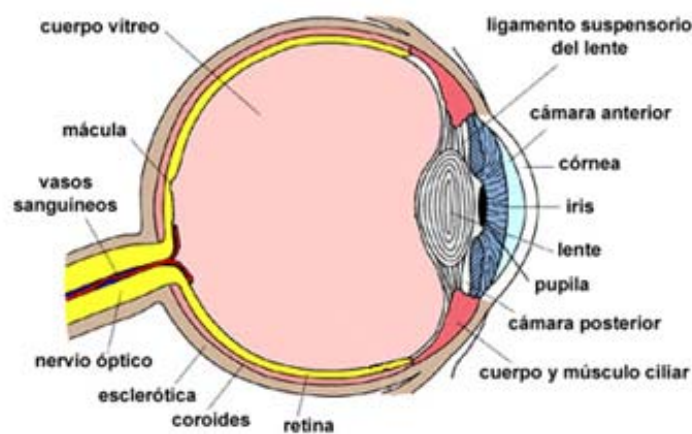


Figura 1. Dibuix esquemàtic de l'anatomia de l'ull humà on es localitzen les diferents parts de les quals consta i on s'assenyala la localització de la retina.

Les cèl·lules fotoreceptores es localitzen a la part més posterior (més allunyades de la llum incident), i immediatament per darrera d'elles es troba l'epitel·li pigmentari (Figura 2). Hi ha dos tipus de cèl·lules fotoreceptores, els cons i els bastons. Els cons es troben concentrats a la part central de la retina (també denominada màcula) i són els responsables de la visió amb llum intensa o fotòpica; n'hi ha de tres tipus, cadascun dels quals absorbeix un rang de longituds d'ona diferents i això fa possible la visió en color.

Els bastons es troben distribuïts per tota la retina, essent més nombrosos cap a la part perifèrica; són molt més sensibles a la llum i intervenen en la visió amb llum de baixa intensitat o escotòpica. No existeixen subtipus de bastons, per això la visió amb llum escotòpica és monocromàtica, en blanc i negre i tota la gamma de grisos. La retina de l'ull humà conté aproximadament 120 milions de bastons i 6 milions de cons.

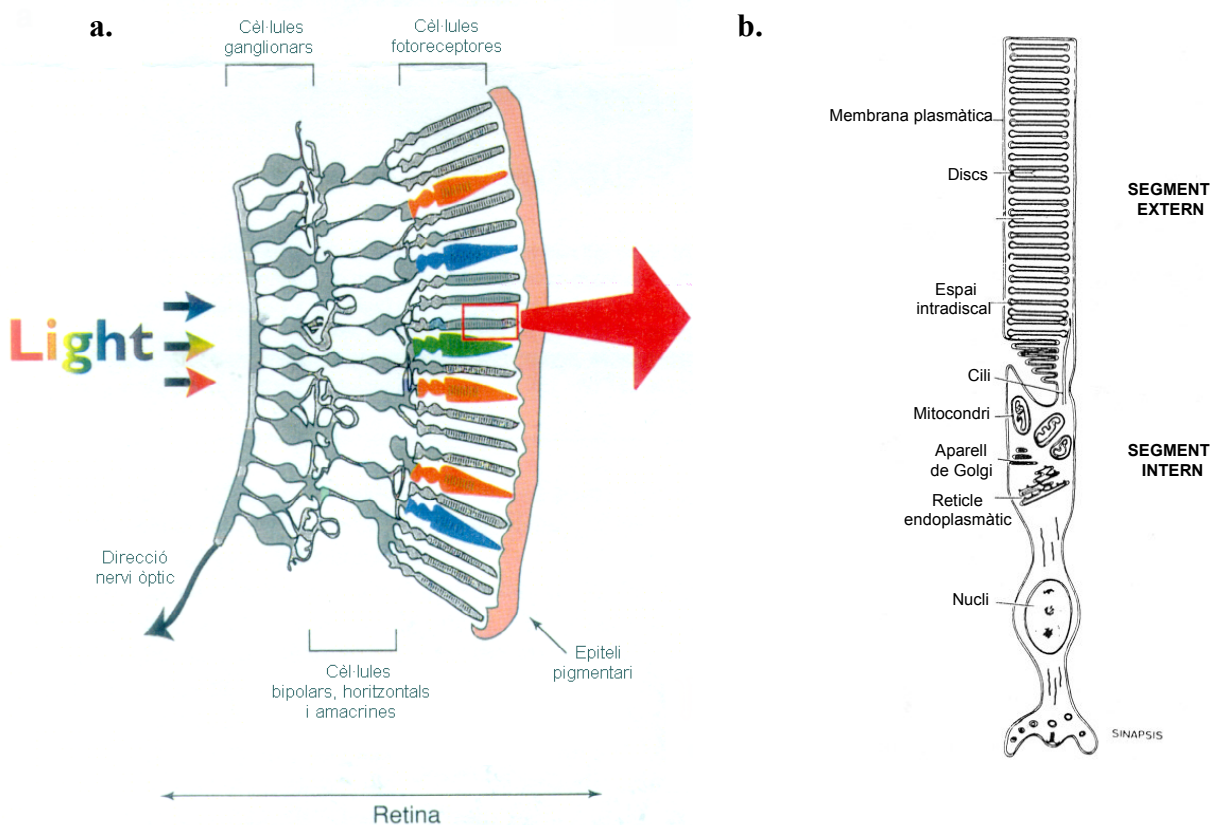


Figura 2. (a) Organització estructural de les diferents capes de la retina. La llum travessa l'ull i passa a través de la capa de cèl·lules ganglionars i la capa de cèl·lules bipolars, horitzontals i amacrines fins a arribar a la capa de cèl·lules fotoreceptores. Aquesta capa està formada pels bastons (gris) i tres tipus de cons (blau, verd i vermell) per la visió en color. (b) Cèl·lula bastó de la retina de vertebrats. La cèl·lula bastó està dividida en dues parts: el segment extern, especialitzat en la fotorecepció, on es troben uns 2000 discs apilats i on es localitza la rodopsina; i el segment intern que conté els òrgans on es sintetitzen les molècules necessàries per a la fotorecepció. Quan la llum incideix en les cèl·lules fotoreceptores, la rodopsina capta la radiació i es modifica. El senyal es transmet mitjançant una sèrie de reaccions bioquímiques cap a la membrana plasmàtica fins al terminal sinàptic des d'on es transmet al cervell on s'elabora la informació visual.

Aquestes cèl·lules envien petits impulsos elèctrics, un cop la llum incideix sobre elles, per via d'una capa de neurones intermediàries, fins a les cèl·lules ganglionars. Aquestes es troben a la part oposada de la retina i van convergint fins a formar el nervi òptic, encarregat de fer arribar l'impuls nerviós al cervell.

I.2. RODOPSINA: PROTEÏNA FOTORECEPTORA DE LA RETINA

La retina té dos tipus de cèl·lules fotoreceptores, els cons i els bastons. La rodopsina és el pigment dels bastons que junt amb els pigments dels cons són els responsables de l'absorció de llum en uns intervals de longituds d'ona específics i generen un impuls nerviós proporcional a la quantitat de llum absorbida. Fins a mitjans de la dècada dels 70 no es van començar a revelar les bases moleculars del mecanisme d'excitació visual. Aquest mecanisme implica una seqüència d'esdeveniments fotoquímics, bioquímics i electrofisiològics mitjançant els quals l'absorció d'un fotó en la cèl·lula fotoreceptora de l'ull genera una resposta elèctrica que pot ser detectada a nivell de connexió sinàptica.

I.2.1. Estructura i funció de la rodopsina

La rodopsina és el fopigment de les cèl·lules bastó de la retina, i es troba a la membrana dels segments externs de les cèl·lules fotoreceptores. L'extrem amino terminal es troba dins el lumen dels discs i l'extrem carboxi terminal es localitza en el citoplasma dels bastons (Figura 3). Aquesta proteïna es sintetitza als segments externs dels bastons, és modificada postranscripcionalment per addició d'oligosacàrids i àcids grassos i s'introdueix en vesícules en les quals és transportada fins a la membrana dels discs del segment extern on s'insereix. Aquests discs membranals estan formats per un 50% de lípids i un 50% de proteïna. La rodopsina constitueix aproximadament el 90 % del total de les proteïnes intrínseques de la membrana dels discs.

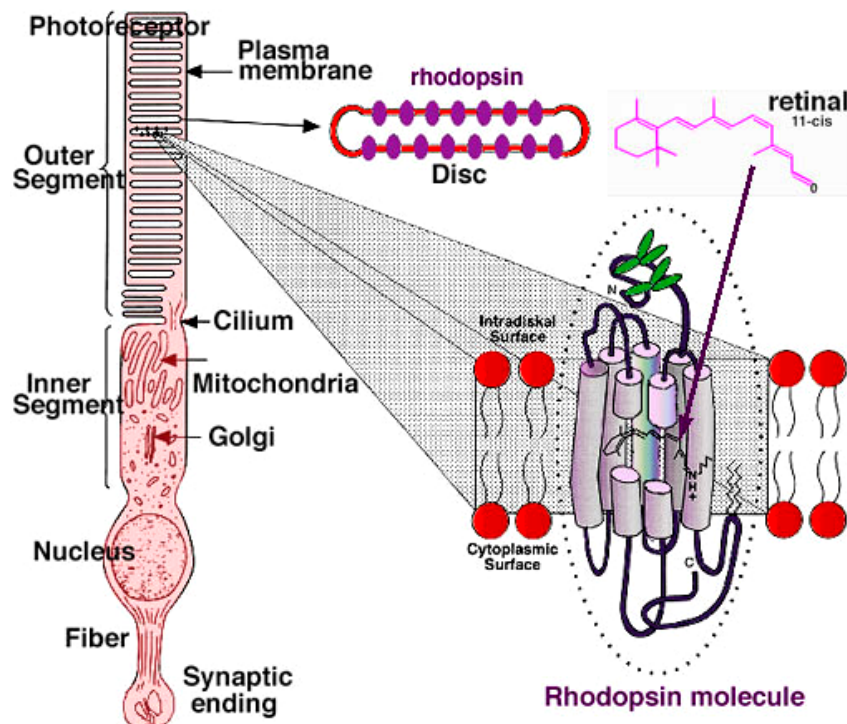


Figura 3. Localització de la rodopsina a la membrana dels discs de la cèl·lula bastó. Aquest model és una representació esquemàtica de l'estructura tridimensional d'una molècula de rodopsina plegada per formar la butxaca que acull el cromòfor (11-*cis*-retinal), unit covalentment a l'apoproteïna.

La rodopsina està constituïda per dos components: una apoproteïna, l'opsina, i un grup prostètic, l'11-*cis*-retinal derivat de la vitamina A. Estudis bioquímics i biofísics indiquen que la rodopsina conté 7 hèlixs α transmembranals, distribuïdes de manera similar que a la bacteriorodopsina (Ovchinnikov, 1982; Khorana, 1992). La unió del retinal a l'apoproteïna es realitza a través d'un enllaç covalent de tipus base de Schiff, que està protonat quan la rodopsina està a les fosques. Aquesta unió es produeix entre l'extrem de la cadena poliènica del retinal i el residu de Lys296 de la setena hèlix transmembranal (Bownds, 1967). El retinal lliure en dissolució absorbeix a una longitud d'ona de 387 nm, però l'entorn proteic de l'opsina el sintonitza a 498 nm. Les propietats espectrals de la rodopsina són degudes en part també al posicionament d'una càrrega negativa a una distància de 3 Å de la base de Schiff protonada, actuant com a contraió (Birge i al., 1985). A partir d'estudis realitzats amb receptors recombinants s'ha demostrat que el contraió és el residu Glu113 de l'opsina (Sakmar i al., 1989; Nathans,

1990). La rodopsina es troba també modificada covalentment per l'addició de dos oligosacàrids als residus Asp2 i Asp15 (Fukuda i al., 1979; Liang i al., 1979), per palmitoïlació a les Cys322 i Cys323 (Ovchinnikov i al, 1988). També sofreix fosforilació reversible depenent de la llum a residus de serines i treonines en l'extrem C-terminal (Wilden i al., 1982; Thompson & Findlay, 1984). Destaca la presència de dues cisteïnes en posició 110 i 187 que estan formant un pont disulfur, que és essencial per la correcta formació de l'estructura terciària de la proteïna (Karnik i al., 1988; Karnik & Khorana 1990) i per l'estabilitat de la proteïna (Davidson, PNAS 1994).

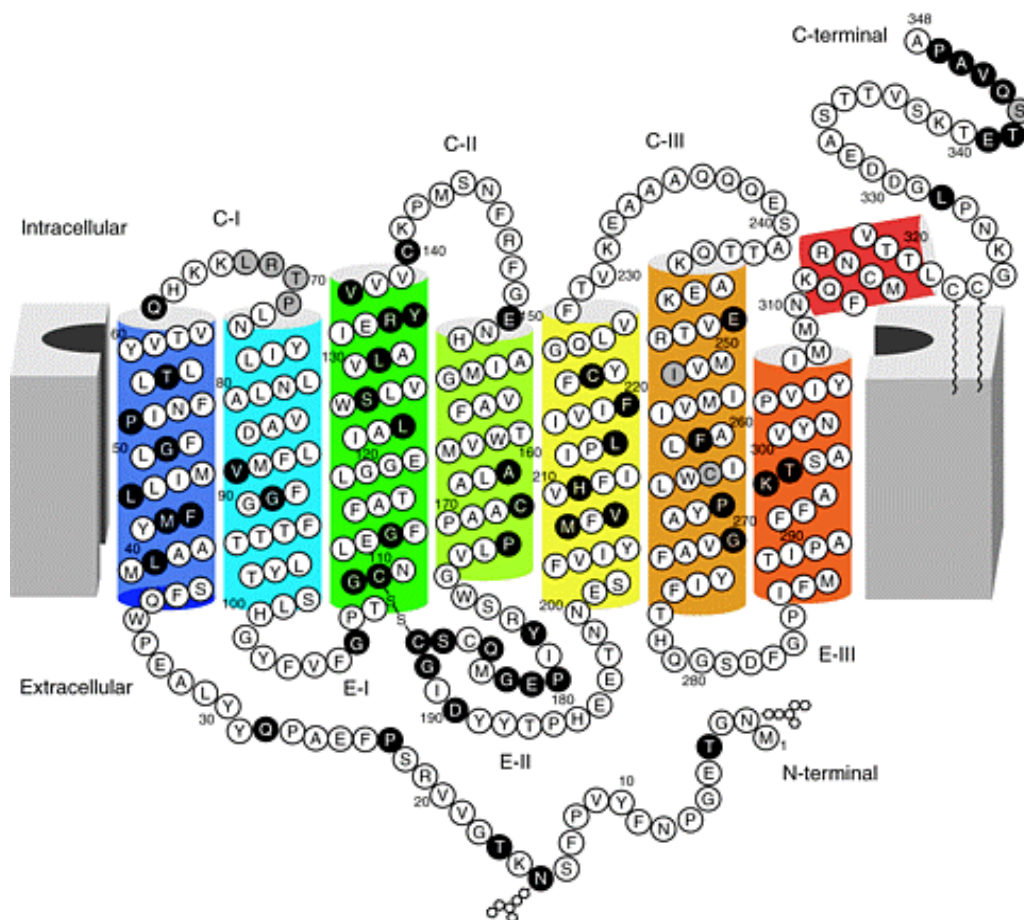


Figura 4. Model de l'estructura secundària de la rodopsina basada en l'estructura descrita segons Hargrave (1992) i Palczewski i al. (2000). Els aminoàcids 2 i 15 estan glicosilats, també s'indica la unió per pont disulfur entre els residus de Cys110 i Cys187. Els aminoàcids 322 i 323 que estan palmitoïlats s'insereixen a la membrana formant un quart *loop* citoplasmàtic. El cromòfor 11-*cis*-retinal s'uneix a la proteïna per la lisina en posició 296. Els colors de l'hèlix I fins a l'hèlix VII són els mateixos que apareixen a la Figura 5. Els residus marcats en negre indiquen la posició de mutacions associades a la malaltia degenerativa de la retina, Retinitis Pigmentosa.

Segons estudis de difracció de raigs X i dispersió de neutrons en membranes de segments externs de bastons, es va trobar que aproximadament una meitat de la massa de la rodopsina es troba immersa a la membrana (Saibil i al., 1976; Sardet i al., 1976; Osborne i al., 1978) i estudis de diroïsme circular indiquen que la rodopsina té un contingut en hèlix α d'un 50% aproximadament (Shichi & Shelton, 1974). Aquests resultats estan d'acord amb altres obtinguts per FTIR (García-Quintana i al., 1993). Segons estudis de polarització per FTIR sembla ser que l'orientació d'aquestes hèlixs α és perpendicular a la membrana dels discs. Estudis més recents sobre cristalls bidimensionals de rodopsina, indiquen que algunes de les hèlixs estarien inclinades respecte al pla de la membrana (Unger i al., 1997). En els darrers anys un dels enfocos que ha permès obtenir més informació sobre l'estructura i funció de la rodopsina és el corresponent als estudis realitzats sobre rodopsines mutades obtingudes per mutagènesi dirigida (Khorana, 1992; Sakmar, 1998).

L'estructura cristal·lina recentment obtinguda a 2.8 Å (Palcewski i al., 2000), mostra les set hèlixs α organitzades, immerses en la membrana formant una estructura helipsoidal que forma una butxaca on s'uneix l'11-*cis*-retinal com a peça clau per al manteniment de l'estructura de la proteïna en l'estat fonamental. Aquesta estructura mostra com l'anell de β -ionona del retinal es troba embolcallat des de la part citoplasmàtica per residus de les hèlixs III i VI, i el grup retinilidè transcorre quasi paral·lel a l'hèlix III transmembranal (inclinada 33° respecte l'eix perpendicular al pla de la membrana) (Teller i al., 2001). Aquesta hèlix proporciona moltes de les cadenes laterals que configuren la butxaca d'unió del retinal, i forma contactes amb les hèlixs II, IV, V, i VII. L'extrem C-terminal de l'hèlix III és especialment important ja que conté també la seqüència E(D)RY, altament conservada en la superfamília dels GPCR i que està implicada en la regulació de la interacció del receptor amb la proteïna Gt.



Figura 5. Model tridimensional de la rodopsina a partir de l'estructura cristal·lina a 2.8 Å de resolució descrita per Palczewski i al. (2000). Es mostren les set hèlix transmembranals (indicades I-VII) i el cromòfor 11-*cis*-retinal unit a la proteïna per el residu Lys-296. Entre l'hèlix VII i l'extrem C-terminal es descriu una nova hèlix curta corresponent als residus Lys311-Cys322.

Els *loops* en el domini intradiscal de la rodopsina formen una estructura molt compacta i estan implicats en el plegament correcte de la proteïna per formar la butxaca d'unió del retinal; mentre que els *loops* del domini citoplasmàtic estan involucrats en la interacció amb la transducina i els seus residus més pròxims a l'extrem C-terminal (328-348) podrien ser responsables del transport de la rodopsina cap al segment extern del bastó.

Espectralment, l'11-*cis*-retinal unit a l'opsina presenta el seu màxim d'absorció a 498 nm. L'absorció d'un fotó provoca el canvi estructural del cromòfor a la seva forma *tot-trans* (Figura 6). Aquest canvi estructural del cromòfor força un canvi conformacional en la proteïna, que passa per diferents intermediaris de vida efímera fins arribar a l'estadi del fotointermediari metarodopsina II (Meta II) que és la forma activa de la proteïna i presenta el seu màxim d'absorció a 380 nm. La metarodopsina II és la forma que interacciona amb la proteïna Gt i que inicia el procés d'amplificació del senyal en la cascada de fototransducció visual.

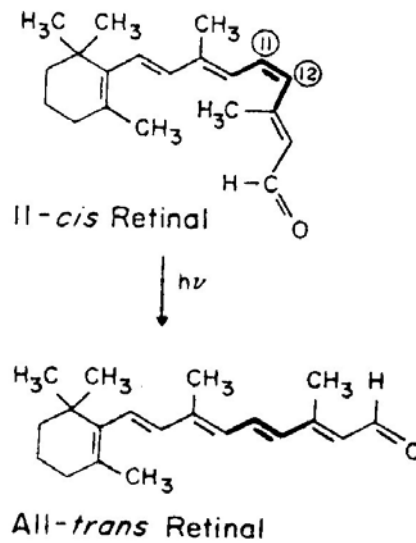


Figura 6. Estructura del cromòfor 11-*cis*-retinal i la seva isomerització a la forma tot-*trans* retinal un cop és il·luminat.

1.2.1.1. Propietats espectrals de la rodopsina

La rodopsina és la molècula fotosensible dels discs en les cèl·lules bastó de la retina. Aquesta molècula està formada per la proteïna opsina i el grup prostètic 11-*cis*-retinal que deriva del tot-*trans*-retinol (vitamina A). El retinal està unit covalentment a la rodopsina per un enllaç de base de Schiff entre el seu grup aldehid i el grup amino- ϵ del residu 296; aquest enllaç està protonat quan la rodopsina està a les fosques (Figura 7A). El retinal lliure absorbeix a una longitud d'ona de 387 nm, el retinal i l'opsina formen la molècula de rodopsina que presenta una banda ampla d'absorció en el visible amb un màxim a 498 nm (Figura 7B).

Quan l'11-*cis*-retinal absorbeix un fotó de llum s'isomeritza a la forma tot-*trans*-retinal, produint el canvi de conformació de la rodopsina i la formació de l'intermediari Meta II. En aquest punt la base de Schiff es troba desprotonada i absorbeix a un màxim de 380 nm, si s'afegeix àcid al medi l'enllaç per base de Schiff entre la proteïna i el retinal es torna a protonar absorbint a 440 nm (és indicatiu de la presència d'espècies unides per base de Schiff, essencialment Meta II) (Figura 7B).

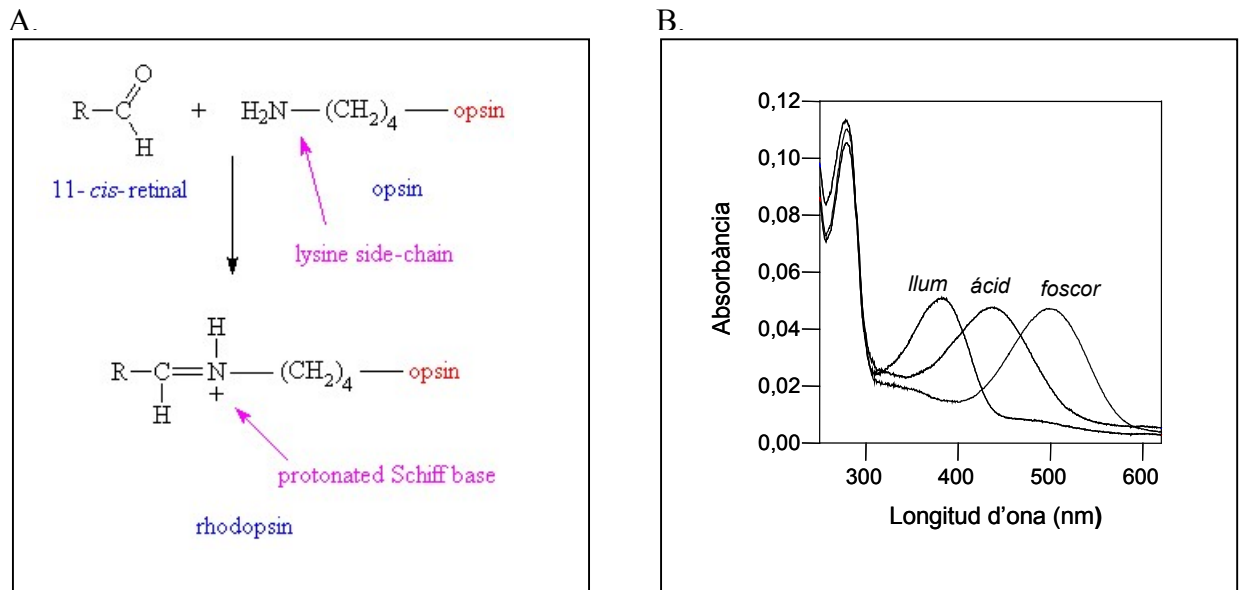


Figura 7. (A) Enllaç per base de Schiff que es forma entre l'11-*cis*-retinal i la cadena lateral del residu de Lisina 296 (B) Espectre d'absorció característic d'una mostra de rodopsina de ROS a les fosques ($\lambda_{\max}=498$ nm), en estat de Meta II ($\lambda_{\max}=380$ nm) i quan s'acidifica la mostra i la base de Schiff es reprotona ($\lambda_{\max}=440$ nm).

1.2.1.2. Fotointermediaris

L'absorció de l'energia de la llum per part del cromòfor de la rodopsina, 11-*cis*-retinal, és el primer pas en el fenomen de la visió. Aquesta absorció genera una sèrie de canvis bioquímics que culminen en la senyalització neural. Després de l'absorció del fotó, la isomerització del retinal al seu isòmer all-*trans* es dona en 200 *fs* i és a partir d'aquí que es donen una sèrie de canvis addicionals en la interacció del retinal amb l'opsina que poden seguir-se per la formació seqüencial d'intermediaris de la fotòlisi que tenen propietats espectrals diferents ben definides (Figura 8). La formació dels diferents fotointermediaris batorodopsina, lumirodopsina i metarodopsina I (Meta I) és molt ràpida a temperatura ambient. La formació de l'intermediari Meta II es dona en *ms* i va acompanyat per canvis en la conformació de la proteïna opsina donant lloc a la forma activa de la rodopsina que interacciona amb la transducina.

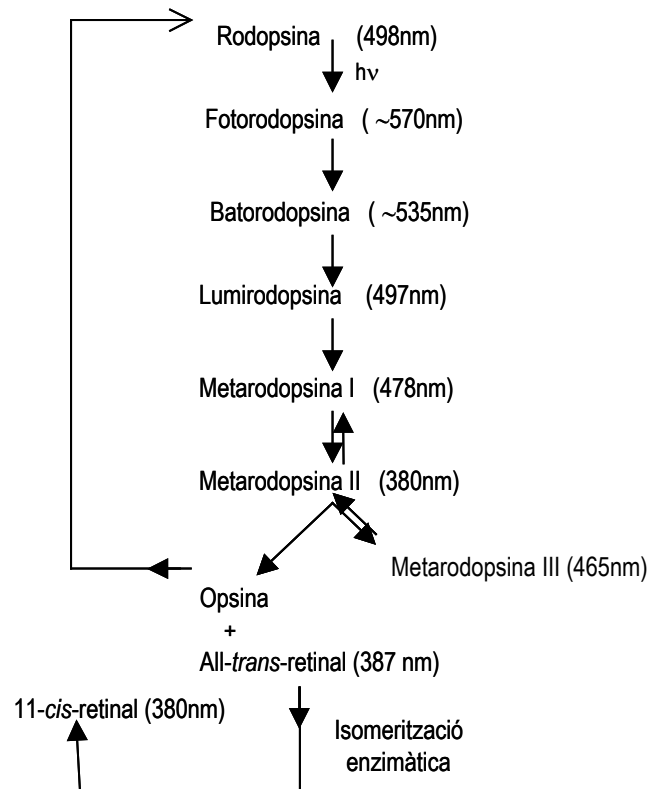


Figura 8. Intermediaris de la fotòlisi de la rodopsina en el cicle visual. Després de l'absorció d'un fotó per part del 11-*cis*-retinal, la rodopsina es converteix a través d'una sèrie d'intermediaris identificables espectroscòpicament en all-*trans* retinal i opsina. Es mostra la longitud d'ona de màxima absorció de cada intermediari i l'ordre de magnitud de la seva vida mitjana a 20°C.

1.2.2. La rodopsina i el procés de fototransducció visual

La rodopsina consta de dues parts: una apoproteïna, l'opsina, i un grup prostètic al domini transmembranal, l'11-*cis*-retinal. La cascada de reaccions del procés de fototransducció (Figura 9) comença quan l'absorció d'un fotó de llum resulta en l'activació de la rodopsina que pateix una sèrie de canvis conformacionals degut a la isomerització de l'11-*cis*-retinal a la forma tot-*trans* (Figura 6).

La rodopsina activada (Meta II) interacciona amb la proteïna Gt que catalitza l'intercanvi del GDP que porta unitat, per GTP. En aquest procés, la subunitat α de la transducina, carregada amb GTP, es dissocia de les subunitats beta i gamma. En aquest

primer pas el senyal s'amplifica considerablement, ja que una molècula activada de rodopsina és capaç d'activar més de 500 molècules de transducina. La subunitat α activada de la transducina activa seguidament l'enzim fosfodiesterasa depenent de GMP cíclic (PDE). Aquest enzim consta de quatre subunitats: alfa, beta i dues gamma. L'activació d'aquest enzim s'aconsegueix per desplaçament de les dues subunitats gamma. La PDE activada hidrolitza el GMPc, que es troba unit als canals depenents de GMPc, unes proteïnes transmembranals que permeten el moviment de cations monovalents i divalents a través de la membrana dels bastons. Almenys tres molècules de GMPc es troben unides com a mínim a cada proteïna canal. La seva hidròlisi resulta en un tancament dels canals iònics i dona lloc a la hiperpolarització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula fotoreceptora. Això inicia la transducció del senyal visual.

Per altre banda, els ions calci continuen sent expulsats a l'exterior de la cèl·lula per una glicoproteïna intercanviadora de sodi-calci. Aquesta sortida a l'exterior dels ions calci fa recuperar els nivells de GMPc a la cèl·lula i permet la reobertura dels canals depenents de GMPc.

Un cop aconseguida la producció d'una imatge, intervenen els mecanismes d'aturada del senyal i recuperació del sistema. Les proteïnes G tenen activitat GTPasa intrínseca, de manera que la subunitat α s'inactiva espontàniament, abandonant la fosfodiesterasa, que d'aquesta manera queda inactiva. Els nivells basals (durant la foscor) de GMPc són recuperats i mantinguts per guanilat ciclasses que consumeixen GTP, de manera que tota l'energia necessària durant la fase fosca és subministrada per aquest nucleòtid. Els elevats nivells de GTP necessaris són mantinguts als segments externs gràcies a l'elevada activitat NDPquinasa, que transfosforila GDP amb ATP que flueix dels nombrosos mitocondris del segment intern.

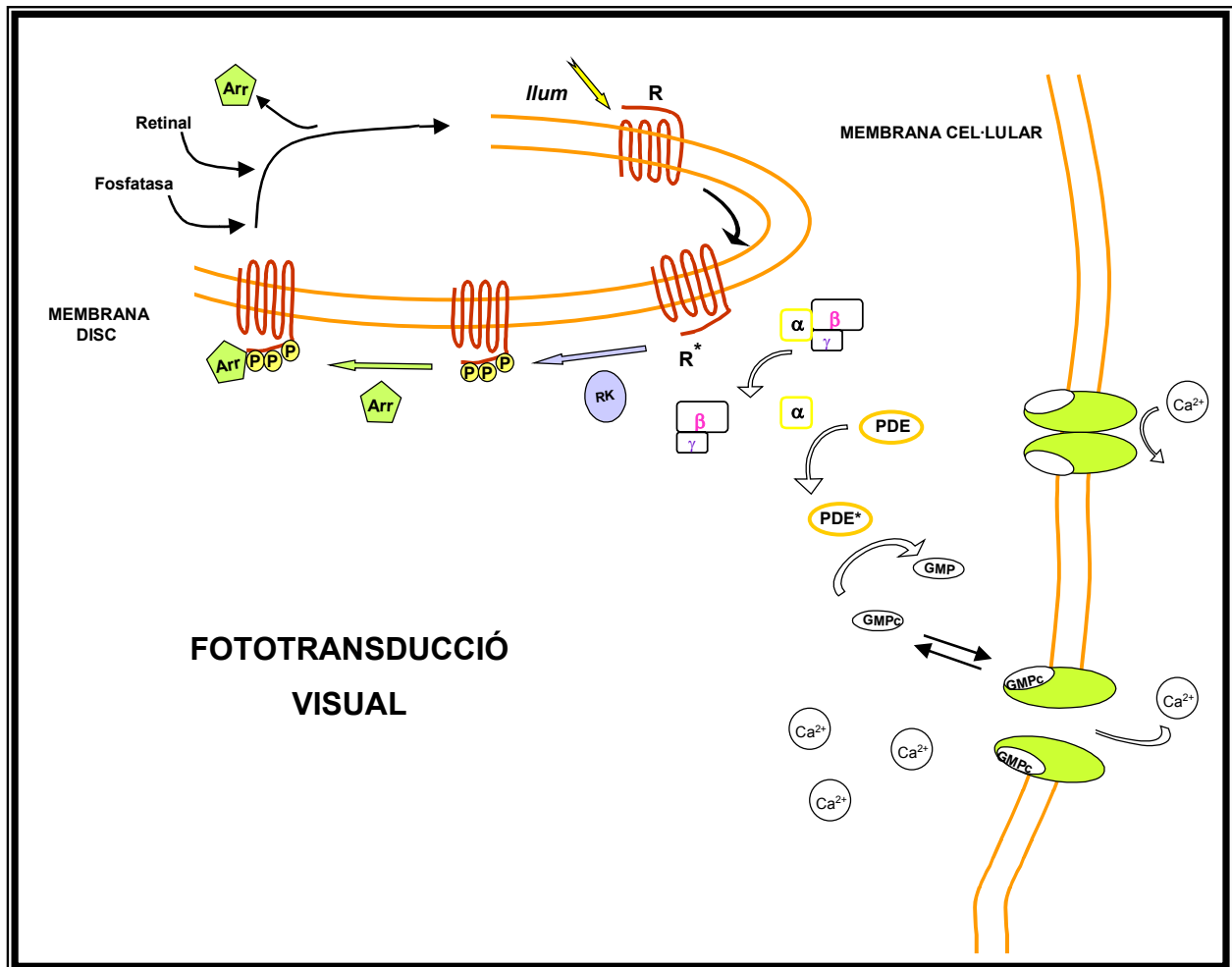


Figura 9. Esquema del mecanisme de fototransducció visual que té lloc en el segment extern de les cèl·lules bastó. El resultat final és el bloqueig de l'entrada de cations i com a conseqüència es produeix una hiperpolarització de la superfície de la membrana plasmàtica. Aquest és un potent mecanisme fotomultiplicador molecular.

Per altra banda, la rodopsina activa és capaç d'activar la rodopsina quinasa. Aquesta quinasa pot fosforilar la Meta II en fins a 7 residus Ser i Thr de l'extrem C-terminal (Aton i al., 1984; Thompson i Findlay, 1984), tot i que *in vivo* sembla que fosforila principalment la Ser334 i la Ser338 (Ohguro i al., 1995); tot plegat constitueix un mecanisme extraordinàriament eficaç de bloqueig de l'activació del sistema. Aquesta fosforilació redueix l'afinitat de la rodopsina activada per la transducina (Mitchel i al., 1992) i, a més, provoca la unió de l'arrestina, una proteïna de 48 Kda present al segment extern del bastó que s'uneix a la Meta II fosforilada bloquejant estèricament la possibilitat d'unir proteïna G_t (Kühn i al., 1984).

I.2.3. La rodopsina com a model de la superfamília de receptors de membrana acoblats a proteïna G (GPCR).

La rodopsina és membre de la superfamília de receptors acoblats a proteïna G (GPCR) (Dohlman i al., 1987; Hargrave i McDowell, 1992) i serveix com a model estructural i funcional d'estudi d'aquests receptors. Recentment, la determinació de l'estructura cristal·lina de la rodopsina bovina (Palczewski i al., 2000) ofereix una nova oportunitat per combinar els estudis bioquímics, biofísics i de mutagènesi dirigida i proporcionar informació més detallada sobre el mecanisme d'activació de la rodopsina i/o receptors acoblats a proteïna G en general.

Els GPCR es troben involucrats en el control de la majoria de processos fisiològics del nostre organisme i constitueixen la família més gran de proteïnes transductores de senyal coneguda. Es tracta doncs de la classe de receptors més àmplia i de la qual s'han identificat centenars de receptors. Alguns exemples són els receptors hormonals per la calcitonina i la hormona luteneitzant, o bé receptors per neurotransmissors com la serotonina i la dopamina.

Els GPCR activen diverses vies de senyalització intracel·lular en resposta a diferents estímuls: hormones, amines, Ca^{2+} , pèptids o altres proteïnes (Hargrave i al., 1992; Sakmar, 1998; Shichida i al., 1999) i es creu que es troben a la base del control i proliferació cel·lular.

La unió del lligand específic provoca canvis conformacionals en aquests receptors induint o estabilitzant una nova conformació. Els receptors activats provoquen l'activació de les proteïnes G (formades per les subunitats α ·GDP, β , i γ) que a la seva vegada generen respostes intracel·lulars molt diverses (Liri i al., 1998). Malgrat aquesta gran diversitat funcional, tots els receptors acoblats a proteïna G presenten una clara relació evolutiva, principalment en homologia de seqüència d'aminoàcids i en la seva topologia a la membrana, presentant com a element comú i distintiu els 7 elements helicoïdals transmembrana (Hargrave i al., 1992; Sakmar, 1998; Shichida i al., 1999). Un dels motius més conservats en la família de GPCR és el triplet DRY (ERY en la rodopsina) que conté residus crítics, especialment el Glu134 i l'Arg135, molt

importants per el procés d'activació de la proteïna G (Franke i al., 1990). S'ha proposat que aquest triplet forma part del microdomini funcional (I/L)XXDRYXX(I/V) trobat en la família de GPCR de la rodopsina (Ballesteros i al., 1998).

L'estudi de l'estructura de la rodopsina nativa, així com l'estudi de les bases moleculars de malalties associades a mutacions en la rodopsina causants d'anomalies en el seu plegament o bé en el procés de transducció de senyal, és clau per entendre com és el plegament dels receptors i com interaccionen amb la proteïna G activa o altres proteïnes reguladores. Aquest coneixement té moltes implicacions en fisiologia, patologia i disseny de fàrmacs.

I.3. RETINOSI PIGMENTÀRIA: UNA MALALTIA DEGENERATIVA HEREDITÀRIA DE LA RETINA

I.3.1. Introducció

El terme retinosi pigmentària s'utilitza per definir un grup de malalties humanes degeneratives de la retina provocades per una afectació primària de les cèl·lules fotoreceptores que acaben en una reducció progressiva de la visió. Són, en conjunt, el trastorn de la retina més freqüent, amb una incidència d'aproximadament 1 en 3500 (Weleber, 1991; Inglehearn, 1998). Existeixen diverses formes d'aquesta malaltia, les similituds que han portat a agrupar-les sota el mateix nom han estat basades en la simptomatologia clínica, el fenotip electroretinogràfic i/o les característiques genètiques.

Cal afegir a les formes típiques de RP les formes sindròmiques de la malaltia, en les que la RP apareix com un component més d'una sèrie de desordres sistèmics (Amaurosi congènita de Leber, malaltia d'Stargardt, degeneració macular, síndrome d'Usher).

I.3.1. Característiques clíniques i classificació genètica de la RP

Els pacients afectats presenten uns símptomes clínics característics com és la ceguesa nocturna en estats inicials de la malaltia, i deficiències en el camp visual perifèric medi

(també denominat visió en túnel) (Heckenlively, 1988). A mesura que la malaltia avança incrementen els defectes en el camp visual perifèric i també en el central. Durant la progressió els cons també es veuen involucrats, quedant afectada la visió diürna i l'agudes visual central.

En un examen mèdic del fons de l'ull, s'observa atròfia i canvis en la pigmentació de la retina (Figura 10) i l'epiteli pigmentari, així com vasos sanguinis més atenuats (Weleber, 1994; Heckenlively, 1998). Això provoca un canvi del color del nervi òptic, a través del qual els vasos sanguinis entren a l'ull; aquest canvi pot ser detectat amb l'oftalmoscopi. D'altra banda, però, el test essencial per al diagnòstic i classificació de la RP és l'electroretinograma (ERG) (Heckenlively, 1998; Marmor i al., 1999; Heckenlively i al. 1991). Aquest test mesura l'activitat elèctrica de la retina en resposta a estímuls de llum, adaptant les cèl·lules fotoreceptores a la foscor (ERG escotòpic), i a un nivell determinat de llum (ERG fotòpic). La resposta elèctrica de la retina es mesura extraocularment a través d'una lent de contacte amb l'elèctrode. L'ERG escotòpic mesura la resposta dels bastons i el fotòpic la dels cons.

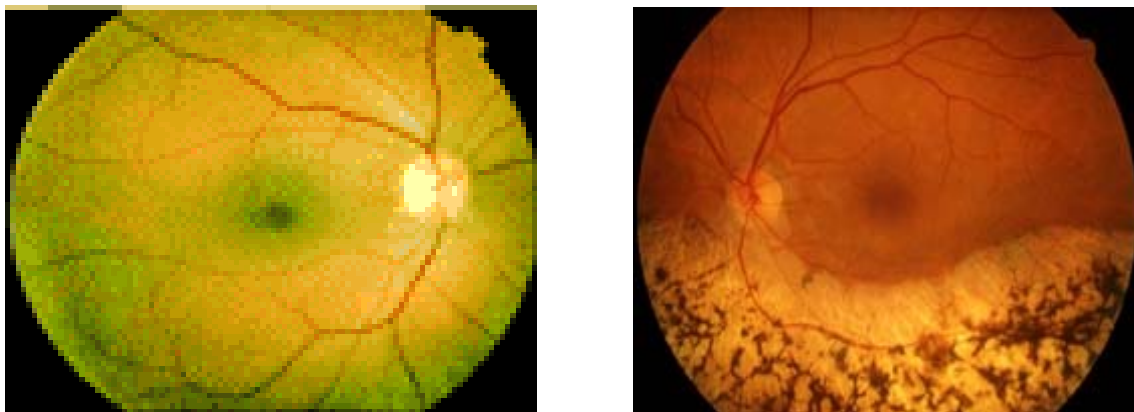


Figura 10. Imatges del fons de l'ull d'un pacient normal (esquerra) i un pacient amb retinosi pigmentària (dreta). En el pacient afectat s'observa la presència de pigmentació intraretinal i vasos sanguinis més atenuats; la pigmentació es localitza circularment a la perifèria de la retina, on normalment trobem una concentració més elevada de bastons. Aquestes àrees pigmentades reflexen forats en la capa de cèl·lules fotoreceptores, la mort cel·lular provoca l'atròfia dels discs de les cèl·lules fotoreceptores.

L'aparició de la malaltia pot variar des de la infància fins a l'edat adulta (Weleber, 1994; Haim, 1992). L'edat d'aparició dels símptomes clínics està correlacionada amb el mecanisme d'herència de la RP (vegeu l'apartat següent). El grau de pèrdua de la visió

és molt variable, podent arribar fins a la ceguesa total. Al final, el procés de degeneració de les cèl·lules fotoreceptores és via apoptosi (Travis, 1998; Portera-Cailliau i al., 1994; Reme i al., 1998; Zack, 1999).

Classificació genètica

La RP és clínicament i genèticament una malaltia molt heterogènia, que com ja s'ha dit anteriorment es pot presentar de forma aïllada o sindròmica. D'entre els casos no sindròmics, la RP es pot classificar segons el mode de transmissió genètica en: autosòmica dominant (adRP), autosòmica recessiva (arRP), lligada al cromosoma X (xlRP) o casos no familiars o esporàdics (sRP) (Boughman i al., 1980; Heckenlively i al. 1991; Humphries i al., 1990).

A Espanya, la RP es presenta en 1 de cada 3000-7000 individus i s'hereta de forma dominant en un 12% dels casos, autosòmica recessiva en un 39% i lligada al cromosoma X en un 4% dels casos. Un 41% són casos aïllats o puntuals dels quals un % no pot ser classificat en cap tipus genètic (Ayuso i al., 1995; Bayés i al., 1996). Tot i que la malaltia no és hereditària per a tots els pacients, s'assumeix que tots els casos de RP tenen una base genètica (Daiger i al., 1995).

Amb els avenços actuals en mapatge de gens basat en tècniques d'anàlisi directe del DNA i en l'anàlisi molecular de gens candidats, s'ha aportat molta informació sobre els *loci* associats a RP. Actualment existeixen 36 gens coneguts i/o candidats associats a RP així com altres *loci* per formes sindròmiques o malalties alienes (Phelan i al., 2000); d'aquests gens 19 d'ells han estat caracteritzats. En general, els gens de RP s'espera que s'expressin a les cèl·lules fotoreceptores de la retina o a l'epiteli pigmentari.

D'entre aquests gens coneguts trobem gens que codifiquen per proteïnes involucrades en la cascada de fototransducció visual com són els gens que codifiquen per la rodopsina (*RHO*) (Dryja i al., 1990a; Dryja i al., 1990b); les subunitats catalítiques α (*PDE6A*) (Huang i al., 1995) i β (*PDE6B*) (McLaughlin i al., 1993; Danciger i al., 1995; McLaughlin i al., 1994) de la fosfodiesterasa dependent de GMPc (*PDE6*); la subunitat α del canal de cations dependent de GMPc (*CNGA1*) (Dryja i al., 1995); i l'arrestina

(*SAG*) (Nakamachi i al., 1998; Nakazawa i al., 1998; Yoshii i al., 1998). Altres gens són els que codifiquen per proteïnes involucrades en el manteniment de l'estructura dels discs del segment superior dels bastons; són els gens de la periferina/RDS (*RDS*) i de la proteïna ROM1 de la membrana (Zack i al., 1991).

I.3.3. Mutacions en el gen de la rodopsina associades a RP

Les mutacions en el gen de la rodopsina són la causa principal de RP. Són responsables del 30-40 % dels casos de RP autosòmica dominant, i d'alguns casos de RP autosòmica recessiva (Weleber, 1994; Gregory-Evans i al., 1997). La rodopsina és la proteïna majoritària present en els bastons (Figura 5) i és la iniciadora del procés de fototransducció. El gen que codifica per la rodopsina (*RHO*) es localitza al cromosoma 3, exactament a la posició 3q21-q2. La regió codificadora del gen de la rodopsina humana es troba interrompuda per 4 introns que es troben en una posició anàloga als del gen que codifica per la rodopsina bovina descrit prèviament (Nathans i al., 1984). La seqüència aminoacídica de la rodopsina humana, deduïda de la seqüència del seu gen, consta de 348 aminoàcids i presenta un 93.4% d'homologia amb la rodopsina bovina.

Fins ara s'han descrit més de 150 mutacions diferents en algun dels 5 exons d'aquest gen i moltes d'elles han estat detectades només en una família. Les mutacions d'aquest gen s'han trobat associades a RP autosòmica dominant (adRP), autosòmica recessiva (arRP) i ceguesa nocturna estacionària autosòmica dominant (CSNB). La majoria són mutacions que alteren un sol aminoàcid en la molècula de rodopsina. El fenotip que provoquen les diferents mutacions del gen de la rodopsina és molt variable. En la taula següent es resumeixen algunes de les diferents mutacions trobades en el gen de la rodopsina associades a RP i la seva localització a la proteïna (Daiger i altres, 1995).

| 1 ^{er} Intradiscal | | 1 ^{er} TM | | 2 ^{on} TM | | 1 ^{er} L.I. | | 3 ^{er} TM | | 2 ^{on} L.C. | |
|--------------------------------|---------|----------------------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|
| Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació |
| 4 | T4K | 40 | L40R | 87 | V87D | 106 | G106R | 125 | L125R | 140 | C140S |
| 15 | N15S | 45 | F45L | 89 | G89D | 106 | G106W | 135 | R135G | | |
| 17 | T17M | 46 | L46R | 90 | G90D | 110 | C110Y | 135 | R135L | | |
| 23 | P23H | 51 | G51A | | | 114 | G114D | 135 | R135P | | |
| 23 | P23L | 51 | G51R | | | 114 | G114V | 135 | R135W | | |
| 28 | Q28H | 51 | G51V | | | | | 137 | V137M | | |
| | | 53 | P53R | | | | | 137 | V137L | | |
| | | 58 | T58R | | | | | | | | |
| 4 ^{rt} TM | | 2 ^{on} L.I. | | 5 ^è TM | | 6 ^è TM | | 7 ^è TM | | C _{ter} | |
| Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació | Codó | Mutació |
| 167 | C167R | 178 | Y178C | 207 | M207R | 267 | P267L | 289 | T289P | 328 | L328P |
| 171 | P171L | 180 | P180A | 209 | V209M | | | 292 | A292E | 341 | E341K |
| 171 | P171S | 181 | E181K | 211 | H211R | | | 296 | K296E | 342 | T342M |
| | | 182 | G182S | 211 | H211P | | | 296 | K296M | 345 | V345L |
| | | 184 | Q184P | 215 | P215L | | | | | 345 | V345M |
| | | 186 | S186P | 216 | M216K | | | | | 347 | P347A |
| | | 187 | C187Y | 220 | F220C | | | | | 347 | P347R |
| | | 188 | G188R | 222 | C222R | | | | | 347 | P347Q |
| | | 188 | G188E | | | | | | | 347 | P347L |
| | | 190 | D190N | | | | | | | 347 | P347S |
| | | 190 | D190G | | | | | | | 347 | P347T |
| | | 190 | D190Y | | | | | | | 347 | P347T |

Taula 1. Llistat de mutacions puntuals en la rodopsina associades a RP.

TM= Hèlix transmembrana; L.I.= *Loop* intradiscal; L.C.= *Loop* citoplasmàtic;

C_{ter}= extrem C-terminal.

1.3.3.1 Classificació bioquímica dels mutants de rodopsina associats a RP

La producció i caracterització *in vitro* de mutants de rodopsina que provoquen adRP a partir de la transfecció dels cDNA en cultiu cel·lular, va permetre establir una classificació a partir dels defectes bioquímics observats en diferents mutants de rodopsina associats amb adRP (Sung i al., 1991). Es poden distingir dos grans grups:

➤ Mutants de Classe I:

Presenten un nivell d'expressió i regeneració amb retinal molt similar a la proteïna WT. Tenen un comportament electroforètic com la proteïna salvatge i es localitzen majoritàriament a la membrana plasmàtica com el WT.

➤ Mutants de Classe II:

Aquests mutants s'expressen a nivells molt baixos i regeneren molt poc o res amb 11-*cis*-retinal. Presenten agregats en l'electroforesi i el seu transport cap a la membrana plasmàtica es ineficient. Es poden distingir dos subtipus d'aquesta classe de mutants:

- Mutants de Classe II a: Presenten predominantment una acumulació intracel·lular (reticle endoplasmàtic).
- Mutants de Classe II b: Presenten una acumulació significativa en la superfície cel·lular (membrana plasmàtica).

Determinades patologies de la retina, com és la RP, són el resultat d'alteracions en el procés de fototransducció normal. En aquest treball ens centrem en l'estudi de mutacions en el gen de la rodopsina associades a RP mitjançant mutagènesi dirigida. Aquest estudi ens ha de permetre obtenir informació sobre els requeriments estructurals per a la correcta formació de la butxaca d'unió del retinal i el plegament tridimensional de la proteïna per a un funcionament adequat. En aquest sentit els defectes bioquímics han de poder correlacionar-se amb el mecanisme molecular de degeneració de les cèl·lules fotoreceptores en la patologia de RP. A més, l'anàlisi en profunditat de diferents mutacions en una posició associada a RP pot aportar informació precisa sobre l'estructura i el mecanisme d'activació del receptor que pot ser aplicada a altres receptors de la superfamília de GPCR.

II. OBJECTIUS

La presència de mutacions en la rodopsina, té com a resultat deficiències en el funcionament i en l'eficàcia del procés de transducció de senyal i constitueix una de les causes principals de patologies oculars, particularment de la Retinosi Pigmentaria. L'estudi *in vitro* d'aquestes mutacions ens ha de permetre augmentar el coneixement dels mecanismes moleculars implicats en aquesta malaltia, fase prèvia necessària per abordar qualsevol aproximació terapèutica. A més a més l'anàlisi detallada de diferents mutacions en una posició determinada de la rodopsina, associada a RP, pot aportar informació precisa sobre l'estructura i el mecanisme d'activació del receptor. Finalment, l'estudi a nivell molecular de totes aquestes mutacions aportarà informació aplicable a altres receptors de la superfamília de GPCR.

En conseqüència, els objectius generals que es plantejen en aquest treball són els següents:

1. Posar a punt en el nostre laboratori el conjunt de tècniques i mètodes necessaris per a l'obtenció, purificació i caracterització de rodopsines recombinants.
2. Obtenir informació estructural i funcional detallada de la rodopsina mitjançant l'estudi de mutants puntuals en el gen d'aquest receptor: *i)* a partir de l'estudi de mutants associats a RP i *ii)* a partir de mutants en la posició 125 (lloc de la mutació associada a RP, L125R).
3. Contribuir- a través de la caracterització dels mutants estudiats- a l'elucidació dels defectes estructurals que es troben en la base de la patologia de la RP.

Aquests objectius generals es concreten en els següents objectius específics:

1. Posar a punt la metodologia per a la obtenció de mutants de rodopsina a partir del gen sintètic de l'opsina bovina. Posar a punt la tècnica d'expressió de rodopsines recombinants a partir de cèl·lules de mamífer COS-1 i la seva purificació utilitzant l'anticòs monoclonal Rho1D4.

2. Dissenyar i obtenir rodopsines amb mutacions puntuals associades a RP autosòmica dominant detectades en pacients espanyols, d'entre elles: M44T, G106W, G114D, R135L, V137M, P171Q, H211R, L328P i A346P.
3. Caracteritzar les proteïnes obtingudes amb les mutacions puntuals associades a RP emprant tècniques espectroscòpiques i bioquímiques per tal de relacionar els canvis estructurals produïts per les mutacions amb la seva funcionalitat.
4. Aprofundir en els estudis sobre el paper estructural de mutacions en l'hèlix III de la rodopsina (posició 125, lloc de la mutació associada a RP L125R). La construcció de diferents mutants amb cadenes laterals de diferent grandària i polaritat (L125G, L125T, L125I, L125P, L125W, L125Y, L125N, L125D, L125E i L125H) donarà informació sobre la significació d'aquesta posició en l'estructuració de l'entorn del retinal.
5. Caracteritzar els canvis estructurals en la posició 125 provocats per la introducció dels diferents aminoàcids, a partir de la seva capacitat de regeneració amb 11-*cis*-retinal, la seva estabilitat tèrmica i la seva reactivitat amb hidroxilamina.
6. Determinar l'efecte del canvi estructural produït en l'entorn de l'hèlix III per les mutacions estudiades sobre la funcionalitat i el mecanisme d'activació de les rodopsines mutades
7. Establir una correlació entre els resultats obtinguts a nivell molecular i les dades clíniques disponibles de malalts de RP.

III. MATERIALS I MÈTODES

III.1. Equipament general

III.1.1. Instrumental emprat

Agitador orbital Heidolph model Polymax 1040
 Agitador rotatiu Atom 85
 Autoclau Sterilclav model 75
 Balances
 Bany termostàtic Labline Instruments Inc. Model 2050-10E
 Bloc tèrmic Labline model Multiblock
 Bomba de buit DINKO model D-95
 Campana de flux laminar Nuaire model 425-400E, classe IIA
 Cell Scraper Costar model III
 Centrífuga de taula Sorvall model TC6
 Centrífuga Kontron Centrikon H-401, rotors A8.24 i A6.14
 Col·lector de fraccions LKB Bromma model Helifrac
 Crioconservador Bioblock model Locator JR
 Cubetes d'electroforesi per gels d'agarosa BioRad
 Cubetes d'espectrofotòmetre
 Desionitzador d'aigua Millipore model ElixS
 Detector Uvicord SD, LKB Bromma model 2158
 Espectrofotòmetre Varian model Cary 1E 3Bio
 Fonts d'alimentació BioRad models Power Pac 200 i 300
 Incubador d'aire amb agitació orbital Bottmigen, inforsAG, model CH-4103
 Incubador de CO₂ amb camisa d'aigua Nuaire model 4500E
 Làmpada d'UV Vilbert Lourmat model VL-6MC
 Microcentrífuga Sigma model 201M
 Microones Moulinex Micro-Chef 900W
 Micropipetes Nichiryo
 Microscopi invertit Olympus model CK2
Pestle
 pHmetre Metrohm model 713
 Tanc per nitrogen líquid Air Liquide model GT35
 Ultracentrífuga Sorvall model Combi Plus, rotors T-865 i AH629
 Unitat d'electroforesi Miniprotean II BioRad
 Unitat d'electrotransferència Minitransblot BioRad
 Unitat de seqüenciació Pharmacia LKB model Macrophere
 Vòrtex Heidolph model Reax 2000

III.1.2. Materials emprats

| | |
|--------------------------|-----------|
| Àcid acètic glacial | Merck |
| Àcid nítric | Sharlau |
| Acrilamida/Bisacrilamida | BioRad |
| Agar | Pronadisa |
| Agarosa | BioRad |
| Ampicil·lina | Sigma |

| | |
|---|---|
| ATP | Sigma |
| Azida de sodi | Merck |
| Blau de bromofenol | BioRad |
| Bromur d'etidi | BioRad |
| BSA (Albúmina sèrica bovina) | Serva |
| Carbonat de sodi | Merck |
| Cloroquina | Sigma |
| Clorur de guanidini | Sigma |
| Clorur de magnesi | Sigma |
| Clorur de sodi | Panreac |
| Coomassie brilliant blue | Sigma |
| DEAE-dextran | Pharmacia Biotech |
| DEMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) | Gibco BRL |
| Dicromat potàssic | Probus |
| DMSO | Sigma |
| Dodecil maltòsid | Anatrace |
| EDTA | Merck |
| Enzims de restricció | Amersham, Boeringer, New England Biolabs |
| Estàndard de pes molecular per gels d'agarosa | BioRad |
| Estàndard de pes molecular per gels SDS-PAGE | BioRad |
| Estàndard pretenyit per gels SDS-PAGE | BioRad |
| Etanol | Sharlau |
| Extracte de llevat | Pronadisa |
| FBS (Sèrum boví fetal) | Gibco BRL |
| Fenol/Cloroform/Alcohol Isoamílic 25:24:1 | Sigma |
| Formaldehid | Fluka |
| Fungizona | Gibco BRL |
| Glicerol | Merck |
| Glicina | Merck |
| Hidrogenofosfat de potassi trihidratat | Merck |
| Hidrogenofosfat de potassi | Merck |
| Metanol | Sharlau |
| Nitrat de plata | Panreac |
| Oligonucleòtids sintètics | Pharmacia Biotech |
| Penicil·lina/Estreptomina/Glutamina | Gibco BRL |
| Persulfat d'amoni | BioRad |
| PMSF | Sigma |
| Protein A Sepharosa CL-4B | Pharmacia Biotech |
| RNAse A | Boeringer Mannheim |
| Sacarosa | Merck |
| SDS | Sigma |
| Sefarosa CNBr-activated | Pharmacia Biotech |
| Tampó d'electroforesi Tris/Glicina/SDS | BioRad |
| T4-DNA ligasa | Boeringer Mannheim |
| TEMED | BioRad |
| Tiosulfat sòdic | Merck |
| Tripsina-EDTA | Gibco BRL |
| Triptona | Pronadisa |

III.2. MATERIAL BIOLÒGIC EMPRAT I LA SEVA UTILITZACIÓ

III.2.1. Cultiu bacterià

Per a la realització del clonatge i expressió del plàsmid amb les mutacions en el gen de la rodopsina s'ha treballat amb la soca DH5 α d' *Escherichia coli* (Gibco BRL). Aquesta soca conté el genotip deoR que permet la superinfecció de plàsmids grans. Es recomana l'ús d'aquesta soca per subclonatge rutinari de vectors plasmídics però no per crear llibreries de cDNA.

III.2.1.1. Vector emprat i gen de la rodopsina

El vector utilitzat per al clonatge és el pMT4 (Franke i col., 1988), proporcionat pel Dr. H.G. Khorana (Massachusetts Institute of Technology, USA). Aquest vector conté el gen de resistència a l'ampicil·lina i el gen sintètic de la opsina bovina (Ferretti i col., 1986) i es pot multiplicar tant en *E. Coli* com en cèl·lules COS-1.

El gen sintètic de l'opsina bovina es troba clonat entre les dianes de restricció *EcoRI*/*NotI* del vector i té una grandària de 1057 pb. Aquest gen conté 28 llocs de restricció únics distribuïts al llarg de tota la seva seqüència que defineixen uns fragments diana d'aproximadament 60 pb i que són utilitzats per realitzar mutagènesi dirigida per reemplaçament de tipus *cassette*.

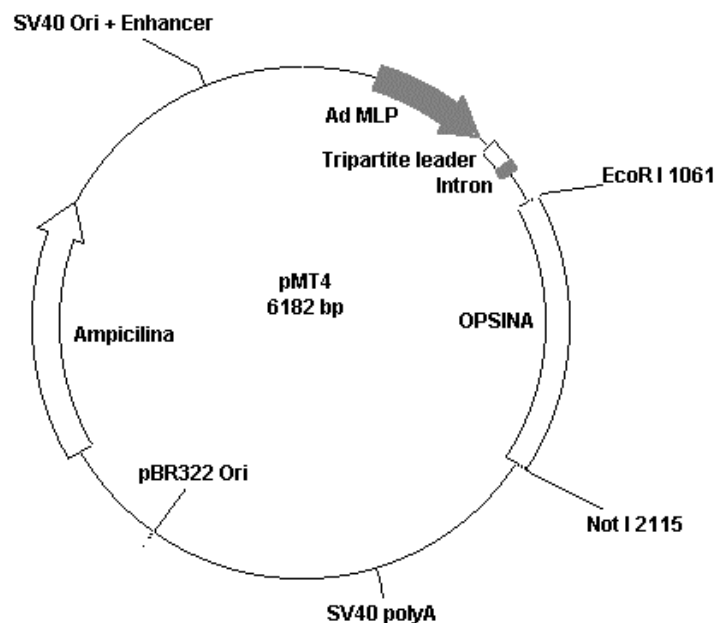


Figura 11. Esquema del plàsmid pMT4


```

aattcatgaacggtaccgaaggcccaacttctacgttcctttctccaacaagacggggc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ttaagtaacttgccatggcttccgggttgaagatgcaaggaagaggttggtctgcccgc

    F M N G T E G P N F Y V P F S N K T G V -

tggtgcgagcccgttcgaggctccgcagtactacctggcggagccctggcagttctcca
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
accacgcgtcgggcaagctccgaggcgtcatgatggaccgcctcgggaccgtcaagaggt

    V R S P F E A P Q Y Y L A E P W Q F S M -

tgctggccgcctacatggttcctgctgatcatgcttggttcccgatcaacttcctcacgc
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
acgaccggcggatgtacaaggacgactagtagcaaccgaagggtagtgtgaaggagtgg

    L A A Y M F L L I M L G F P I N F L T L -

tgtacgtcacagtccagcacaagaagcttcgcacaccgctcaactacatcctgctcaacc
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
acatgcagtgctcaggtcgtgttcttcgaagcgtgtggcgagttgatgtaggacgagttgg

    Y V T V Q H K K L R T P L N Y I L L N L -

tggccgtggcagatctcttcatggtcttcggtggcttcaccaccacctctacacctctc
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
accggcaccgtctagagaagtaccagaagccaccgaagtgggtgggagatgtggagag

    A V A D L F M V F G G F T T T L Y T S L -

tccatgggtacttcgtctttggccgacgggctgcaacctcgagggttctttgcccacc
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
aggtaccatgaagcagaaaccggctgcccgcgttgagctcccgaagaaacggtggg

    H G Y F V F G P T G C N L E G F F A T L -

tgggcggtgaaattgcactgtggtctctggtagtagtggcgatcgagcggtagctggtgg
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
accgcaccctttaaactgacaccagagaccatcatgaccgtagctcgccatgcaccacc

    G G E I A L W S L V V L A I E R Y V V V -

tgtgcaagcccagcaacttccgcttcggtgagaaccacgccatcatggcgctcgccct
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
acacgttcgggtactcgttgaaggcgaagccactcttggtgcggtagtagtaccgcagcgga

    C K P M S N F R F G E N H A I M G V A F -

tcacctgggtcatggctctggcctgtgcccccccgctcgtcggtggcttagatataca
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
agtggaccaccagtagaccgacacgcggggcgagcagccgaccagatctatgt

    T W V M A L A C A A P P L V G W S R Y I -

tcccgagggtcagtgctcgtgctgctgattactacacgccgcagaggagacca
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
agggcctcccgtacgtcacgagcacgcctagctaataatgatgtgcggtgctcctctggt

    P E G M Q C S C G I D Y Y T P H E E T N -

acaatgagtcggtcgtcatctacatgttcggtggtccacttcacatcccgtgattgtca
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
tgttactcagcaagcagtagatgtacaagcaccaggtgaagtagtagggcgactaacagt

    N E S F V I Y M F V V H F I I P L I V I -

tcttctctgctatggccagctggtgttcaccgtcaaggaggtgcagcccagcagcagg
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
agaagaagacgataccggctgaccacaagtggcagttcctccgacgtcgggtcgtcgtcc

    F F C Y G Q L V F T V K E A A A Q Q Q E -

```

```

agagcgcaccactcagaagccgagaaggaggtcacgcgtatggttatcatcatggcca
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
tctcgcggtggtgagtcctccggctcttccctccagtcgcgcataccaatagtagtaccagt

    S A T T Q K A E K E V T R M V I I M V I -

tcgctttcctaatactgctggctgccatatgctgggtgtggcgttctacatcttcacccatc
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
agcgaagagattagacgaccgacgggtatacaccacaccgcaagatgtagaagtgggtag

    A F L I C W L P Y A G V A F Y I F T H Q -

agggctctgactttgggccatcttcatgaccatcccggctttctttgccaagacgtctg
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
tcccagagactgaaaccgggtagaagtactggtagggccgaaagaaacggttctgcagac

    G S D F G P I F M T I P A F F A K T S A -

ccgtctacaacccggctcatctacatcatgatgaacaagcagttccggaactgcatggcca
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
ggcagatggtggccagtagatgtagtactacttgttcgtcaaggccttgacgtaccagt

    V Y N P V I Y I M M N K Q F R N C M V T -

ccactctctgctgtggcaagaacccgctgggtgacgacgagcgctcgaccaccgtctcca
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
ggtgagagacgacaccggttcttggcgaccactgctgctccgcagctgggtggcagaggt

    T L C C G K N P L G D D E A S T T V S K -

agacagagaccagccaagtggcgctgcctaag
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1053
tctgtctctggtcggttcaccgcggaacggattc

    T E T S Q V A P A * -

```

Figura 12. Seqüència del cDNA que correspon al gen de l'opsina.

III.2.1.2. Medis i condicions de cultiu

Medi per al cultiu d' *E.Coli*:

-Medi LB líquid

| | |
|--------------------|------------|
| Triptona | 10g |
| Extracte de llevat | 5g |
| NaCl | 10g |
| H ₂ O | fins a 1 l |

S'agita fins que tot s'hagi dissolt, s'ajusta a pH 7.0 amb NaOH i s'autoclava durant 20 minuts a 121°C.

-Medi LB sòlid : Medi LB líquid + Agar (15g/l)

Abans d'esterilitzar amb autoclau s'afegeix al medi LB líquid 15g d'agar per litre de medi. Un cop es treu de l'autoclau, es deixa refredar el medi fins a 50°C aproximadament i s'afegeix 1ml d'ampicil·lina (sol. stock 50 mg/ml) per litre de medi. L'antibiòtic s'esterilitza per filtració i es guarda a -20°C.

El medi es reparteix en plaques de Petri estèrils abocant aproximadament 20 ml directament del flascó (tot en condicions estèrils) i un cop solidificat es guarden les plaques a 4°C en posició invertida.

Condicions de cultiu:

Els cultius de *E. Coli* en medi líquid s'incuben a 37°C en agitació fins que el cultiu arriba a la fase estacionària (12-18h). Les plaques dels cultius sòlids es mantenen igualment a 37°C durant 12-18h.

III.2.1.3. Conservació de soques i plàsmids

Els clons utilitzats es conserven en placa fins un màxim de 30 dies. En medi líquid es conserven en glicerol 15% a -80°C durant diversos anys. El DNA plasmídic utilitzat es conserva congelat en solució aquosa o tampó TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) a -20°C.

III.2.2. Cultiu cel·lular eucariota

III.2.2.1. Descripció i característiques de la línia cel·lular

La línia cel·lular emprada per a l'expressió de la rodopsina va ser la línia de cèl·lules de mamífer COS-1, que va ser adquirida a la ECACC (European Collection of Cell Cultures). Es tracta d'una línia establerta a partir de cèl·lules de ronyó de mico verd Africà (CV-1) transformades amb un mutant defectiu per l'origen de replicació del virus SV40 de simis. Les cèl·lules COS-1 contenen una còpia integrada completa de la regió dels gens d'expressió primerenca del SV40 i produeixen l'antigen T, això permet al plàsmid que conté l'origen de replicació del SV-40 replicar-se independentment. Aquest sistema permet expressar opsin a la membrana plasmàtica a un nivell del 0.3 % de la proteïna cel·lular total (Oprian i al, 1987), i la seva orientació es anàloga a la de la rodopsina en la membrana intradiscal dels fotoreceptors de la retina bovina. També permet la unió de l'11-*cis*-retinal, afegit un cop expressada la proteïna, per obtenir la rodopsina.

III.2.2.2. Condicions de creixement de la línia cel·lular

La línia cel·lular COS-1 creix en el següent medi de cultiu:

DEMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium)
10% FBS
2mM Glutamina

Condicions de creixement: 37°C, 5% CO₂

Aquest medi de creixement es suplementa amb dos antibiòtics (Penicil·lina i Estreptomicina) i un antimicòtic (Amfotericina B) per evitar possibles contaminacions.

El FBS cal inactivar-lo a 56°C durant 30 minuts abans d'afegir-lo al medi de creixement cel·lular.

III.2.2.3. Protocols emprats en el cultiu cel·lular

Manteniment del cultiu cel·lular

Un cop el cultiu cel·lular s'inicia, es requereix un manteniment periòdic realitzant subcultius. Degut a la proliferació cel·lular, la quantitat de cèl·lules arriba a ser superior a la capacitat de la placa i es necessari dissociar-les de la placa per sembrar-les en una quantitat inferior i mantenir la línia cel·lular en condicions òptimes de creixement. Aquesta disgregació es realitza amb tripsina; aquest enzim és una proteasa que permet el trencament de la matriu extracel·lular que manté adherides les cèl·lules a la placa.

Tripsinització de la línia cel·lular:

- Enceneu la campana de flux laminar i el llum UV 15-20 min abans de començar per esterilitzar el camp de treball.
- Aspireu el medi de cultiu de la placa amb l'ajut d'una pipeta pasteur.
- Renteu la monocapa de cèl·lules amb 8-10 ml de PBSSC 1x per eliminar restes de medi de cultiu. Aspireu amb la pipeta pasteur.
- Afegiu 3 ml de solució de Tripsina 1x (stock 10x Gibco BRL) preparada al moment.
- Deixeu durant 3 min com a màxim per evitar agregacions cel·lulars.
- Ajudeu mecànicament a que la monocapa de cèl·lules es desprengui de la placa.
- Afegiu immediatament a la placa la mateixa quantitat de DEMEM que de tripsina per diluir-la i evitar fer malbé les cèl·lules.
- Recupereu tota la suspensió de la placa amb una pipeta i passeu-la a un tub de centrífuga de 50ml estèril.
- Centrifugueu a 1500 rpm en centrífuga de sobretaula Sorvall TC 6 durant 2 min.
- Aspireu el sobrenedant amb una pipeta pasteur i piqueu el sediment per disgregar les cèl·lules.
- Resuspeneu les cèl·lules en una quantitat coneguda de medi (10 ml). Barregeu molt bé amb la pipeta per desfer els grumolls cel·lulars i realitzeu el comptatge amb l'ajut de la càmera de Neubauer i el comptador manual de cèl·lules.
- Sembreu de nou entre $8-9 \times 10^6$ cèl·lules/placa. La resta de cèl·lules es poden congelar.

PBSSC pH 7.2-7.3:

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

1.5 mM KH_2PO_4

8mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Esterilitzeu amb autoclau. Guardeu a 4°C.

Descongelació de la línia cel·lular

- Preneu el criotub del contenidor de nitrogen líquid i col·loqueu-lo immediatament en gel.
- Poseu el criotub en un bany a 37°C, sense submergir-lo, durant un màxim de 1 minut. Torneu a posar el criotub en gel.
- Poseu 5-6 ml de medi DEMEM complert fred (4°C) en un tub de centrífuga estèril de 15 ml. Agafeu les cèl·lules descongelades amb una pipeta pasteur amb cotó i afegiu-les a poc a poc al tub agitant al mateix temps. Barregeu tot bé xuclant 2-3 cops amb la pipeta (a partir d'aquest pas cal treballar sempre sota campana).
- Centrifugueu el tub a 1500 rpm en centrífuga de sobretaula Sorvall TC 6 durant 2 min a 4°C.
- Extraieu el sobrenedant que conté el medi amb DMSO i resuspeneu el pellet en 10 ml de medi DEMEM complert amb l'ajut de la pipeta.
- Sembreu en placa afegint 10-15 ml de medi DEMEM complet.

Congelació línia cel·lular

- Centrifugueu la suspensió de cèl·lules que es vol congelar durant 2 min a 1500 rpm en la centrífuga de sobretaula Sorvall TC 6.
- Aspireu el sobrenedant, piqueu el sediment en sec per evitar l'agregació cel·lular.
- Resuspeneu les cèl·lules en medi de congelació. És molt important que aquest medi estigui a 4°C per evitar la mort cel·lular ja que per sobre d'aquesta temperatura el DMSO és tòxic per a les cèl·lules. Barregeu-ho tot molt bé amb l'ajut de la pipeta treballant sempre sobre gel.
- Aliquoteu 1 ml de suspensió per criotub, cada criotub conté aproximadament 10×10^6 cèl·lules.
- Passeu els criotubs del gel al congelador a -20°C. Deixeu-ho durant 1-2 h.
- Traspasseu els criotubs a -80°C. Deixeu-ho durant 24 h.
- Guardeu-los en nitrogen líquid.

Medi de congelació:

DEMEM
20 % FBS
10 % DMSO

III.3. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES NATIVES**III.3.1. EXTRACCIÓ DE RODOPSINA A PARTIR DE RETINES BOVINES**

El mètode utilitzat per a l'obtenció dels segments externs de les cèl·lules bastó, on es troba la rodopsina, ha estat descrit inicialment per McConnell (1965) i modificat posteriorment per Papermaster i Dreyer (1974), i es basa en el fraccionament subcel·lular en gradients de sacarosa.

Tot el procés es realitza a 4°C i sota llum vermella (filtres Kodak):

- Traieu 2 vials (100 retines) del congelador -80°C . Deixeu descongelar en un bany d'aigua a temperatura ambient durant 1 hora.
- Dividiu les 100 retines en 4 tubs de centrífuga i afegiu a cada tub 15 ml de sacarosa 30%. Homogeneïtzeu vortexant durant 1 min cada tub.
- Centrifugueu a 5000 rpm durant 6 min, amb el rotor A8-24 (Kontron), decanteu els sobrenedants en un Erlenmeyer.
- Afegiu a cada tub 20 ml de sacarosa 30% (p/v), homogeneïtzeu sacsejant el tub i amb l'ajut del vòrtex. Centrifugueu a 5.000 rpm en el rotor A8-24 (Kontron) durant 6 min i torneu a decantar els sobrenedants en l'Erlenmeyer anterior.
- Repetiu un altre cop el pas anterior, en total es recuperen uns 160 ml.
- Afegiu als sobrenedants totals un volum de tampó d'extracció, remeneu suaument la suspensió.
- Dividiu tot el volum en 8 tubs de centrífuga i centrifugueu a 14.000 rpm durant 15 min amb el rotor A8-24.
- Decanteu els sobrenedants (color vermellós). Els sediments es suspenen en 40 ml de sacarosa 15%, feu passar tot el volum per una agulla de xeringa, dividiu el volum en 4 tubs de centrífuga i afegiu per sota del tub amb molt de compte 15 ml de sacarosa 0.64M.
- Centrifugueu a 14.000 rpm (rotor A8-24) durant 10 min.
- Decanteu els sobrenedants (lleuger color rosat molt pàl·lid). Els sediments es suspenen en 40 ml de sacarosa 0.64M i s'homogeneïtzen manualment amb un *pestle* i després féu passar tot el volum a pressió per una xeringa.
- Prepareu 4 tubs de gradient:
Repartiu tot el volum de ROS en sacarosa 0.64M en 4 tubs de centrífuga. Afegiu per la part inferior de cada tub amb l'ajut d'una xeringa amb agulla llarga, 9ml de sacarosa 0.78M.
Féu el mateix posteriorment amb 9ml de sacarosa 1.00M i 9 ml de sacarosa 1.20M.
- Centrifugueu a 23.000 rpm durant 45 min amb el rotor basculant AH629 (Sorvall).
- Recupereu la franja 0.78M/1.00M.
- Afegiu 80 ml de tampó d'extracció i centrifugueu a 20.000 rpm durant 30 min amb el rotor T865 (Sorvall). Homogeneïtzeu els sediments amb 80 ml de tampó d'extracció, manualment amb el *pestle* i després fent passar tot el volum a pressió per una xeringa. Dividiu el volum en 4 tubs i centrifugueu a 30.000 rpm durant 30 min amb el rotor T865.
- Repetiu el pas anterior un cop més.
- Prepareu 250 ml de tampó hipotònic a partir dels stocks.
- Homogeneïtzeu els sediments en 80 ml de tampó hipotònic utilitzant el *pestle* i la xeringa. Dividiu el volum en 4 tubs i centrifugueu a 40.000 rpm durant 30 min amb el rotor T865.
- Repetiu el pas anterior dos cops més.
- Homogeneïtzeu els sediments en 80 ml de tampó d'extracció utilitzant el *pestle* i la xeringa. Dividiu el volum en 2 tubs i centrifugueu 20 min a 14.000 rpm amb el rotor A8-24 (Kontron).
- Repetiu el pas anterior dos cops més.
- Homogeneïtzeu els sediments en 20 ml de tampó d'extracció i dividiu el volum en eppendorfs. Guardeu-ho a -20°C .

Tampó d'extracció: 70mM Tampó fosfat potàssic, 1mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA (pH 6.9)

Tampó hipotònic: 5mM Tris-HCl, 0.5 mM MgCl₂ (pH 7.5)

Solucions de sacarosa: 30 % sacarosa (p/v)
 15 % sacarosa (p/v)
 0.64M sacarosa
 0.78M sacarosa
 1.00M sacarosa
 1.20M sacarosa

III.3.2. Solubilització de la rodopsina en dodecil maltòsid (DM)

Agafeu 200 µl de la suspensió final i resuspeneu-los en 1ml de tampó d'extracció. Centrifugueu a la centrífuga d'ependorfs i aspireu el sobrenedant. Solubilitzeu el sediment en 2 ml de DM 1% en tampó d'extracció. Deixeu-ho a la cambra freda durant 1 hora en agitació. Centrifugueu a 30.000 rpm 30 min amb el rotor T865 (Sorvall) i recupereu el volum solubilitzat amb una pipeta pasteur sense arribar a tocar el fons del tub. Féu la lectura a l'espectrofotòmetre per calcular la relació A_{280}/A_{500} i el rendiment de l'extracció, considerant que el pes molecular de la rodopsina és de 42000 Da i que el coeficient d'extinció molar a 500 nm és $\epsilon_{500} = 40600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Wald i Brown, 1953).

III.3.3. Purificació de l'anticòs Rho-1D4 a partir de sobrenedants de cultius d'hibridomes

L'anticòs 1D4 és un anticòs monoclonal de ratolí que reconeix específicament els 9 darrers aminoàcids de l'extrem C-terminal de la rodopsina. Aquest anticòs es purifica a partir de sobrenedants de cultius d'hibridomes que l'expressen; aquests sobrenedants es van obtenir del laboratori del Dr. Khorana (MIT) i provenen del National Cell Culture Facilities (EUA). La seva purificació es realitza amb una columna de Proteïna A immobilitzada pel mètode CNBr a la Sepharosa CL-4B. Aquesta proteïna A reconeix la regió F_c de les immunoglobulines a través d'interaccions amb la cadena pesada i permet aïllar fàcilment el nostre anticòs del medi de cultiu.

Preparació de la columna de Proteïna A Sepharosa CL-4B:

- Peseu la quantitat necessària de pols i suspeneu-la en aigua destil·lada en un vas de precipitats agitant molt suaument (1.5 g equivalen a 6 ml de gel hidratat)
- Renteu amb 200 ml d'aigua destil·lada per gram de pols, utilitzeu un filtre de vidre sintetitzat.
- Transvaseu la mescla a un erlenmeyer petit i afegiu tampó d'enllaçament en proporcions 75:25 gel:tampó.
- Col·loqueu tot el material a utilitzar a 4°C.
- Desgaseu el gel amb tampó d'enllaçament, col·loqueu l'erlenmeyer en un bany fred i connecteu-lo a una bomba de buit durant 10 min.

- Col·loqueu tampó d'enllaçament a la columna i elimineu l'aire dels espais morts de la columna. Tanqueu la sortida de la columna amb uns pocs centímetres de tampó en ella.
- Col·loqueu el gel a la columna de manera lenta i constant, ajudant-vos d'una vareta de vidre.
- Ompliu la resta de la columna amb tampó. Col·loqueu la part superior de la columna i connecteu la bomba peristàltica a flux constant (1.3 ml/min). Obriu la clau de sortida de la columna.

Purificació de l'anticòs Rho-1D4:

- Deixeu descongelant el tub d'hibridomes a 4°C durant tota la nit.
- Equilibreu la columna amb tampó d'enllaçament a un flux d'1ml/min. Utilitzeu 10 cops el volum de la columna.
- Diluïu la solució d'hibridomes 1:1 (v/v) amb tampó d'enllaçament i carregueu la mostra a la columna utilitzant un flux de 0.3ml/min. Guardeu el líquid que surti de l'erenmeyer.
- Eluïu amb tampó d'elució utilitzant 2.5 cops el volum de la columna i un flux de 1ml/min.
- Connecteu el col·lector de fraccions i recol·lecteu la mostra.
- Regenereu la columna fent passar 30 ml de tampó de regeneració a un flux de 0.5ml/min.
- Passeu tampó de emmagatzemament a un flux de 1ml/min, utilitzeu 10 cops el volum de la columna.

Tampó d'enllaçament: 1.5M Glicina, 3M NaCl (pH 8.9)

Tampó d'elució: 0.1M Glicina (pH 3.2)

Tampó de regeneració: 6M Guanidina HCl

Tampó d'emmagatzemament: 50mM NaPi (pH 7.0), 0.01% azida de sodi

Concentració de l'anticòs Rho-1D4:

El volum d'anticòs obtingut de la purificació es concentra amb CENTRIPLUS 30 d'Amicon, per centrifugacions successives.

Diàlisi de l'anticòs Rho-1D4:

El volum resultant de la concentració es dialitza a 4°C amb 800 ml de tampó de diàlisi en sacs de COT 11.000 daltons. La diàlisi es realitza durant 3 h, canviant dos cops el tampó de diàlisi i es deixa en el mateix tampó tota la nit. Al dia següent es recupera el volum del sac i es fa la quantificació espectrofotomètricament.

Tampó de diàlisi: 0.25M NaHCO₃, 0.5M NaCl (pH 9.0)

III.3.4. Acoblament de l'anticòs a la Sepharosa CNBr activada i comprovació de la capacitat d'unió amb proteïna nativa (*Binding capacity*)

La Sepharosa activada CNBr 4B és un gel preactivat per a la immobilització de lligands que continguin amides primàries. Aquest mètode ens permet acoblar lligands mitjançant el mètode del bromur de cianogen:

Preparació del gel:

- En un vas de precipitats peseu 1.75 g de pols (1 g de pols equival a 3.5 ml de gel). Els mil·lilitres de gel a preparar són en funció de la quantitat d'anticòs de què disposem, per cada mil·lilitre de gel s'acoblen 7.5 mg d'anticòs; per tant si disposem de 46 mg d'anticòs és necessari preparar 6.13 ml de gel.
- Infleu la Sepharosa amb 20 ml de solució de rentat, agiteu suaument amb una vareta de vidre.
- Passeu el gel a un filtre de placa porosa (G3 connectat a una bomba de buit, amb kitasato) i renteu 6 cops amb petits volums de solució de rentat (en total 50 ml); tot el procés no ha de durar més de 15 min.

Preparació de l'anticòs:

- En un tub resuspeueu la quantitat d'anticòs desitjada en tampó d'acoblament; un cop resuspès és convenient guardar una quantitat per assaigs posteriors.

Acoblament de l'anticòs a la Sepharosa:

- Renteu ràpidament el gel amb 2 volums de tampó d'acoblament i traspasseu-lo amb l'ajut d'una espàtula al tub que conté l'anticòs.
- Col·loqueu el tub a acoblar durant 2 h en agitació no vigorosa a temperatura ambient o bé tota la nit a 4°C.

Rentats:

- Transferiu el contingut del tub al filtre de placa porosa (G3) i renteu l'excés de lligand amb 5 al·líquotes de tampó d'acoblament, amb un volum total de 100 ml. És recomanable guardar els rentats en cas de què tinguin anticòs no acoblat.

Blocatge de grups actius:

- Transferiu-ho tot a un tub que contingui un volum de tampó de bloqueig.
- Deixeu en agitació suau durant 2 h a temperatura ambient.

Rentats finals:

- Transferiu el contingut del tub al filtre de placa porosa i renteu alternativament 6 cops amb 5 volums de tampó de rentat final (1) i (2).

Emmagatzemament:

- Transferiu a un tub que contingui 1 volum de tampó d'emmagatzemament amb azida de sodi al 0.01%.

Tampó d'acoblament: 0.25M NaHCO₃, 0.5M NaCl (pH 9.0)

Solució de rentat: 1mM HCl (pH 2-3)

Tampó de blocatge: 1M etanolamina (pH 8.0)

Tampó de rentat final (1): 0.1M tampó acetat (pH 4.0), 0.5M NaCl

Tampó de rentat final (2): 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) , 0.5 M NaCl

Tampó d'emmagatzemament: 2mM NaH₂PO₄ (pH 6.0)

Comprovació de la capacitat d'unió amb proteïna nativa:

(Tot el procés es realitza sota llum vermella)

- Acobreu una quantitat coneguda de rodopsina solubilitzada amb 1% DM en tampó d'extracció, amb 250 µl de Sepharosa acoblada a l' anticòs. Agiteu suaument durant 3 h a 4°C.
- Centrifugueu a 500 rpm amb la centrifuga de sobretaula Sorvall TC 6 durant 2 min, guardeu el sobrenedant (no unit).
- Renteu amb 5 ml de tampó D, 2 cops.
- Renteu amb 5 ml de tampó E, 2 cops.
- Passeu-ho tot a un eppendorf i incubeu en agitació amb 500 µl de tampó E amb una concentració final de pèptid 100mM durant 30 min a 4°C.
- Centrifugueu a 500 rpm amb la centrifuga de sobretaula Sorvall TC 6 durant 2 min per extreure l'elució 1. Incubeu dos cops més amb 500 µl de la dissolució que conté el pèptid durant 15 min i centrifugueu per obtenir les elucions 2 i 3.
- Guardeu les elucions a 4°C. Quantifiqueu la quantitat de proteïna regenerada purificada recuperada mesurant l'absorbància a 500 nm amb l'espectrofotòmetre, i la puresa de la mostra mesurant la relació A_{280}/A_{500} .

III.3.5. Extracció de la proteïna G transducina a partir de retines bovines

Per a l'obtenció de la proteïna G_t s'ha seguit el procediment descrit inicialment per Fung i altres (1981), basat en la unió de la proteïna G_t a la rodopsina fotoactivada i posterior alliberament per addició de GTP en excés. La G_t obtinguda es concentra i es separa del GTP mitjançant una columna cromatogràfica de bescanvi aniónic. Tot el procés es realitza amb llum i a 4 °C.

- Descongeleu 200 retines i dividiu-les en 8 tubs. Afegiu 15 ml de solució de sacarosa 30 % (p/v) a cada tub. Agiteu i homogeneïtzeu amb vòrtex durant 1 min. Centrifugueu 6 min a 5000 rpm (rotor A8-24, Kontron).

- Col·loqueu els sobrenedants en un erlenmeyer de 600-800 ml. Repetiu el primer pas un cop més. Uniu els sobrenedants amb els anteriors.
- Afegiu a l'erlenmeyer amb els sobrenedants 1 volum (250 ml aproximadament) de tampó 1X, lentament i agitant. Centrifugueu 10 min a 14.000 rpm (rotor A8-24, Kontron). Llenceu els sobrenedants.
- Resuspeneu els pellets en 80-100 ml de sacarosa 15%. Col·loqueu 15 ml de sacarosa 0.64 M en 8 tubs de centrifuga i afegiu lentament sobre aquesta solució 10-15 ml per tub dels pellets resuspessos. Centrifugueu 10 min a 14.000 rpm (A8-24). Llenceu els sobrenedants.
- Resuspeneu els pellets en 45 ml de sacarosa 0.64 M. Homogeneïtzeu amb *pestle* i xeringa.
- Prepareu 6 gradients de sacarosa. Col·loqueu 9 ml de sacarosa 0.78 M i amb l'ajut de la xeringa aneu col·locant per sota 9 ml de sacarosa 1 M i després 9 ml de sacarosa 1.20M.
- Col·loqueu lentament a cada tub 8-9 ml dels pellets resuspessos en sacarosa 0.64 M. Centrifugueu a 25.000 rpm durant 45 min (rotor AH629, Sorvall) sense fre. Recupereu la franja entre 0.78 M / 1 M (membranes de ROS).
- Diluïu les membranes a 200 ml amb tampó 1X.
- Centrifugueu 30 min a 20.000 rpm (rotor T865, Sorvall). Renteu els pellets isotònicament amb 200 ml de tampó 1x (2 cops). Cada cop que es renten les membranes es resuspeneu amb *pestle* i xeringa. Descarteu els sobrenedants.
- Resuspeneu els pellets en 150 ml de tampó hipotònic. Centrifugueu durant 30 min a 40.000 rpm (rotor T865). Renteu dos cops més i descarteu els sobrenedants.
- Resuspeneu els pellets amb 200 ml de tampó hipotònic amb 100µM de GTP. Centrifugueu 30 min a 40.000 rpm (rotor T865) i guardeu els sobrenedants. Repetiu l'extracció 2 cops més.
- Carregueu els sobrenedants obtinguts al pas anterior a la columna de DEAE Bio-Gel A (flux 1ml/min)
- Deixeu la columna rentant tota la nit amb tampó d'equilibri (flux 0.2 ml/min).
- Renteu la columna amb 300 ml de tampó de rentat (elueix GDP i GTP) fins que el pic baixi.
- Eluïu la proteïna Gt amb tampó d'elució.
- Uniu les fraccions obtingudes i poseu-les a dialitzar en sacs de COT 3500.
- Guardeu la proteïna Gt en aquest tampó a -20°C.

El control de la puresa de les extraccions de la proteïna Gt es realitza per electroforesi en gel d'acrilamida.

Solucions emprades:

Tampó 10X: 700 mM KPO₄ (pH 6.8), 10mM MgCl₂

Solucions de sacarosa: 30 % sacarosa (p/v)
 15 % sacarosa (p/v)
 0.64M sacarosa
 0.78M sacarosa
 1.00M sacarosa
 1.20M sacarosa

Preparades en tampó 1x 70mM KPO₄ (pH 6.8), 1mM MgCl₂ afegint 0.1mM PMSF, 5mM β-mercaptoetanol en el moment de ser utilitzades.

Tampó hipotònic: 5mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 0.1 mM PMSF.

Tampó equilibri columna: 5mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol.

Tampó rentat columna: 5mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol.

Tampó d'elució: 500 mM NaCl, 5mM Tris HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol.

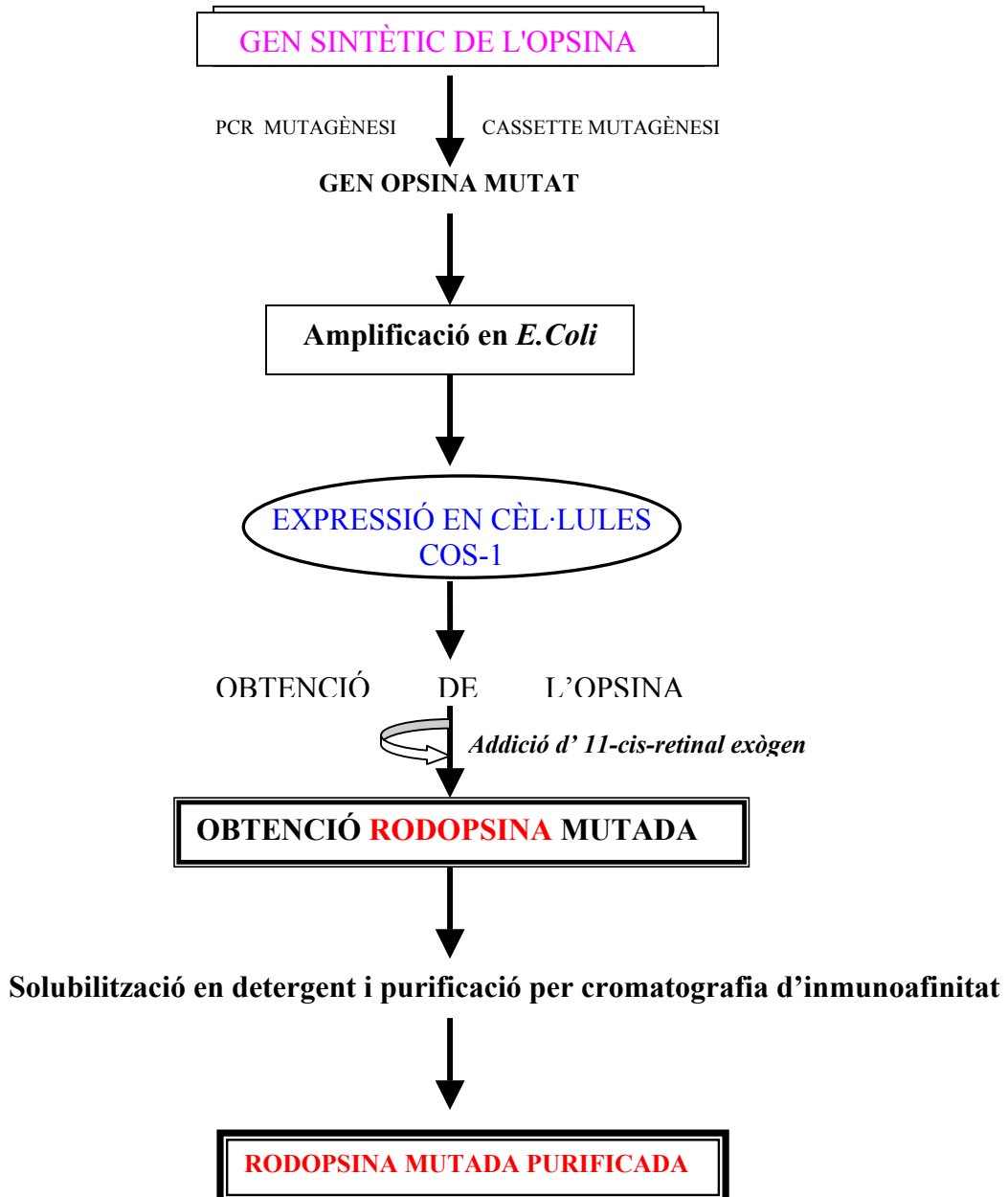
Tampó diàlisi: 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 50% glicerol.

Per a la quantificació de la proteïna Gt obtinguda s'utilitza el mètode de Bradford (1976), usant l'albumina de sèrum boví (BSA) com a proteïna estàndard.

III.4. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

III.4.1. ESQUEMA GENERAL DEL MÈTODE PER A L'OBTENCIÓ DE LES RODOPSINES RECOMBINANTS MUTADES

El procediment seguit per a l'obtenció de les rodopsines recombinants WT i mutades a partir del gen sintètic de l'opsina bovina es mostra al següent esquema:



III.4.2 CLONATGE I MANIPULACIÓ DEL DNA

III.4.2.1. Competència i transformació de cèl·lules d' *E.Coli*

Preparació de cèl·lules competents d' *E.Coli*

El mètode utilitzat per a l'obtenció de cèl·lules competents és una adaptació de Sambrook i col. (1986) aplicat a la soca DH5 α d' *E.coli*. Les condicions d'esterilitat són necessàries durant tot el procés.

- Inoculeu una colònia procedent d'una placa en 5 ml de medi de cultiu LB. Incubeu tota la nit en agitació a 37°C.
- Inoculeu 50 ml de medi LB amb 2-3 ml del precultiu anterior. Incubeu a 37 °C en agitació fins que la A₅₅₀ sigui 0.4-0.5, que correspon a la fase de creixement exponencial.
- Refredeu en gel 15 min.
- Transferiu el cultiu a tubs de centrífuga estèrils i centrifugueu a 5.000 rpm en una centrífuga d'ependorfs durant 5 min a 4°C.
- Decanteu el sobrenedant i resuspeneu el sediment en 25 ml de CaCl₂ 50mM fred i estèril.
- Deixeu en gel durant 45-60 min.
- Centrifugueu a 5.000 rpm durant 5 min a 4°C. Decanteu el sobrenedant.
- Resuspeneu molt suaument el sediment en 5 ml de CaCl₂ 50mM, 20% glicerol.

Aliquoteu en un volum de 150 μ l per eppendorf i guardeu-ho a -80°C fins el moment d'utilitzar-ho, comproveu l'eficiència de transformació de les cèl·lules competents preparades amb 50-100 ng de DNA plasmídic.

Transformació de cèl·lules competents d' *E.Coli*

- Descongeleu una aliquota de cèl·lules competents mantenint-la en gel durant 10 min.
- Barregeu tot el producte de lligació si correspon a un mutant, o bé 100 ng del DNA plasmídic a transformar amb les cèl·lules competents. Deixeu-ho 30 min en gel.
- Realitzeu el xoc tèrmic: incubeu 2 minuts en un bany a 42°C , passeu ràpidament a gel 2 minuts més.
- Afegiu 400 μ l de medi LB i incubeu a 37°C en agitació durant 1 h.
- Sembreu en plaques de medi LB amb agar que contenen l'antibiòtic necessari per la selecció de les cèl·lules transformants.
- Incubeu les plaques a 37°C durant 12-16 h com a màxim per evitar el creixement de colònies sense plàsmid.

Les colònies que creixen en principi han incorporat el plàsmid però cal analitzar si aquest DNA està correctament i si conté l'insert d'interès.

III.4.2.2. Preparacions de DNA plasmídic

III.4.2.2.1. Mètode de lisi alcalina

L'extracció de DNA plasmídic a petita escala és una modificació de Sambrook i al., (1989).

- Inoculeu varies colònies úniques procedents de la placa de transformació en 3 ml de medi LB suplementat amb 1 µl d'ampicil·lina (50µg/µl) per ml de medi.
- Incubeu a 37°C en agitació durant 12 h.
- Transferiu 1.5 ml del cultiu de nit a un eppendorf i centrifugueu 1 minut a 12.000 rpm en una centrífuga d'eppendorfs. Deseu la resta de cultiu a 4°C.
- Elimineu completament el sobrenedant i resuspeneu completament el sediment de cèl·lules amb l'ajut del vòrtex en 100 µl de Solució I (conservada a 4°C).

| | |
|------------|------------------------|
| Solució I: | Glucosa 50 mM |
| | Tris-HCl 25mM (pH 8.0) |
| | EDTA 10mM |

- Afegiu 200 µl de Solució II acabada de preparar. Invertiu varis cops el tub suaument. Espereu 5 min en gel.

| | |
|-------------|------------|
| Solució II: | NaOH 0.2 N |
| | SDS 10% |

- Afegiu 150 µl de Solució III (4°C) i barregeu invertint el tub suaument. Deixeu precipitar sobre gel 5 min.

| | | | |
|--------------|------------------------------|----|---------|
| Solució III: | Acetat de potassi | 5M | 60 ml |
| | Àcid acètic glacial | | 11.5 ml |
| | H ₂ O destil·lada | | 28.5 ml |

- Centrifugueu durant 5 min a 12.000 rpm en centrífuga d'eppendorfs. Transferiu el sobrenedant a un tub nou.
- Afegiu al sobrenedant un volum de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1). Barregeu amb el vòrtex i centrifugueu 2 min a 12.000 rpm. El fenol s'emporta les proteïnes i es forma una fina pel·lícula que separa aquesta solució de la part superior on hi ha la mostra.
- Realitzeu un rentat amb cloroform: alcohol isoamílic (24:1) per extreure les restes de fenol que hagin pogut quedar a la mostra.
- Afegiu al sobrenedant 1 volum d'isopropanol o 2 volums d'etanol per precipitar el DNA. Barrejar-ho be, deixeu precipitar durant 5 min a temperatura ambient i centrifugueu 10 min a 12.000 rpm en la centrífuga per eppendorfs.
- Elimineu el sobrenedant per aspiració i renteu el precipitat amb 500 µl d'etanol 70%. Centrifugueu a 12.000 rpm 5 min.
- Elimineu el sobrenedant i deixeu assecar el DNA.
- Resuspeneu el DNA precipitat en 50 µl d'aigua o tampó TE (pH 8.0) que contingui RNAsa (1.25 mg/ml), deixeu digerint a 37°C durant 1 hora. Conserveu-ho a -20°C.

Per comprovar que les colònies transformants contenen el DNA plasmídic amb el nostre gen d'interès, agafeu 5 µl del DNA plasmídic obtingut i realitzeu una digestió a 37°C durant 1 hora amb els enzims *EcoR I / Not I* o bé *EcoR I / Sal I*. Analitzeu-ho fent una electroforesi en gel d'agarosa 1%.

III.4.2.2.2. Maxiprep

Per a obtenir grans quantitats de DNA plasmídic s'inoculen 400 ml de medi LB + ampicil·lina amb un precultiu de les cèl·lules d'*E.Coli* que contenen el DNA que desitgem amplificar. Aquest cultiu s'incuba a 37°C en agitació a 250 rpm en un incubador d'aire Bottmigen durant tota la nit (12-16 h).

La purificació del DNA es realitza amb el kit de purificació per DNA plasmídic a gran escala de Quiagen o bé amb el kit CONCERT de Life Technologies.

Determinació espectrofotomètrica de la concentració de DNA:

Es realitza la mesura de l'absorbància a 260 nm d'una al·lquota diluïda del DNA obtingut. Una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a 50 µg/ml per a DNA de doble cadena. Si es mesura també la relació A_{260}/A_{280} s'obté una estimació de la puresa de la mostra, aquesta relació ha de ser d'entre 1.7-1.8.

III.4.2.3. Mutagènesi dirigida

III.4.2.3.1. Mutagènesi dirigida per reemplaçament tipus "cassette"

Aquesta tècnica es basa en l'obtenció, a partir del plàsmid pMT4 que conté més de 40 dianes de restricció úniques, d'una sèrie de fragments de restricció compatibles entre ells i que junt amb l'oligonucleòtid sintètic que conté la mutació puntual podran tornar a lligar-se obtenint el plàsmid intacte i amb la mutació puntual introduïda.

Tot i ser una tècnica senzilla no sempre funciona per a certes posicions a mutar en el gen de l'opsina, en aquests casos es va emprar la mutagènesi dirigida per PCR.

El disseny d'una bona estratègia de clonatge és bàsic per l'èxit d'aquesta tècnica; és recomanable tenir en compte una sèrie de consideracions:

- Utilitzar el mínim nombre de fragments possibles.
- Evitar l'ús d'enzims de restricció que generin altres fragments de la mida del fragment de restricció que ens interessa.
- No treballar amb fragments de restricció de mida similar a la del vector sense digerir ja que no es poden separar bé i poden estar contaminats amb el plàsmid WT a l'hora de purificar-los.
- Considerar les condicions de digestió per a cada enzim de restricció utilitzat: temperatura de digestió, tampons, presència de "star activity", sensibilitat a metilacions etc. Això determina el fet de poder digerir amb dos enzims alhora o realitzar digestions seqüencials.

Aquest disseny de l'estratègia de clonatge és diferent per a cada posició mutada.

III.4.2.3.2. Digestions amb enzims de restricció

Els enzims de restricció emprats s'utilitzen cadascun amb el seu tampó i temperatura òptima de treball. Cal evitar el contingut alt de glicerol o solvents orgànics en la barreja per tal que la digestió sigui correcta. Aquests enzims han estat subministrats per Boehringer, Amersham, Promega i New England Biolabs.

Digestions analítiques

La quantitat de DNA a digerir oscil·la entre 0.5-1 µg/µl en un volum de 10-20 µl. Els enzims utilitzats per a aquest tipus de digestió són *EcoRI* i *NotI* en una proporció de 1 unitat per µg de DNA; aquests dos enzims treballen amb el mateix tampó d'incubació. La barreja s'incuba a 37°C durant 1 h.

Digestions preparatives

La quantitat d'enzim utilitzat en general va ser de 1U/µg DNA; la quantitat de DNA a digerir i les condicions de la digestió varien segons els mutant que es vol obtenir:

| <i>Mutants posició 125</i> | <i>G114D</i> | <i>PI71Q</i> |
|---|---|---|
| 6-10 µg DNA | 6-10 µg DNA | 2-10 µg DNA |
| Digestió 1 seqüencial: Pvu I 1h 37°C + Nhe I 1h 37°C. | Digestió 1 seqüencial: Pvu I 1h 37°C + Nhe I 1h 37°C. | Digestió 1 seqüencial: Sfi I 1h 50°C + XbaI 1h 37°C |
| Digestió 2 seqüencial: Xho I 1h 37°C + Nhe I 1h 37°C. | Digestió 2 seqüencial: Xho I 1h 37°C + Nhe I 1h 37°C. | -- |
| Fragments a lligar: 3.800pb (1 ^a) i 2290 pb (2 ^a). | Fragments a lligar: 3.800 (1 ^a) i 2290 (2 ^a) pb. | Fragments a lligar: 2780,1881 i 1497 pb. |
| <i>H211R</i> | <i>L328P</i> | <i>A346P</i> |
| 2-10 µg DNA | 10 µg DNA | 10 µg DNA |
| Digestió 1 <i>EcoRI</i> + <i>NotI</i> 1h 37°C → purif. Fragment 1054 pb | Digestió 1 seqüencial: Nhe I 1h 37°C + Sal I 1h 37°C | 1 ^a digestió seqüencial: Nhe I 1h 37°C + Sal I 1h 37°C |
| Digestió 2 seqüencial: fragment 1054 pb <i>AvaII</i> 1h 37°C + <i>PvuII</i> 1h 37°C | Digestió 2 seqüencial: <i>BstEII</i> 1h 37°C + Nhe I 1h a 37°C | 2 ^a digestió seqüencial: Nhe I 1h 37°C + <i>NotI</i> 1h 37°C |
| Fragments a lligar: 5128 pb (1 ^a) + 632, 374 pb (2 ^a) | Fragments a lligar: 1628 pb (1 ^a) + 4506 pb (2 ^a) | Fragments a lligar: 4554pb (1 ^a) + 1578 (2 ^a) |

III.4.2.3.3. Electroforesi i recuperació de DNA en gels d'agarosa

El poder de separació dels gels d'agarosa és funció de la concentració de l'agarosa dissolta. La migració dels àcids nucleics a través del gel d'agarosa és també dependent del pes molecular (per fragments lineals), conformació i gradient de voltatge.

| % Agarosa | Grandària del DNA (Kb) |
|------------------|-------------------------------|
| 0.3 | 60-5.0 |
| 0.6 | 20-1.0 |
| 0.7 | 10-0.8 |
| 0.9 | 7-0.5 |
| 1.2 | 6-0.4 |
| 1.5 | 4-0.2 |
| 2.0 | 3-0.1 |

Taula 2. Rang de separació de fragments efectiu en funció del percentatge del gel d'agarosa.

Preparació gel d'agarosa 1%:

- Peseu 0.5 mg d'agarosa i afegir 50 ml de tampó TAE 1x.
- Escalfeu en el microones durant 2 min, comproveu que la solució sigui homogènia.
- Deixeu refredar una mica i abocar el gel al motlle amb la pinta ja col·locada, deixeu polimeritzar.
- Un cop el gel es torna opalescent, es pot retirar la pinta suaument i submergiu el gel en la cubeta d'electroforesi amb tampó TAE 1x.
- Carregueu les mostres al gel (10-20 μ l) que contenen 1-2 μ l de tampó de càrrega 10x.

Tampó TAE 1x 40mM Tris (pH 7.6), 20mM àcid acètic, 1mM EDTA

Prepareu stock TAE 50x:

242g Tris base (MW=121)

57.1 ml àcid acètic glacial

100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

Ajusteu fins un volum final d'1 litre.

Tampó de càrrega (stock 10x)

50% glicerol, 0.25 % (p/v) blau de bromofenol en tampó TAE 1x.

Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa:

Un cop finalitzada l'electroforesi, es realitza la tinció del gel d'agarosa amb bromur d'etidi que és un agent fluorescent intercalant de les bases nitrogenades quan s'il·lumina amb llum UV. Això ens permet visualitzar la banda d'interès i es recupera utilitzant el kit de purificació GeneClean (Bio101).

Solució de bromur d'etidi

10 µl solució stock de bromur d'etidi (BioRad) en 200 ml de TAE 1x.

Submergiu el gel durant 10 minuts en aquesta solució agitant.

Destenyiu durant 5 minuts en aigua destil·lada.

Visualitzeu el gel il·luminant amb una làmpada d'UV (312-365nm).

III.4.2.3.4. Estimació de la concentració de DNA en gels d'agarosa

Es realitza una mesura aproximada que s'obté de comparar la intensitat de fluorescència en l'UV de la mostra respecte un marcador de DNA de pes molecular i concentració coneguts.

III.4.2.3.5. Unió d'oligonucleòtids sintètics

- Barregeu 10 µl de Tampó A + aigua + solució mare d'oligonucleòtids fins a obtenir un volum final de 100 µl. La concentració final és de 2pmol/µl per cada oligòmer.
- Cobriu la solució amb 25 µl d'oli mineral.
- Escalfeu a 90° C durant 3 min. Aquest pas es realitza en un bloc tèrmic cobert amb paper d'alumini.
Després de 3 min, apagueu l'aparell i deixeu que es refredi lentament durant varies hores o tota la nit.
- Transferiu la solució aquosa a un altre tub evitant que quedin restes d'oli mineral.
- Deseu els oligonucleòtids a -20° C.

Tampó A (10x):

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

100 mM MgCl₂

III.4.2.3.6. Lligació de fragments de DNA

Per la lligació dels fragments generats per digestió enzimàtica, s'utilitza la lligasa del bacteriòfag T4 (Boehringer Mannheim, 1U/µl).

- En un tub eppendorf barregeu les quantitat necessàries de fragments amb un excés d'oligonucleòtids units de 50 cops respecte la quantitat de fragments.
- Afegiu el tampó i l'aigua fins el volum adequat. Per últim afegiu 1-2 unitats de lligasa (segons volum).
- Incubeu a 16° C durant tota la nit (per extrems cohesius) o a 25°C durant 2-3 hores (per extrems roms) o bé a 4 °C durant un cap de setmana.

Cal realitzar en paral·lel una lligació control sense la presència dels oligonucleòtids.

III.4.2.4. Mutagènesi dirigida per reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

S' empra la PCR per introduir mutacions puntuals en el gen de l'opsina bovina segons el mètode descrit en el kit de mutagènesi dirigida QuickChange (Stratagene, ref. 200518). A partir de dos oligonucleòtids sintètics, complementaris a les cadenes oposades del vector i que continguin la mutació desitjada, es realitza l'amplificació amb la *Pfu* DNA polimerasa que copia ambdues cadenes plasmídiques amb elevada fidelitat. Després, el producte de la PCR és digerit amb l'enzim *Dpn I*, que és específic per DNA metil·lat o hemimetil·lat i s'utilitza per digerir el DNA parental motlle i seleccionar el DNA de nova síntesis que conté la mutació.

| MUTANT | ENCEBADORS EMPRATS |
|--------------|--|
| M44T | 5'-GCCGCCTAC A CGTTCCTGCTGATC-3' 3'-CGGCGGATGT G CAAGGACGACTAG-5' |
| G106W | 5'-CATGGGTACTTCGTCTTT T GGCCGACGGGCTGCAACC-3' 3'-CCATGAAGCAGAAA A CCGGCTGCCACGTTGGAGCT-5' |
| R135L | 5'-GGCGATCGAGCTGTACGTGGTGG-3 3'-CCGCTAGCTCG A CATGCACCACC-5' |
| V137M | 5'-CGAGCGGTACATGGTGGTGTGC-3' 3'-GCTCGCCATGTACCACCACACG-5' |

Taula 3. Nom dels mutants i seqüència nucleotídica dels encebadors mutagènics emprats en les PCR. En negreta s'indica la base canviada.

Les condicions de PCR emprades per cada mutant i quantitats necessàries de cada component de la barreja d'amplificació es mostren en la taula n° 4. Sobre la barreja final s'afegeixen unes gotes d'oli mineral per evitar l'evaporació d' H₂O durant el procés. En cada reacció es realitzen controls negatius sense afegir la polimerasa.

Taula 4.

| | M44T | G106W | R135L | V137M |
|---|---|---|--|--|
| Condicions PCR | 18x (95°C,30''+55°C,1'+ 68°C 6.1') +4°C | 18x (95°C,30''+55°C,1'+ 68°C 6.1') +4°C | 30x (95°C,30''+60°C,1'+ 68°C 10') +4°C | 30x (95°C,30''+60°C,1'+ 68°C 10') +4°C |
| DNA (stock 40ng/μl) | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl |
| Tampó 10x | 5 μl | 5 μl | 5 μl | 5 μl |
| Encebador 1 (stock 0.1μg/μl) | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl |
| Encebador 2 (stock 0.1μg/μl) | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.25 μl |
| Barreja dNTPs (stock 10mM) | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl |
| <i>Pfu</i> DNA polimerasa (2.5u/μl) | 1.25 μl | 1.25 μl | 1.5 μl | 1.5 μl |
| H ₂ O estèril | c.s.p.50μl | c.s.p.50μl | c.s.p.50μl | c.s.p.50μl |

III.4.2.5. SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

Per comprovar la incorporació de les mutacions puntuals introduïdes per *cassette* mutagènesi o bé per PCR en el gen de l'opsina, s'utilitza el mètode de seqüenciació enzimàtic de Sanger (Sanger i col.,1977). La seqüenciació es realitza automàticament i s'empren diferents *primers* en funció de la posició de la mutació en el gen.

| Nom | Seqüència | Mutants |
|------|--|---|
| EX23 | 5'CAACTACATCCTGCTCAACC3' | G106W,G114D,R135L, V137M,P171Q, Mutants 125,H211R |
| PB7 | 5'CTGCCATATGCTGGTGTGGCGTTCTACATCTTCACC3' | L328P,A346P |
| EX28 | 5'TGTAGAGGGTGGTGGTGAAGCCACCGA3' | M44T |

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats en la detecció de la mutació introduïda

III.4.3. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

Un cop clonats els diferents mutants del gen de l'opsina és necessari introduir-los en un sistema eucariota per expressar l'opsina mutada. Aquesta expressió és transitòria i s'utilitzen cèl·lules COS-1 que són un vehicle òptim per a l'expressió d'aquestes proteïnes en membrana. A continuació s'expliquen els protocols emprats en el nostre cas per a l'expressió i purificació del les proteïnes recombinants.

III.4.3.1 Transfecció en cèl·lules COS-1 pel mètode DEAE-dextrà

Es tracta d'un mètode de transfecció transitòria en el qual per a obtenir la proteïna expressada en membrana cal recol·lectar les cèl·lules màxim 72 h després de posar-les en contacte amb el DNA. Aquesta tècnica permet unes condicions químiques favorables per a l'adhesió del DNA a la superfície cel·lular, essent endocitat per les cèl·lules. El procediment és el següent:

- Aspireu el medi de cultiu i renteu les plaques amb 5-8-ml de DEMEM++
- Afegiu per placa la següent solució de DNA complexat al DEAE-dextrà:

20 µg DNA plasmídic
 1 ml DEAE-dextrà (2.5mg/ml)
 1 ml Tris-HCl 1M (pH 8.0)
 Ajusteu fins a 10 ml amb DEMEM+++

- Incubeu durant 6 h.
- Aspireu la solució amb el DNA/DEAE-dextrà i renteu amb 5-8 ml de DEMEM++.
- Afegiu 10 ml per placa de solució de Cloroquina 0.1mM. Incubeu durant 3 h.
- Aspireu la solució i renteu les plaques dos cops amb 8 ml de DEMEM++.
- Afegiu 15 ml de medi DEMEM+++ i deixeu incubant 24 h, després realitzeu un canvi del medi de creixement.

- Recol·lecteu les cèl·lules com a màxim 72 h després de posar-les en contacte amb el DNA.

DEMEM++ Medi DEMEM amb 5 ml d'una solució de Penicil·lina (10.000 u /ml) i Streptomicina (10.000 µg/ml) en un volum final de 500 ml.

DEMEM+++ Medi de creixement complet, 50ml de FBS+ 5 ml d'una solució amb Penicil·lina (10.000u/ml), Streptomicina (10.000 µg/ml), L-Glutamina (29.2 mg/ml) en un volum final de 500 ml.

Solució stock DEAE-dextrà (2.5mg/ml):

1.125 gr DEAE-dextrà en 450 ml de DEMEM+++.

Esterilitzeu per filtració en les unitats Millipore de 2µm.

Guardeu a 4°C com a màxim 1 mes.

Solució stock Cloroquina 1mM:

Dissoleu 0.26 gr de Cloroquina en 500 ml d'aigua.

Ajusteu pH 7.2 amb NaHCO₃.

Esterilitzeu per filtració en les unitats Millipore de 2µm.

Guardeu-ho a 4°C protegit de la llum com a màxim 1 mes.

III.4.3.2. Purificació de les proteïnes recombinants

Un cop les cèl·lules COS-1 han incorporat el DNA al seu interior i han expressat la proteïna a la membrana, es realitzen els següents passos per a la seva purificació:

III.4.3.2.1. Regeneració de les opsines recombinants en membrana amb 11-cis-retinal i solubilització en DM

- Recol·lecteu les cèl·lules de la placa passades 72 h màxim de la transfecció.
- Renteu la placa amb 10 ml de tampó A per placa.
- Recol·lecteu les cèl·lules amb l'ajut d'un *scraper* en 5 ml de tampó A per placa. Col·loqueu-les totes en un tub.
- Centrifugueu a 1500 rpm en la centrífuga de sobretaula Sorvall TC6 durant 3 min a 4°C. Elimineu el sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules en 2ml de tampó A per placa. (a partir d'aquest pas totes les manipulacions es realitzen a les fosques amb llum vermella).
- Afegiu 11-*cis*-retinal (obtingut del Dr. Philippov, Universitat de Moscow) en una concentració final de 30 µM.
- Incubeu en agitació suau durant 3 h a 4°C.

Solubilització de les membranes de les cèl·lules COS-1

- Afegiu al tub que conté les cèl·lules amb l'11-*cis*-retinal les quantitats necessàries dels stocks: DM 10x, ATP+MgCl₂ i PMSF 100mM per obtenir la concentració del tampó B.
- Incubeu 1 h en agitació a 4°C.
- Centrifugueu la mostra solubilitzada a la ultracentrífuga a 35.000 rpm (rotor A824, Sorvall) durant 30 min a 4°C.

III.4.3.2.2. Purificació de les proteïnes recombinants per cromatografia d' immunoafinitat

- Afegiu el sobrenedant resultant de la centrifugació a 250 µl de Sepharosa 4B acoblada a l'anticòs Rho1D4 (vegeu apartat III.3.4. de **Materials i mètodes**), prèviament rentada amb tampó A.
- Incubeu en agitació suau durant 3 h a 4°C.
- Centrifugueu la mostra a 500 rpm 2 min a 4°C, descarteu el sobrenedant.
- Renteu la sefarosa 5 cops amb 10 ml de tampó C.
- Renteu la sefarosa 10 cops amb 10 ml de tampó D.
- Passeu-ho tot a un eppendorf i incubeu-ho amb 500 µl de pèptid 100mM en tampó D (l'elució es fa en condicions d'elevada força iònica) durant 30 min en agitació a 4°C.
- Centrifugueu a 500 rpm a la centrífuga de sobretaula Sorvall TC9 durant 2 min i recupereu l'elució 1. Incubeu 2 cops més amb 500 µl de la solució amb pèptid durant 15 min en agitació a 4°C i centrifugueu a 500 rpm 2 min per recuperar les elucions 2 i 3.
- Quantifiqueu amb l'espectrofotòmetre la proteïna obtinguda de la purificació mesurant l'absorbància a 500 nm, prenent com a valor de coeficient d'extinció molar el mateix que per la proteïna nativa, es a dir $\epsilon=40600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; i la puresa de la mostra mesurant la relació $A_{280} / A_{500 \text{ nm}}$.

Tampó A : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2).

Tampó B : Tampó A + 5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF, 1% DM.

Tampó C: 10 mM TrisHCl (pH 8.0), 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 0.05% DM.

Tampó D : Tampó A+ 0.05% DM.

Pèptid: APAVQSTET (Stock 4mM en aigua)

Aquest pèptid correspon als 9 aminoàcids de la part C-terminal de la rodopsina i que interaccionen amb l'anticòs. Va ser obtingut del Servei de síntesis de pèptids de la Facultat de Químiques de la U.B.

III.4.3.3. Preparació i regeneració de les proteïnes recombinants en membranes de cèl·lules COS-1

Aquest protocol s'utilitza per comprovar la regeneració de mutants que no és possible de purificar-los segons la tècnica descrita anteriorment degut a que la mutació impedeix el reconeixement per part de l'anticòs o bé per la seva inestable expressió.

- Recol·lecteu les cèl·lules i regeneu-les amb 10µM de retinal en tampó A (2ml/placa) durant 3 hores a 4°C en agitació suau.
- Renteu les cèl·lules de l'excés de retinal no unit amb 5 ml de tampó A (10 rentats).
- Resuspeneu les cèl·lules en 10 ml de tampó A + 1% DM + 0.1 mM PMSF. Incubeu en agitació suau durant 1 hora a 4°C.

- Centrifugueu a 30.000 rpm (rotor T865, Sorvall) durant 30 minuts.

- Recupereu el sobrenedant i realitzeu l'espectre d'absorció a les fosques i després d'il·luminar-lo durant 1 minut amb filtre que només deixa passar llum per sobre de 495 nm.
- A continuació es calculen els espectres de diferència corresponents

Els espectres es realitzen a 20°C, entre 700-240 nm i amb les següents condicions espectrals:

Scan rate: 120 nm/min

Interval de mesura de dades: 0.2 nm

Temps promig de mesura per punt: 0.1 seg

III.5. CARACTERITZACIÓ ELECTROFORÈTICA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS

Les electroforesis en gels de poliacrilamida en presència de SDS, permeten l'anàlisi de mesclades de proteïnes (Laemmli, 1970). Els gels d'acrilamida utilitzats per l'anàlisi de les proteïnes obtingudes són unidimensionals i desnaturalitzants (SDS-PAGE). Es basen en un suport físic format per fibres de monòmers d'acrilamida entrecruades amb bisacrilamida que polimeritzen en dissolució en presència de radicals lliures aportats per el persulfat d'amoni i que queden estabilitzats pel TEMED. El SDS és un detergent aniónic que s'uneix a les proteïnes carregant-les negativament, fent que migrin de manera proporcional al seu pes molecular.

III.5.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida

Les electroforesi es van realitzar en una unitat d'electroforesi Miniprotean (Bio-Rad), en gels amb un gruix de 0.75 o 1.5 mm, seguint les instruccions del fabricant per al muntatge dels vidres i la cubeta. Es va realitzar un gel separador (12% acrilamida) seguit d'un gel de càrrega a la part superior (4%) que concentra la mostra en un front sobre el gel separador facilitant l'entrada de tota la mostra a la vegada:

Gel separador (12% acrilamida):

| | |
|---|--------|
| Solució stok acrilamida/bisacrilamida (29:1; 40 %)(v/v) | 6 ml |
| Tampó Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) | 5 ml |
| SDS 10% (p/v) | 200 µl |
| Aigua | 8.7 ml |
| TEMED | 10 µl |
| Persulfat d'amoni 10% (p/v) | 100 µl |

Gel de càrrega o apilador (4% acrilamida):

| | |
|--|---------|
| Acrilamida/bisacrilamida (29:1;40%)(v/v) | 500 µl |
| Tampó Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) | 1.26 ml |
| SDS 10% (p/v) | 50 µl |
| Aigua | 3.18 ml |
| TEMED | 5 µl |
| Persulfat d'amoni 10% (p/v) | 25 µl |

- Dipositeu el gel separador i deixeu polimeritzar. Cobriu amb una petita capa d'alcohol isopropílic.
- Dipositeu el gel de càrrega sobre el gel separador, prèviament traieu l'alcohol isopropílic, i deixeu polimeritzar introduint la pinta per formar les butxaques de càrrega.
- Col·loqueu els gels a la cubeta i poseu el tampó d'electroforesi.
- Apliqueu la mostra afegint prèviament el tampó de càrrega (1/5 part del volum final) a cada butxaca i el marcador de pes molecular estàndar. Abans d'afegir el tampó de càrrega a la mostra, cal preparar-lo en el moment, afegint per cada 950 µl de tampó de càrrega 50 µl de β-mercaptoetanol.
- Resoleu el gel a voltatge constant de 110 V durant 1,5 h.

Tampó de càrrega (5x):

| | |
|--------------------------------|--------|
| TrisHCl 0.5M (pH 6.8) | 1 ml |
| SDS 10% (p/v) | 1.6 ml |
| Blau de bromofenol 0.05% (p/v) | 0.2 ml |
| Glicerol | 0.8 ml |
| Aigua | 4 ml |

Tampó d'electroforesi 10x (Bio-Rad):

Prepareu per l'electroforesi tampó 1x diluint-lo amb aigua, les concentracions finals són:

| | |
|-----------|------------|
| Tris Base | 25mM |
| Glicina | 192 mM |
| SDS | 0.1% (p/v) |
| pH 8.3 | |

Marcador de pes molecular (Bio-Rad): Conté proteïnes de pesos moleculars 200, 116, 97.4, 66, 45, 31, 21.5, 14.5 i 6 KDa

III.5.1.1. Tinció del gel de poliacrilamida amb coomassie

- Tenyiu el gel d'electroforesi durant 30 min en agitació amb la següent solució de tinció:

| | |
|----------------|-------------|
| Comassie R-250 | 0.1 % (p/v) |
| Metanol | 40 % (v/v) |
| Àcid acètic | 10 % (v/v) |
| Aigua | 50 % (v/v) |

- Renteu el gel en solució destenyidora durant 30 min en agitació per eliminar la tinció inespecífica:

| | |
|-------------|------------|
| Metanol | 40 % (v/v) |
| Àcid acètic | 10 % (v/v) |

Aigua

50 % (v/v)

III.5.1.2. Tinció del gel de poliacrilamida amb Nitrat de plata

Aquesta tinció (Blum i col.,1987) permet visualitzar proteïnes en gels d'acrilamida amb un límit de sensibilitat de 2-5 ng de proteïna per banda (en el cas de la tinció amb coomassie es detecta màxim fins a 300 ng de proteïna)

- Incubeu el gel en metanol: àcid acètic: aigua (50:12:38) 20 min. Renteu 3 cops amb aigua, durant 5 min a cada rentat.
- Incubeu en etanol: àcid acètic: aigua (10:5:85) 3 cops, 10 min cada rentat. Renteu 2 cops amb aigua durant 5 min cada rentat.
- Incubeu en dicromat de potassi 3.4mM, àcid nítric 3.2mM en aigua acabat de preparar, durant 5 min a les fosques. Renteu 3 cops amb aigua durant 5 min cada cop.
- Incubeu en nitrat de plata 12 mM preparat en el moment, incubeu durant 20 min a les fosques. Renteu 1 cop amb aigua durant 5 min.
- Incubeu en una solució de carbonat de sodi 280 mM +Formol 0.05% (v/v), preparada en el moment, fins que la solució s'enfosqueixi . Canvieu-la per solució fresca, continueu agitant fins que apareguin les bandes i el fons es torni gris.
- Deteniu la reacció ràpidament amb àcid acètic 1%.

III.5.2. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE PROTEÏNES. *WESTERN BLOT*

Aquesta tècnica ens permet realitzar la transferència de les proteïnes del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa per poder realitzar la detecció específica de la rodopsina amb el seu anticòs, segons la metodologia descrita per Towbin i col (1979).

Aquesta detecció es colorimètrica, basada en un anticòs secundari biotinilat que reconeix l'anticòs específic unit a la proteïna, i que porta conjugada una molècula d'estreptavidina conjugada a la vegada a varies molècules de fosfatasa alcalina. Aquest enzim catalitza la reacció en afegir un substrat (NBT,BCPI) i es detecta el color del producte resultant. Tot aquest procés es realitza amb el kit per assaigs d'immunoblot amb fosfatasa alcalina amplificada de Bio-Rad.

Electrotransferència de proteïnes:

- Efectueu la transferència un cop finalitzada l'electroforesi SDS-PAGE, cal utilitzar marcadors de pes molecular pretenyits .
- Talleu un tros de filtre de nitrocel·lulosa de grandària lleugerament superior a la del gel a transferir, remulleu en el tampó de transferència la nitrocel·lulosa, les esponges i els papers de filtre del cartutx de transferència . Ompliu la cubeta de transferència amb el tampó de transferència.
- Col·loqueu el cartutx obert, amb una esponja i paper de filtre sobre cada cara del cartutx. Col·loqueu el gel d'acrilamida sobre la cara negra del cartutx, que quedarà cap a l'elèctrode negatiu. Mulleu-ho amb tampó abundantment i alliseu amb una pipeta per eliminar bombolles per sota del gel.
- Col·loqueu el paper de nitrocel·lulosa sobre el gel i torneu a allisar amb la pipeta fins que no quedin bombolles entre el gel i el paper de nitrocel·lulosa. Col·loqueu

l'altre paper de filtre i l'esponja sobre la nitrocel·lulosa. Tanqueu el cartutx i poseu-lo dins el recipient de transferència amb la cara negra cap a l'electrode negatiu.

- Connecteu la font d'alimentació i realitzeu l'electrotransferència a amperatge constant (400mA) durant 1,5 h.

Revelat de la membrana de *Western Blot*:

- Un cop finalitzada l'electrotransferència, traieu la membrana de nitrocel·lulosa del cartutx i deixeu-la en solució bloquejadora tota la nit a 4°C.
- Renteu 3 cops amb tampó TBST, durant 5 min cada rentat.
- Incubeu amb l'anticòs primari en un volum de 60 ml a una dilució de 1:1000 en TBST, durant 2 h a temperatura ambient en agitació.
- Renteu 3 cops amb TBST, 5 min cada rentat. Incubeu amb l'anticòs secundari (anti IgG conjugat a fosfatasa alcalina) diluït 1:7500 en TBST durant 2 h a temperatura ambient en agitació.
- Renteu 5 min amb tampó TBST.
- Renteu 5 min amb aigua.
- Renteu 5 min amb tampó fosfatasa alcalina.
- Reveleu la membrana amb una solució de 20 ml de tampó fosfatasa alcalina amb 20µl de NBT i 20µl de BCIP. Agiteu ràpida i immediatament.
- Deteniu la reacció amb aigua. Sequeu la membrana amb paper i guardeu-ho protegit de la llum.

Solució bloquejadora: 3% BSA en TBST (100ml)

TBST: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (TBS preparat en stock 10X)+ Tween20 0.05%.

BFA: Tris-HCl 100mM (pH 9.5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM.

Stock NBT (nitroblue tetrazolium chloride): 30 mg NBT en 1 ml Dimetilformamida (DMF) 70%.

Stock BCIP: 15 mg BCIP en 1 ml DMF.

III.6. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS PER ESPECTROSCÒPIA UV-VIS.

III.6.1. Introducció a l'espectroscòpia UV-Vis

Una de les aplicacions biològiques més importants de l'espectroscòpia UV-Vis és la mesura de concentracions i la mesura d'interaccions de lligands amb macromolècules. L'espectre d'absorció involucra transicions entre diferents nivells energètics dels electrons en les molècules, la radiació electromagnètica provoca l'oscil·lació dels electrons en resposta al camp elèctric incident. Aquestes transicions electròniques donen lloc a l'aparició de les manifestacions més usals donades per la interacció de la

radiació electromagnètica amb la matèria: color, visió, i la conversió de la llum en energia per les plantes.

L'energia involucrada en les transicions electròniques correspon a l'absorció de fotons en les regions de l'espectre del visible (400-750 nm) i l'ultraviolat (200-400 nm).

En moltes molècules, l'absorció d'un fotó ve determinada per l'excitació d'electrons d'un grup determinat d'àtoms; aquest grup s'anomena cromòfor, i es la unitat responsable de l'absorció en concret.

En el cas de la rodopsina la presència del cromòfor 11-*cis*-retinal, unit covalentment a la proteïna mitjançant un enllaç per base de Schiff al residu Lys296, li proporciona un espectre d'absorció característic en la zona del visible amb un pic de màxima absorció a 500 nm. Aquesta característica resulta de gran utilitat per la quantificació i caracterització de la rodopsina així com per detectar canvis en l'entorn del cromòfor que es tradueixen en informació estructural de la proteïna. La quantitat de proteïna mutant regenerada amb 11-*cis*-retinal és un paràmetre important que s'utilitza per mesurar el grau de plegament d'aquestes rodopsines recombinants (Garriga i al., 1996). La reducció en la formació de cromòfor ha estat prèviament associada amb un mal plegament de la rodopsina (Liu i al., 1996; Garriga i al., 1996; Ridge i al., 1995; Hwa i al., 1997), tot i així aquest concepte ha estat recentment revisat i redefinit (Reeves i al., 1999; Hwa i al., 1999).

III.6.2. Preparació de les mostres i condicions espectrals

Les mostres a analitzar per espectroscòpia UV-Vis es centrifuguen a 12.000xg durant 15 minuts, i s'extrau el sobrenedant per eliminar restes de sefarosa o altres partícules que contribueixen a la terbolesa de la mostra. De la mateixa manera, les mostres de ROS es solubilitzen i ultracentrifugen (vegeu apartat III.3.2.) per obtenir espectres lliures de terbolesa.

Els espectres s'han realitzat amb un espectrofotòmetre Varian model Cary 3 a 20°C. Les condicions per a la realització de l'espectre de les mostres purificades han estat les següents:

Rang espectral: de 620 fins a 220 nm

Scan rate (velocitat d'escombrat): 240 nm/min

Temps promig de mesura per punt: 0.1 seg

Amplada de banda: 2nm

Interval de mesura dades: 0.4 nm

Els espectres d'absorció de les mostres de proteïna recombinant purificada ens permeten obtenir, utilitzant el coeficient d'extinció molar de la proteïna a 500 nm $\epsilon=40600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, la quantitat de rodopsina obtinguda (mesura d'absorbància a 500nm) i el grau de puresa i/o plegament de la rodopsina (mesura de la relació A_{280}/A_{500}).

III.6.3. Assaig de blanqueig i acidificació de les proteïnes recombinants

Es va realitzar l'estudi de les propietats de "bleaching" i acidificació de les proteïnes mutants que formen el cromòfor amb l'11-*cis*-retinal.

Es tracta de seguir l'evolució de la proteïna il·luminant la mostra, això provoca la fotoisomerització del cromòfor i un desplaçament del màxim d'absorció a 380 nm corresponent a la desprotonació de la base de Schiff i amb la consegüent formació de l'intermediari Meta II. A continuació, s'acidifica la mostra i es deixa durant 2 minuts per tornar a realitzar un espectre. Aquesta acidificació provoca un desplaçament del màxim cap a 440nm, i permet comprovar la unió del cromòfor a la proteïna a través base de la base de Schiff, aquest desplaçament no arriba a 500 nm degut a que la proteïna està desnaturalitzada:

- Realitzeu l'espectre d'absorció de la mostra a les fosques.
- Il·lumineu la mostra (font d'il·luminació SEOM 250PRN) durant 10 segons a través d'un filtre de tall a 495 nm i tot seguit realitzeu l'espectre.
- A continuació acidifiqueu afegint un 1% del volum de la mostra de H₂SO₄ 2N (pH final 1.9). Espereu 2 minuts i torneu a fer l'espectre.

III.6.4. Assaig de reactivitat amb hidroxilamina

La hidroxilamina és un compost que reacciona amb la base de Schiff, provocant l'alliberament del retinal unit a la proteïna. La base de Schiff és considerablement estable en la rodopsina a les fosques en presència d'hidroxilamina, però reacciona ràpidament un cop la rodopsina s'il·lumina. Ha estat descrit que el reemplaçament d'aminoàcids que afectin l'entorn de la base de Schiff disminueix l'estabilitat dels pigments en presència d'hidroxilamina. La constant de velocitat del procés d'hidròlisi de la base de Schiff en presència d'hidroxilamina és una prova per determinar l'accessibilitat de la base de Schiff en la proteïna, i això ens ajuda a determinar el grau de plegament i/o compactació de la rodopsina salvatge i les proteïnes mutades.

S'ha estudiat la reactivitat amb hidroxilamina a les fosques per la rodopsina salvatge i per les mutades. Aquest assaig consisteix en realitzar el seguiment espectrofotomètric de la pèrdua d'absorbància de la banda a 500 nm corresponent al cromòfor després d'afegir hidroxilamina a la mostra.

- Realitzeu l'espectre de la mostra en tampó D (0.05% DM, pH 7.2) a les fosques.
- Afegiu a la mostra una alíquota del stock d'hidroxilamina 1M pH 7.0, per obtenir una concentració final de 25mM. Barrejeu la mostra per inversió i espereu 2 minuts. Totes les reaccions es realitzen a 20°C.
- Realitzeu cicles d'espectres d'absorció UV-Vis cada 10 minuts durant 4 hores.
- Els resultats són ajustats a una funció exponencial negativa simple, i els valors de la constant de velocitat de reactivitat són determinats en funció del valor del pendent de cada corba.

Condicions espectrals:

Programa (Cary win UV)

Rang espectral: de 620 fins a 250 nm

Scan rate (velocitat d'escombrat): 230.8 nm/min

Temps promig de mesura per punt: 0.43 seg

Amplada de banda: 2nm

Interval de mesura dades: 1.66 nm

III.6.5. Assaig d'estabilitat tèrmica de les proteïnes recombinants

S'ha realitzat el seguiment de la pèrdua d'absorbància a 500 nm de les proteïnes salvatge i mutants a 55 °C en funció del temps i a les fosques. Tots els assajos s'han realitzat amb les mostres inicialment a 20°C i en tampó D (0.05% DM, pH 7.2). Es tracta d'un blanqueig o “bleaching” de la proteïna degut, a la influència de la temperatura sobre l'entorn del retinal més que un estudi de l'estabilitat tèrmica intrínseca de les proteïnes mutants.

- Realitzeu l'espectre d'absorció de la mostra a les fosques.
- Un cop la temperatura s'estabilitza a 55 °C es torna a introduir la mostra en el portacubetes i es fan mesures de l'absorbància a 500 i 620 nm (per corregir qualsevol canvi en la línia base) . Es realitzen cicles cada 0.2 segons (programa Kinetics) fins que l'absorbància de la mostra s'estabilitza en el zero.
- El resultat de cada mostra s'ajusta a una funció exponencial simple a partir de la qual es calcula la $t_{1/2}$ per cada proteïna.

Condicions espectrals:

Programa (Cary win UV): Kinetics

Temperatura: 55°C

Mesura puntual a 500 i 600 nm

Temps promig de mesura per punt: 0.1 seg

Amplada de banda: 1.0 nm

Cicles: cada 0.2 seg

III.7. ASSAIG D' ACTIVACIÓ DE LA TRANSDUCINA PER LA RODOPSINA MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA.

III.7.1. Introducció a l'espectroscòpia de fluorescència

La fluorescència es una tècnica bastant avantatjosa en biologia ja que permet treballar amb mostres *in vivo* o *in vitro*, amb cèl·lules senceres, en condicions biològiques naturals. Es una tècnica gairebé no invasiva ja que, degut a la gran sensibilitat de la tècnica (permet treballar amb concentracions de fins 10^{-12} o 10^{-11} M), les concentracions de les sondes amb les que es treballa no es consideren tòxiques.

L'espectroscòpia de fluorescència es basa en l'emissió de fotons com a resultat de la relaxació de molècules excitades prèviament amb radiació electromagnètica.

A temperatura ambient, la majoria de les molècules es troben en el nivell vibracional més baix de l'estat vibracional ($S_{0,0}$), i després de l'absorció de la llum per part de la molècula, es poden donar diversos processos. En l'excitació inicial, un fluoròfor és generalment excitat des de l'estat fonamental fins a diferents nivells vibracionals tant del primer com del segon estat electrònic excitat. Exceptuant rares ocasions, les molècules es relaxen fins a l'estat vibracional més baix del primer estat electrònic excitat ($S_{1,0}$). Aquest procés de relaxació s'anomena conversió interna; té lloc en un temps d'aproximadament 10^{-12} segons i es completa abans de l'emissió fluorescent, de forma que després d'una excitació inicial i durant un temps molt curt s'obté una població de molècules que es troben a un nivell vibracional més baix del primer estat electrònic excitat ($S_{1,0}$). A partir d'aquí la relaxació fins a qualssevol dels nivells de l'estat fonamental ($S_{1,i}$) pot dur-se a terme mitjançant un procés radiatiu anomenat emissió fluorescent o fluorescència o bé mitjançant un procés no radiatiu que pot implicar diferents fenòmens com relaxació vibracional, *quenching*, relaxació pel solut, conversió interna, etc. Ambdós fenòmens competeixen ja que tenen lloc en un ordre de temps semblant (10^{-7} , 10^{-8} seg), de manera que es donarà un o altre depenent de les característiques moleculars, estructurals i intrínseques de cada molècula, les quals ens donaran les velocitats relatives de cada procés (Figura 13).

Les transicions d'emissió fluorescent són de més baixa energia que les transicions d'absorció, per això l'espectre d'emissió apareix a longituds d'ona més llargues que l'espectre d'absorció. Les molècules excitades, quan es troben en el primer estat vibracional ($S_{1,i}$) poden sofrir conversions al primer estat triplet. La posterior emissió de fotons a partir d'aquí s'anomena fosforescència i apareix a longitud d'ona superiors a les de la fluorescència (Figura 13).

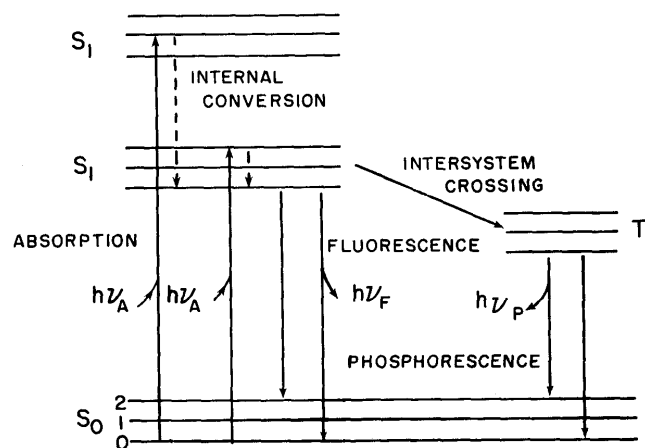


Figura 13. Vies diferents de relaxació d'una molècula excitada electrònicament per l'absorció de radiació electromagnètica. Les fletxes en forma d'ona representen processos en els quals l'energia es perd sense l'emissió de fotons; les fletxes rectes representen tant l'absorció com l'emissió de fotons.

·Fluoròfors intrínsecs o naturals

Les molècules que, per les seves característiques químiques estructurals emeten fluorescència quan es desexciten, reben el nom de fluoròfors; generalment són compostos que tenen electrons deslocalitzats presents en dobles enllaços conjugats. En les proteïnes el triptòfan es l'aminoàcid que presenta una fluorescència més elevada. En general, els residus de triptòfan en les proteïnes representen aproximadament el 90% de la fluorescència total de les proteïnes. Aquest fluoròfor natural és molt sensible a la polaritat del seu entorn. Normalment, es poden observar corriments espectrals com a resultat de diversos fenòmens, com és la unió de lligands, associació proteïna-proteïna i desnaturalització entre d'altres. A més, el màxim d'emissió de les proteïnes reflecteix l'exposició promig dels seus residus triptòfan a la fase aquosa. Les proteïnes absorbeixen la llum a prop dels 280 nm, i el màxim d'emissió de fluorescència oscil·la entre 320 fins a 350 nm.

La tirosina també és un aminoàcid altament fluorescent en solució, però en les proteïnes presenta una emissió feble. La desnaturalització proteica resulta en general en una potenciació de l'emissió de la tirosina.

III.7.2. Característiques i condicions de l'assaig

S'ha utilitzat la fluorescència intrínseca dels triptòfans de la proteïna G_t (transducina), per monitoritzar la conversió de la seva subunitat α de l'estat inactiu (associada a GDP) a l'estat activat (associada a GTP).

El rendiment quàntic per la fluorescència intrínseca del complex α_t ·GTP és aproximadament 2.3 cops més elevat que el del complex α_t ·GDP (Phillips i Cerione, 1988). D'aquesta manera es pot realitzar el seguiment de l'activació de la proteïna G_t per part de la rodopsina fotoactivada per l'increment d'aquesta fluorescència, en un medi on estan presents la rodopsina, la proteïna G_t i GTP exogen. Donada l'activitat GTPasa de la proteïna G_t, s'utilitza un anàleg del GTP no hidrolitzable, el GTP γ S.

L'emissió de fluorescència s'ha monitoritzat a intervals d'1 segon, utilitzant un espectrofluorímetre SLM 8000 Aminco. Les esletxes escollides per obtenir els espectres han estat 2,2 per al canal d'excitació i 16,16 per al canal d'emissió.

La longitud d'ona d'excitació ha estat ajustada a 295 nm, en el límit inferior del rang d'absorció dels triptòfans, i la longitud d'ona seleccionada per a la lectura de l'emissió ha estat de 340 nm.

III.7.3. Assaig d' interacció rodopsina-transducina per espectroscòpia de fluorescència

L'assaig s'ha realitzat a temperatura constant de 20°C , mantenint les mostres en agitació contínua, en un volum final de 1,4 ml. L'emissió de fluorescència s'enregistra durant un temps de 3000 segons:

- Afegiu a la cubeta, que conté el tampó d'activació , la quantitat necessària de proteïna G_t per obtenir una concentració final de 250nM.

- Barrejeu bé i col·loqueu la cubeta en el fluorímetre per enregistrar l'emissió. Deixeu que el senyal s'estabilitzi. A partir d'aquest punt cal treballar a les fosques (sota llum vermella).
- Afegiu la mostra de rodopsina solubilitzada en DM 0.05% per obtenir una concentració final de 40nM. Deixeu que el senyal s'estabilitzi.
- Afegiu el GTP γ S del stock 500 μ M per obtenir una concentració final de 5 μ M. Espereu que el senyal s'estabilitzi.
- Per monitoritzar l'activació de la proteïna Gt per part de l'intermediari actiu (Meta II), il·lumineu la barreja amb la fibra òptica (150 W) durant 20 segons a través de filtre que no deixa passar llum per sota de 495 nm. Deixeu enregistrar l'emissió fins al final del temps de l'experiment.

Els valors obtinguts corresponen a l'emissió fluorescent de la mostra corregida, dividint la fluorescència original pels valors d'emissió de la cubeta de referència (aigua).

El grau d'activació de cada proteïna mutant, s'obté del càlcul del pendent de la recta de regressió que formen el primers 60 punts deguts a l'increment inicial de fluorescència de la mostra. Els valors obtinguts pels mutants són normalitzats respecte als del WT al qual s'assigna el valor d'activació d'1.00.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES NATIVES

IV.1.1. Obtenció de rodopsina a partir de retines bovines

La rodopsina bovina serveix com un excel·lent model d'estudi de GPCR, ja que es pot obtenir en grans quantitats i es pot preparar fàcilment de forma pura. La rodopsina representa més del 95% de proteïna intrínseca dels discs del segment extern de les cèl·lules bastó (ROS) (Krebs i Kühn, 1977). Els segments de membranes de ROS es preparen segons la tècnica de Papermaster i Dreyer, basada en els gradients de densitat discontinus de sacarosa, gràcies a que presenten una densitat inferior a la d'altres cèl·lules de la retina i orgànuls cel·lulars.

En el procés d'extracció de rodopsina s'arriba a recuperar a l'entorn del 40% de rodopsina del total present a la retina (Hargrave i McDowell, 1992). Les pèrdues de material es donen especialment durant els rentats en tampó de baixa força iònica, efectuats per eliminar les proteïnes perifèriques de la membrana (apartat III.3.1, **Materials i mètodes**), ja que els sediments de centrifugació a baixa força iònica són poc compactes.

L'extracció de rodopsina nativa es realitza a partir de 100 retines bovines adaptades a la foscor seguint el procediment descrit a l'apartat III.3.1. de Materials i mètodes. A la Figura 14 es mostra l'espectre UV-Vis del material final obtingut d'una extracció típica a partir dels discs dels segments externs de les cèl·lules bastó, solubilitzat en DM al 1% (apartat III.3.2 de Materials i mètodes). Tenint en compte que $\epsilon_{500}=40600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ i el pes molecular és de 40.000 Da, a partir de 100 retines bovines s'obtenen entre 25-35 mg de proteïna amb una relació $A_{280}/A_{500}= 2.0-2.3$. Aquesta relació és indicativa del grau de puresa de la mostra. La proteïna purificada utilitzant l'anticòs Rho1D4 presenta una relació de 1.6-1.8.

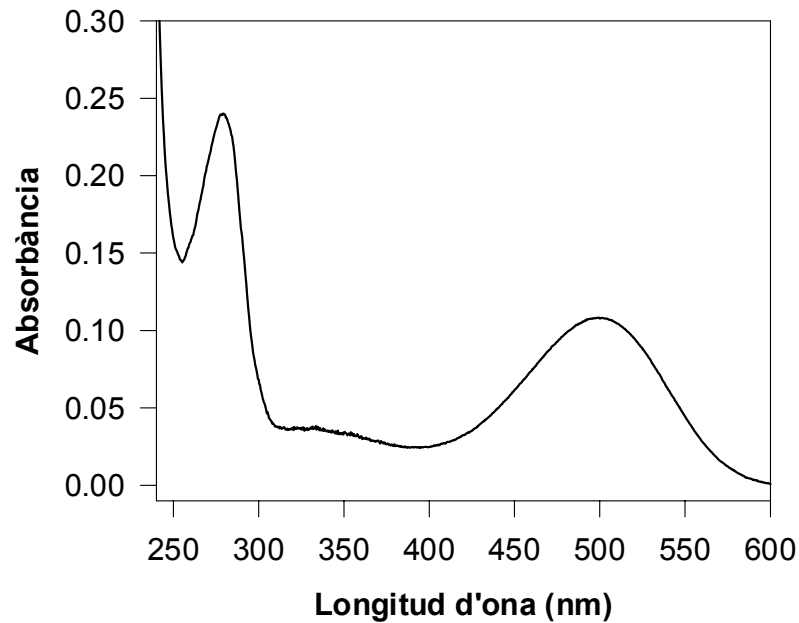


Figura 14. Espectre UV-Vis corresponent a les membranes dels discs de segments externs de bastons que contenen la rodopsina, solubilitzades en DM a l'1%. L'espectre s'ha realitzat a partir del material corresponent al carril B de l'electroforesi (Figura 15).

La Figura 15 mostra l'electroforesi SDS-PAGE de les membranes purificades per gradients de sacarosa, abans i després dels rentats per eliminar les proteïnes perifèriques. Es pot comprovar com les bandes corresponents a aquestes proteïnes desapareixen després dels rentats amb tampó hipotònic i finalment queda una única banda corresponent a la rodopsina.

IV.1.2. Obtenció de proteïna G: Transducina

A partir del mètode d'obtenció de la Gt descrit a l'apartat III.3.5 de **Materials i mètodes** s'obtenen aproximadament 300 ml de sobrenedants que contenen totes les proteïnes solubles. Aquest sobrenedant s'aplica a una columna de Biogel A Sefarosa. La Figura 16 mostra el perfil d'elució de la proteïna Gt.

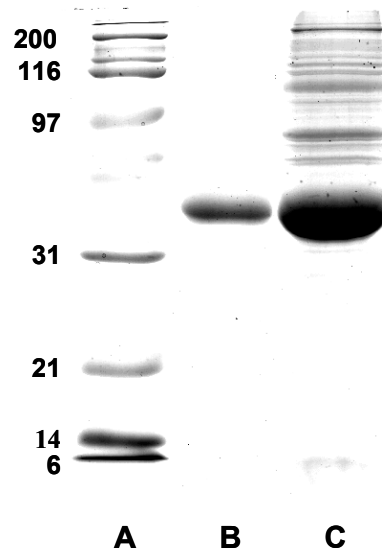


Figura 15. Electroforesi en SDS-poliacrilamida 12% de les mostres obtingudes en una extracció de rodopsina. (A) Marcador de pesos moleculars. (B) Mostra de rodopsina en membranes purificades en gradient de sacarosa després d'eliminar les proteïnes perifèriques. (C) Membranes purificades per gradient de sacarosa abans dels rentats per eliminar les proteïnes perifèriques.

A una concentració 100 mM de NaCl s'elueix un primer pic corresponent al GTP. A concentració 500 mM de NaCl s'elueix la proteïna Gt en fraccions de 1 ml. El volum total de l'elució és aproximadament de 24 ml. Un cop dialitzada la mostra, el volum final de proteïna Gt obtinguda és de 6 ml. A partir de 200 retines bovines s'obtenen 4.8 mg de Gt en 6 ml de volum total, a una concentració final de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ determinada segons el mètode de Bradford.

El control de la puresa de l'extracció de proteïna Gt s'ha realitzat per electroforesi en gel d'acrilamida com es descriu en l'apartat III.7.1 de **Materials i mètodes**. Es pot comprovar que la proteïna ha estat purificada amb homogeneïtat degut a la presència de només tres bandes corresponents a les subunitats α , β i γ de la proteïna Gt (Figura 17).

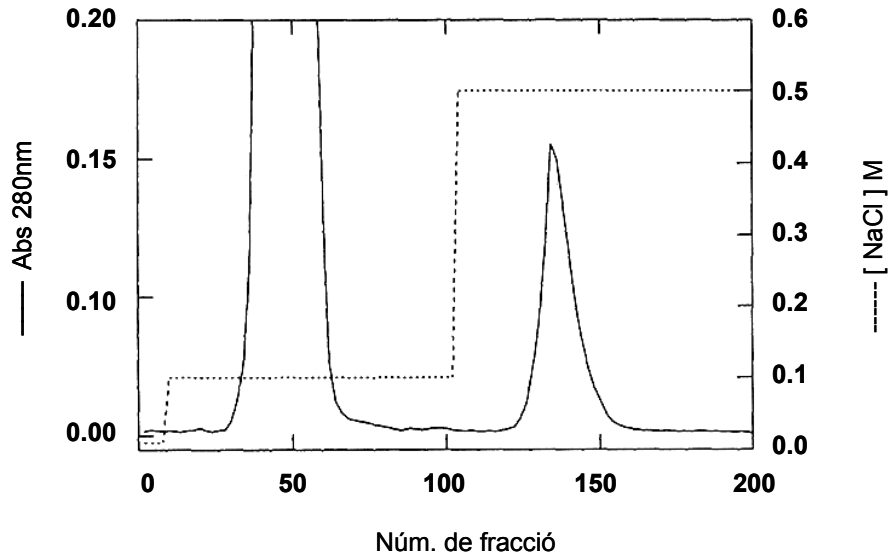


Figura 16. Perfil d'elució de la proteïna Gt en la columna cromatogràfica de DEAE BioGel-A. El pic d'elució de la transducina surt a una concentració de 0.5 M de NaCl.

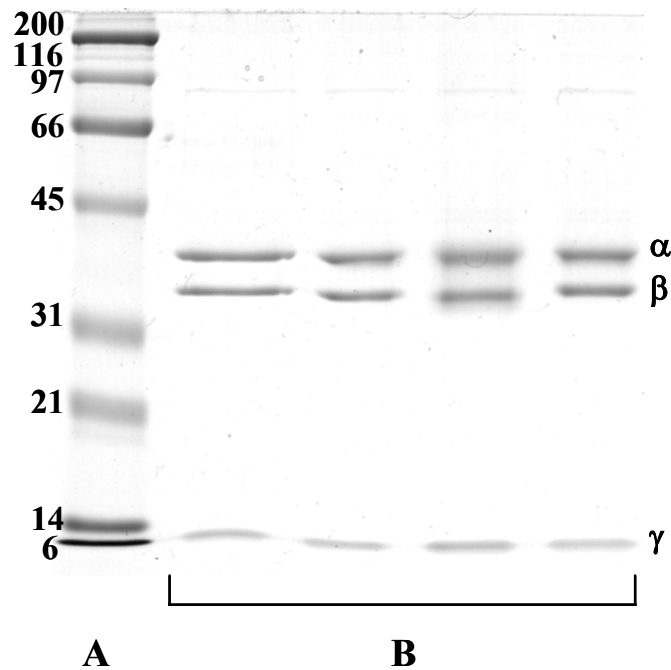


Figura 17. Electroforesi en SDS-poliacrilamida 12% de la proteïna Gt purificada. (A) Marcador de pesos moleculars. (B) Proteïna Gt purificada obtinguda en diferents extraccions; es poden apreciar les diferents subunitats que formen la proteïna: subunitat α (39 KDa), subunitat β (37 KDa) i subunitat γ (8.5 KDa).

IV.1.3. Obtenció de l'anticòs Rho-1D4

L'anticòs monoclonal Rho-1D4 ha estat purificat a partir de sobrenedants de cultius d'hibridomes obtinguts del *National Cell Culture Center* (USA), utilitzant una columna de proteïna A Sefarosa (Pharmacia) que reconeix la regió Fc de les immunoglobulines a través d'interaccions amb la cadena pesada i permet aïllar l'anticòs del medi de cultiu. En la figura 18 es mostra el perfil d'elució cromatogràfic obtingut, recollit en fraccions d' 1.5 ml.

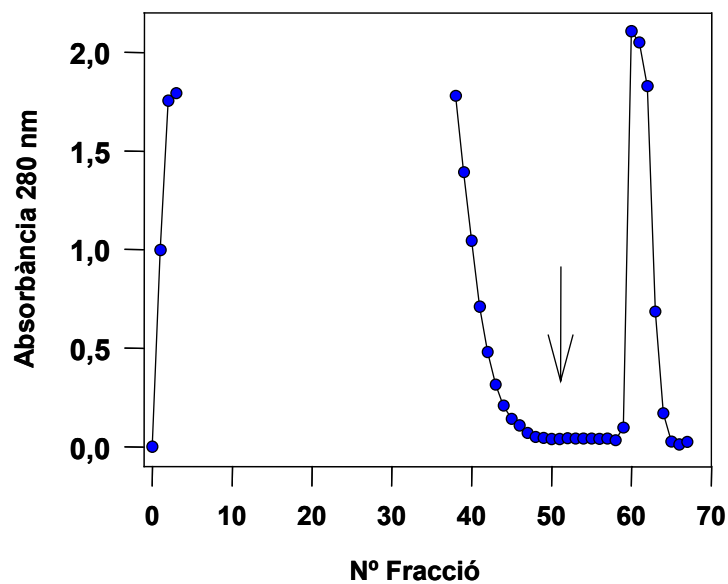


Figura 18. Perfil de l'elució del anticòs Rho-1D4 en la columna de cromatografia. La fletxa indica el punt d'addició del tampó d'elució. Totes les fraccions són de 1.5 ml.

A partir de 100 ml de sobrenedant d'hibridomes, diluïts a 200 ml amb tampó d'enllaçament, s'obtenen aproximadament 10 ml a una concentració d'1 mg/ml. Tots els pics d'anticòs purificat es van unir en un sol volum. Aquest volum es va concentrar i es

va sotmetre a diàlisi, abans d'unir-lo a la sefarosa utilitzada per a la purificació de rodopsina a partir de cèl·lules COS-1. En la Figura 19 es mostra l'espectre de l'anticòs Rho-1D4 després de la diàlisi.

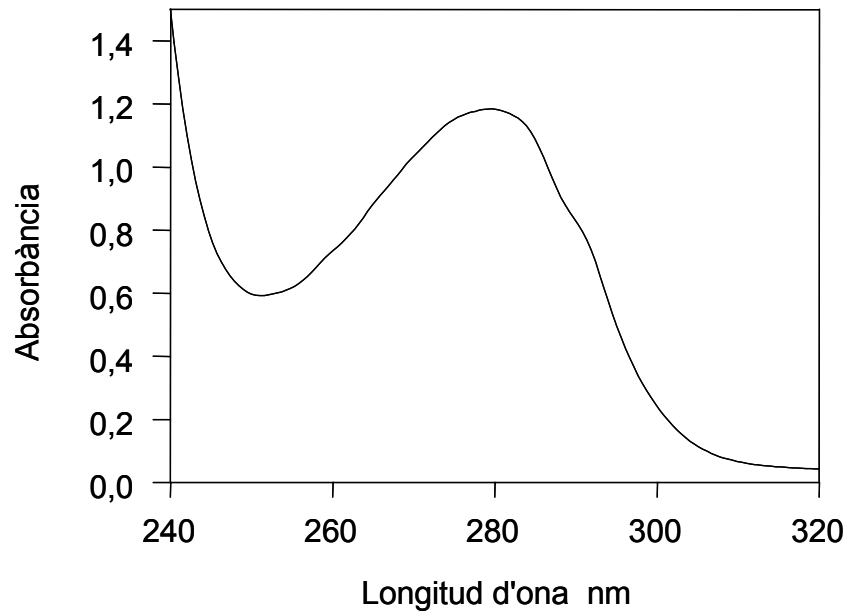


Figura 19. Espectre d' absorció UV-Vis de l'anticòs Rho-1D4 purificat després de la concentració i diàlisi. L'espectre presenta un màxim d'absorció a 280 nm i una petita espatlla corresponent a l'absorció dels residus de Tirosina i Triptòfan. L'absorció en la zona de 250-270 nm és deguda a residus de Fenilalanina.

IV.2. DISSENY I OBTENCIÓ DE RODOPSINES RECOMBINANTS

La possibilitat d'utilitzar mutants puntuals de rodopsina va representar en el seu moment un gran avenç per a l'obtenció d'informació estructural i funcional del receptor a partir de la substitució de residus claus en la proteïna. Paral·lelament, aquesta tècnica va permetre també estudiar mutacions puntuals al gen de la rodopsina en pacients afectats de RP, a partir de l'expressió i caracterització *in vitro* d'aquestes mutacions puntuals realitzades al gen de l'opsina bovina.

IV.2.1. Selecció de les mutacions

Es va dur a terme la construcció de dos grups de mutants:

- Grup 1: Mutacions puntuals en el gen de la rodopsina descrites en pacients amb adRP dominant per realitzar l'estudi i caracterització estructural i funcional de les proteïnes mutades corresponents, amb la finalitat de correlacionar els defectes *in vitro* amb el fenotip clínic.
- Grup 2: Mutacions puntuals en la posició 125 de l'hèlix III de la rodopsina (lloc de la mutació associada amb RP, L125R), per realitzar l'estudi de la implicació d'aquest residu en la configuració de la butxaca d'unió del retinal i el seu efecte sobre l'estructura i senyalització del receptor. És d'interès entendre l'orientació de les set hèlixs transmembrana i els requeriments per al correcte empaquetament en el domini transmembranal de la rodopsina. L'hèlix III juga un paper diferencial en la determinació de l'estructura i funcionalitat de la rodopsina per diferents motius: conté la Cys-110 involucrada en la formació del pont disulfur amb la Cys-187, el Glu-113 que serveix de contraió per la base de Schiff protonada, així com el parell de residus carregats Glu-134 i Arg-135 a prop de la part citoplasmàtica i altament conservats en tots els receptors acoblats a proteïna G. Per tots aquests motius i degut a que la posició 125 es troba associada a adRP, s'han escollit aquests mutants per tal d'elucidar quins són els requeriments per el correcte empaquetament del domini transmembrana de la rodopsina i com a conseqüència, la formació correcte de la butxaca d'unió del retinal. La tria d'aminoàcids es va realitzar en funció del tamany i càrrega de

la cadena lateral del residu, així ens poden donar informació sobre l'efecte que produeixen sobre el correcte empaquetament i la interacció amb l'11-*cis*-retinal.

Les mutacions realitzades es descriuen a la taula següent:

| Mutant | Localització | Domini |
|--|-------------------|----------------|
| Grup 1 | | |
| M44T | Hèlix I | Transmembranal |
| G106W | Loop E-I | Intradiscal |
| G114D | Hèlix III | Transmembranal |
| R135L | Hèlix III | Transmembranal |
| V137M | Hèlix III | Transmembranal |
| P171Q | Hèlix IV | Transmembranal |
| H211P | Hèlix V | Transmembranal |
| L328P | Extrem C-terminal | Citoplasmàtic |
| A346P | Extrem C-terminal | Citoplasmàtic |
| Grup 2 | | |
| L125G, L125T, L125Y, L125W, L125D, L125E, L125I, L125P, L125N, L125H | Hèlix III | Transmembranal |

Taula 6. Descripció de les mutacions introduïdes en la seqüència del gen de l'opsina bovina, localització i situació en la proteïna.

IV.2.2. Estratègies de construcció dels mutants en *E.Coli*

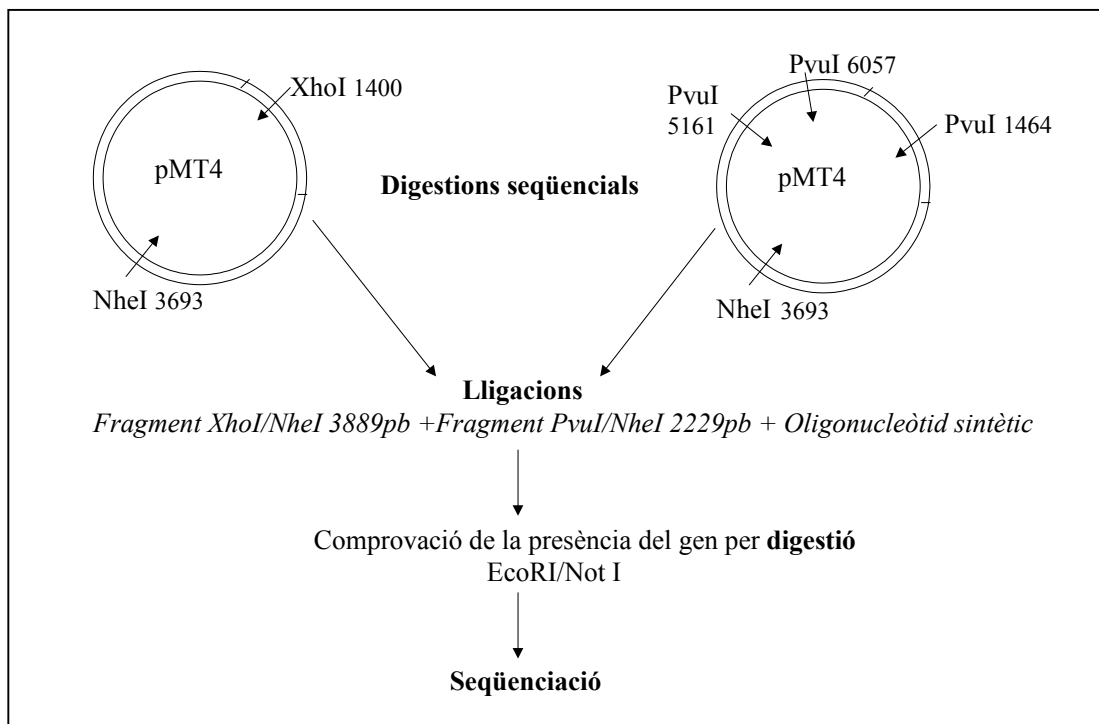
La metodologia general per a l'obtenció de les proteïnes recombinants a partir del gen sintètic de la opsina bovina es detalla a l'apartat III.4.1. de **Materials i mètodes**. La introducció de les mutacions puntuals en el gen de la opsina es va realitzar majoritàriament a partir de la tècnica de mutagènesi dirigida de tipus "cassette", però algunes no es van obtenir mitjançant aquesta tècnica i es van realitzar per PCR i digestió posterior del DNA parenteral amb DpnI tal i com es descriu en el protocol QuikChange de Stratagene.

Les condicions dels assaigs de mutagènesi dirigida així com els oligonucleòtids emprats en la construcció dels mutants es descriuen en l'apartat III.4.2.3 de **Materials i mètodes**.

A continuació es descriu l'estratègia seguida per a l'obtenció dels mutants puntuals explicant un exemple de la construcció d'un dels mutants segons cada tècnica de mutagènesi dirigida.

IV.2.2.1. Mutants realitzats per mutagènesi de tipus “cassette”

Aquest esquema resumeix el procés que es segueix per la realització de la mutagènesi dirigida per a l'obtenció dels mutants en la posició 125 de la rodopsina. El DNA plasmídic es digereix amb enzims de restricció que generen uns fragments de restricció que junt amb els oligonucleòtids sintètics que introdueixen el canvi de base/s es tornen a lligar obtenint el plàsmid intacte i amb la mutació puntual introduïda.



Per a la construcció dels mutants en la posició 125 de la rodopsina s'utilitzen els mateixos fragments de restricció que es lliguen amb un fragment d'origen sintètic que porta la mutació i que dóna lloc al canvi de residu en aquesta posició (es tracta d'oligonucleòtids sintètics diferents per cadascun dels mutants). Aquesta lligació es transforma en *E.coli* i es comprova l'existència del gen en les colònies que han donat positives per digestió EcoRI/NotI (Figura 20) Posteriorment es seqüencien alguns dels DNA's obtinguts d'aquestes colònies (Figura 21) i es realitza una preparació de DNA plasmídic a gran escala a partir de les colònies positives per a la transfecció en cèl·lules COS-1. A partir de 400 ml de medi LB líquid s'obtenen típicament entre 2-3.5 µg/µl de DNA.

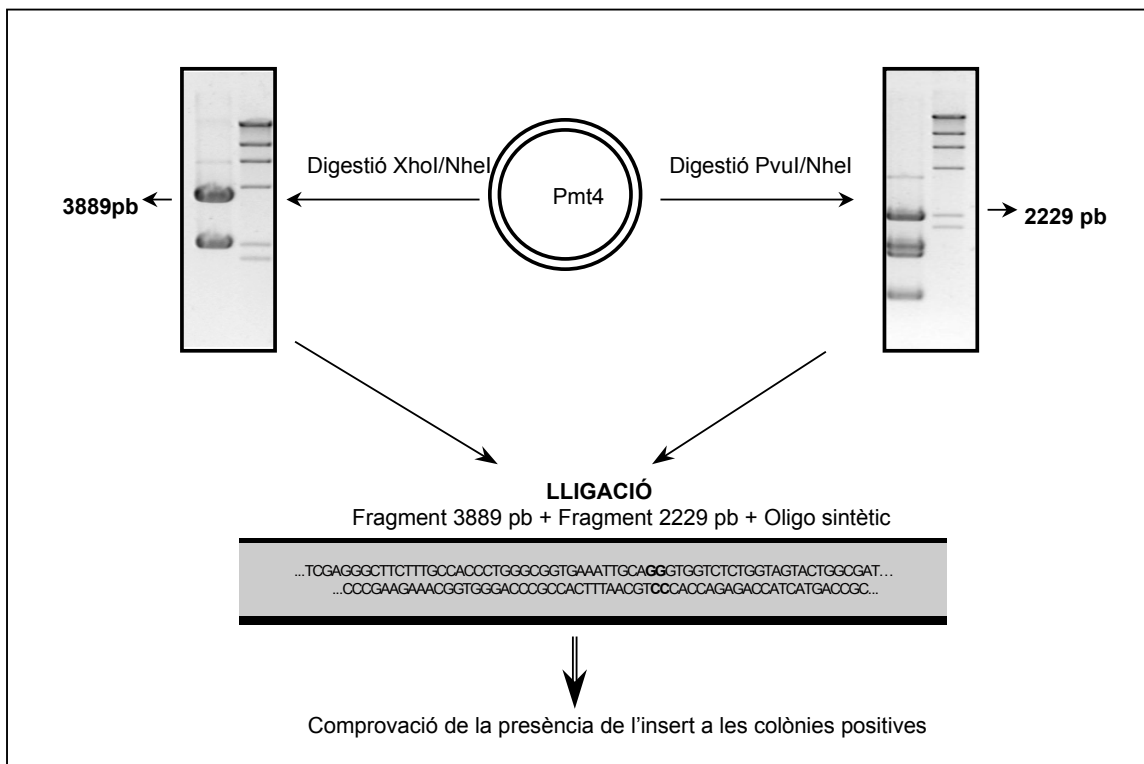


Figura 20. Esquema de l'obtenció dels fragments i la lligació per *cassette*-mutagènesi per a l'obtenció dels mutants en la posició 125 de l'hèlix III de la rodopsina.

Les gestions i lligacions realitzades per l'obtenció de la resta de mutants s'expliquen a l'apartat III.4.2.3.2. de **Materials i mètodes**.

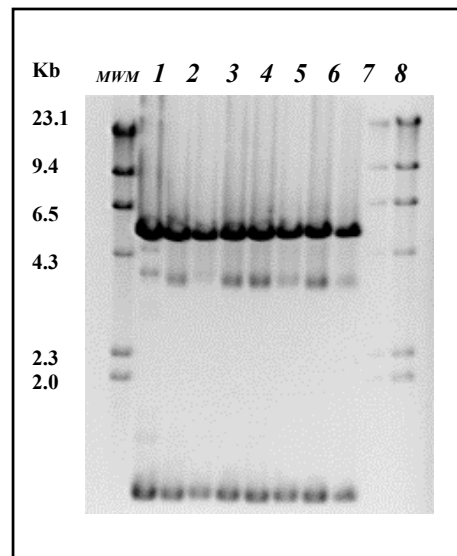


Figura 21. Comprovació de la presència de l'insert corresponent al gen de l'opsina (1.1 Kb) al plàsmid pMT4 obtingut de la miniprep, per digestió *EcoRI/NotI*. Algunes d'aquestes colònies positives es sotmeten a seqüenciació.

IV.2.2.2. Mutants realitzats per PCR

L'obtenció dels mutants puntuals en el gen de l'opsina per la tècnica de PCR s'ha realitzat seguint el mètode de mutagènesis que presenta el kit QuikChange de Stratagene. En el següent esquema general es presenten els passos a seguir per realitzar la mutagènesi dirigida, els oligonucleòtids emprats per la construcció dels mutants es presenten a la taula de l'apartat III.4.2.4.de **Materials i mètodes**.

Un cop el producte de PCR es transforma en *E.Coli*, es fa una miniprep de les colònies resultants i es comprova la presència del gen de l'opsina per digestió *EcoRI/NotI*. Les colònies positives es van enviar a seqüenciar per comprovar la presència de la mutació.

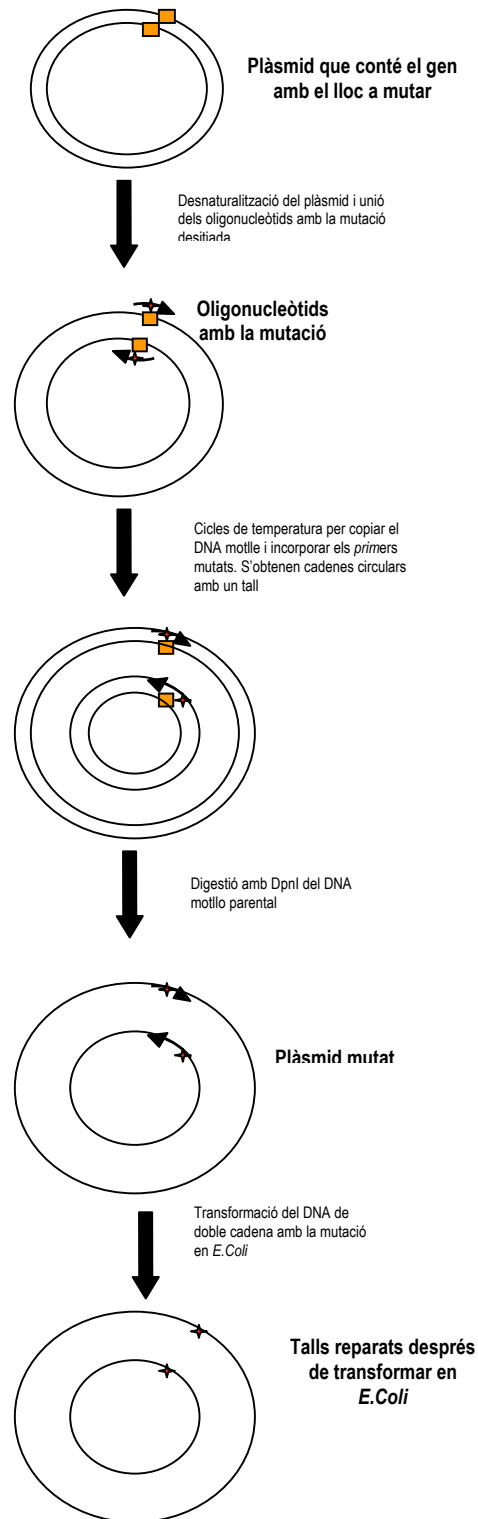


Figura 22. Esquema general de la tècnica de mutagènesi dirigida per PCR.

IV.2.3. Purificació de rodopsines recombinants en DM. Obtenció de rodopsina salvatge (WT) a partir de cèl·lules COS-1.

Es varen obtenir les proteïnes recombinants (salvatge i mutades) a partir de la transfecció del DNA plasmídic en cultius de cèl·lules de mamífer COS-1. Tot el procés de transfecció s'explica a l'apartat de III.4.3.1 de **Materials i mètodes**. Un cop han passat un màxim de 72 hores de la transfecció, les cèl·lules es recol·lecten i es purifica la proteïna tal i com es descriu a l'apartat III.4.3.2. de **Materials i mètodes**.

En concret, per a l'obtenció de la proteïna recombinant WT es varen utilitzar 5 plaques confluents de cèl·lules COS-1 amb aproximadament 12×10^6 cèl·lules per placa, que van ser transfectades amb 20 μg de DNA cadascuna. Al final de cada purificació s'obtenen entre 32-50 μg de proteïna WT recombinant. Típicament, en el cas de la proteïna WT, la relació A_{280}/A_{500} es troba entre 1.7-1.9.

L'espectre d'absorció d'aquesta proteïna té dos components: la banda d'absorbància a 500 nm corresponent al retinal unit covalentment a la proteïna (a través de l'enllaç per base de Schiff protonada), i una banda a 280 nm que correspon a l'absorció dels aminoàcids aromàtics de la proteïna. A partir de la banda a 500 nm es realitza el càlcul de la quantitat de rodopsina obtinguda i la relació entre A_{280}/A_{500} és indicativa de la qualitat de la proteïna purificada (regeneració amb retinal, grau de plegament, etc). El valor de la relació A_{280}/A_{500} obtingut en la purificació de la proteïna recombinant WT per immunocromatografia ha estat entre 1.6-1.8.

La Figura 23 mostra l'espectre UV-Vis de les tres elucions fetes de la proteïna WT en la purificació. Les característiques espectrals de les proteïnes recombinants obtingudes donen informació sobre el nivell d'expressió i plegament de la rodopsina WT i serviran per comparar amb el nivell d'expressió de les rodopsines mutades expressades en paral·lel.

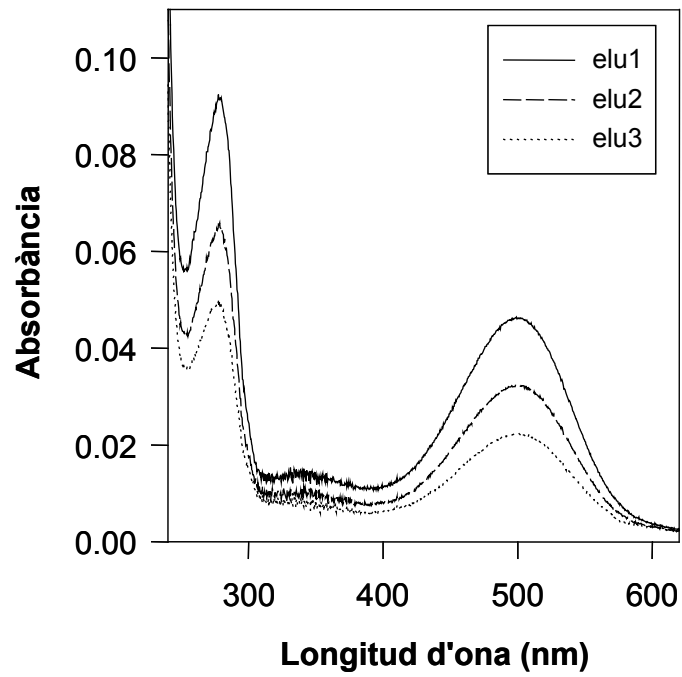


Figura 23. Elucions de la rodopsina WT expressada en cèl·lules COS-1 i purificada per cromatografia d'immunoafinitat .