

RODOPSINA I LA SUPERFAMÍLIA DE RECEPTORS DE 7 HÈLIXS TRANSMEMBRANA

Laia Font

Mireia Gimeno

Maria Larroy

Paola Paoletti

Laura Vicente

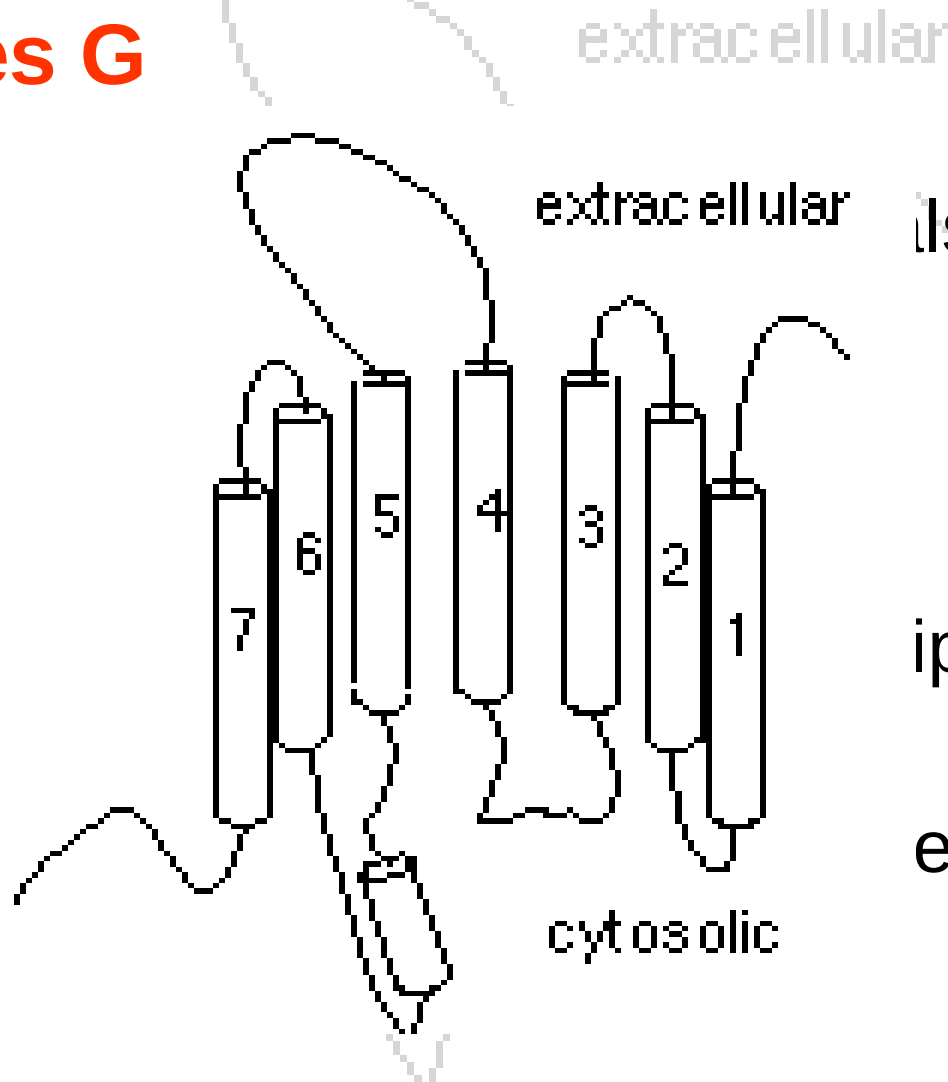


Per què les proteïnes
transmembrana són
difícils de cristal·litzar?

- Part hidrofílica i hidrofòbica a les diferents superfícies.
- Aquest fet les fa no solubles
- Podem utilitzar detergents per formar un complex proteïna-detergent amb la part hidrofòbica a l'interior.
- Molt poques s'han pogut cristal·litzar.

Importància dels receptors acoblats a proteïnes G

- Superfície de la membrana
- A l'exterior
- A l'interior
- Constitueix entre 4
- S'identifiquen a través



ils a través

ipeptídica

es que

Llocs d'unió dels lligands

- La majoria s'uneixen a les hèlixs, com per exemple el retinal de la rodopsina (forma una base de Schiff amb l'àtom de N de la Lys 296)
- La segona i tercera nansa citosòlica reconeixen les proteïnes G

Activació dels receptors i de les proteïnes G

- Creació de la senyal per unió a lligand o per fotó (rodopsina)
- Transducció de la senyal a través de la membrana
- Interacció amb la proteïna G
- Activació del mecanisme efector i variació dels nivells del 2n missatger.

Patrons comuns del receptors acoblats a proteïnes G

- Patró comú a les regions transmembrana de la família A (relacionada amb la rodopsina)

TM1: GXXN o GN

TM2: LXXDXXXXXXXXXXP o LXXDXXXXXXXXXXP

TM3: SXXLXXIXDR o SXXLXXI XXHR

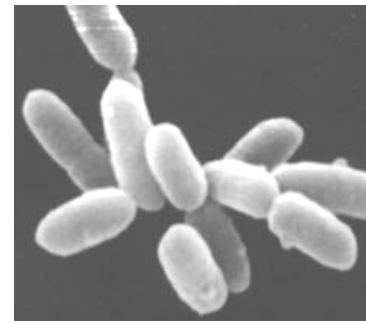
TM4: WXXXXXXXXXP o WXXXXXXXXXP

TM5: FXXPXXXXXXXXXY

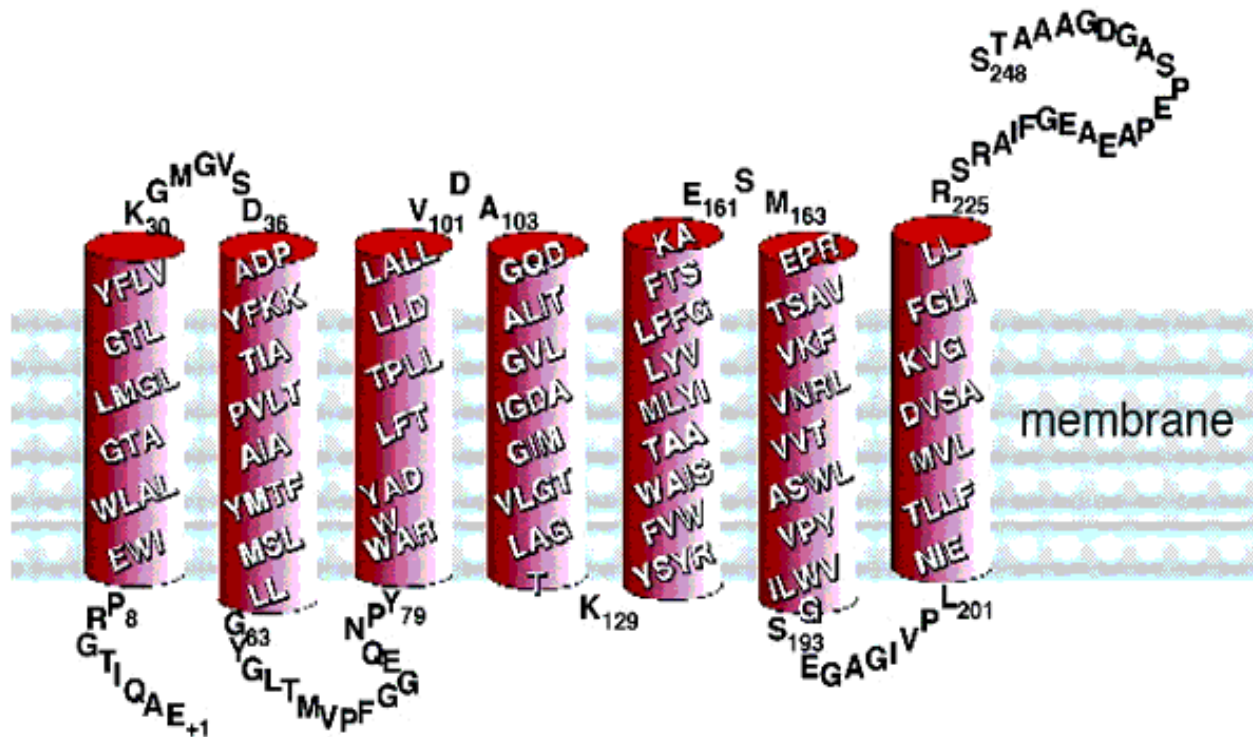
TM6: FXXCXXP

TM7: LXXXXXXXXDPXXY o LXXXXXXXXNPXXY

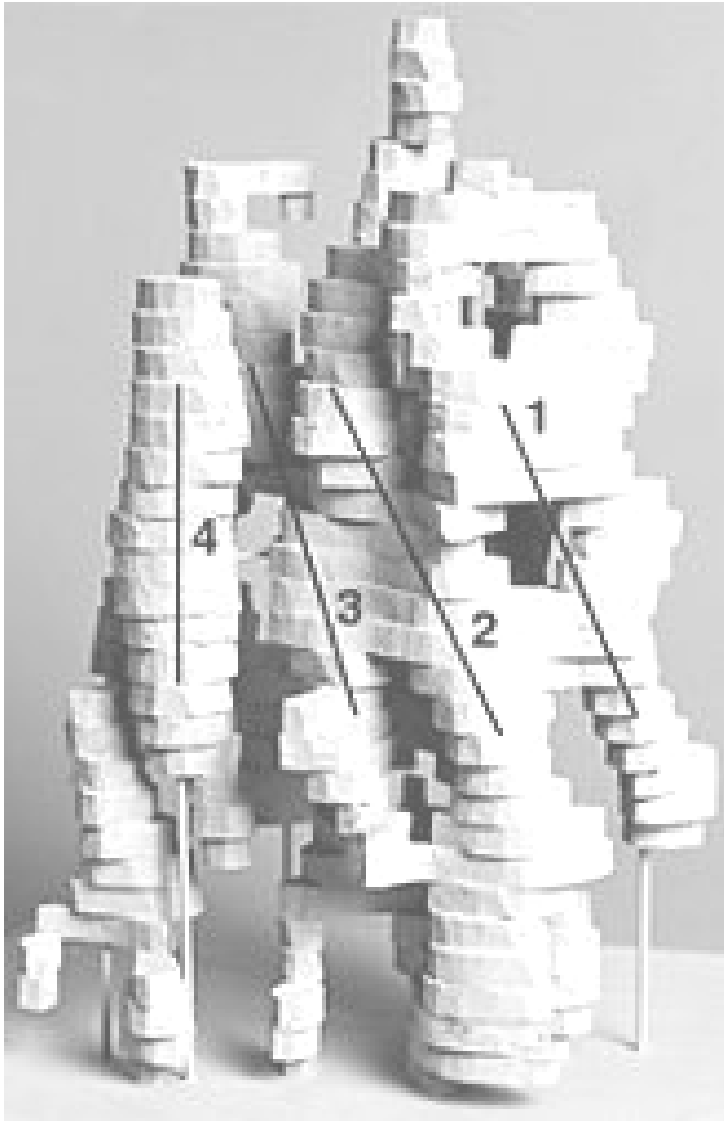
Bacteriorodopsina



- Proteïna fotosintètica d'**Halobacterium**.
- Converteix la llum (500-600nm) en un gradient protònic → Producció d'ATP
- Funció de bomba protònica depenent de la llum.



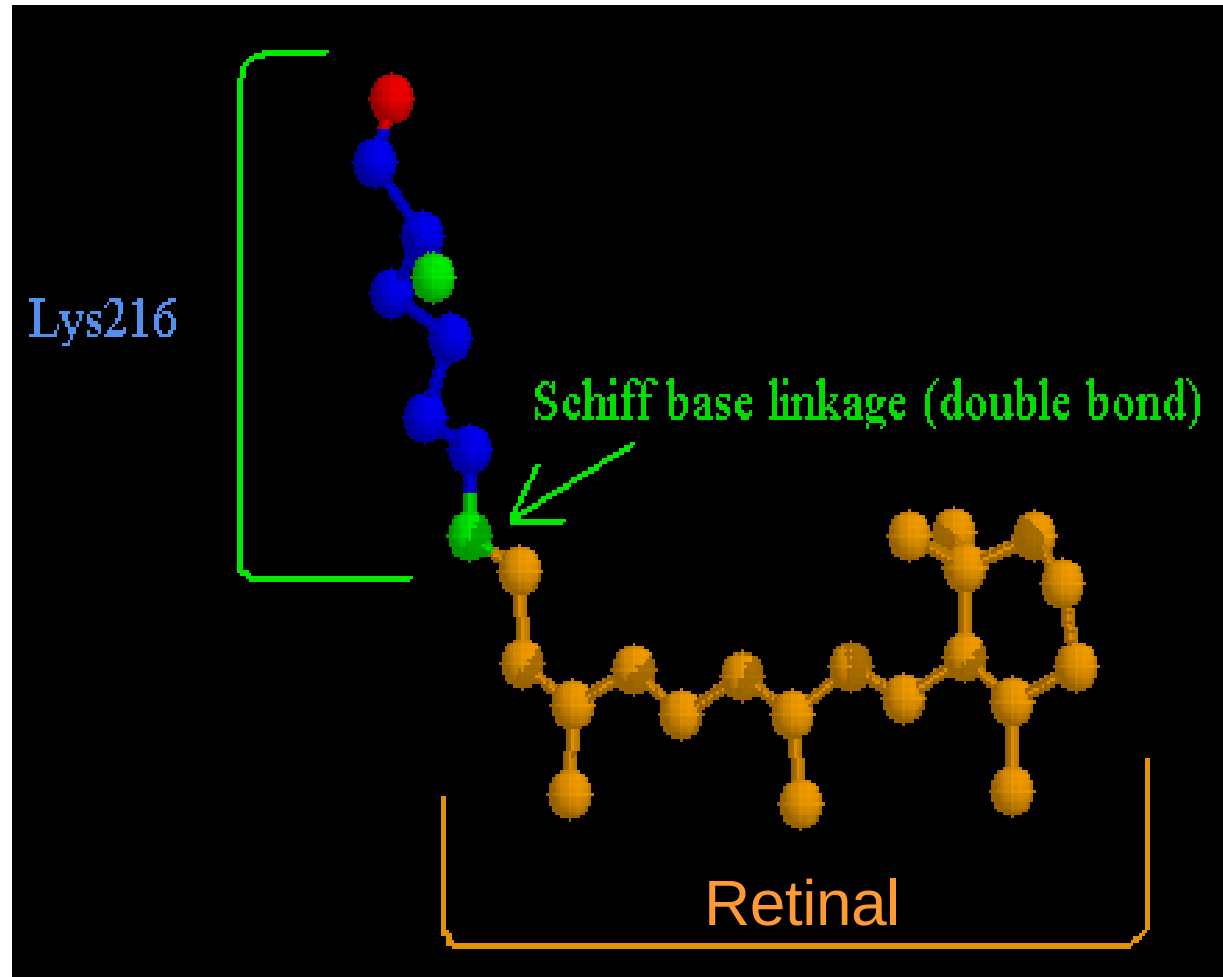
Estructura



- 7 hèlix transmembrana amb loops d'interconexió curts
- Mol.lècula de retinal unida a les hèlix de forma covalent, via una **Schiff Base**, a Lys-216

Schiff Base

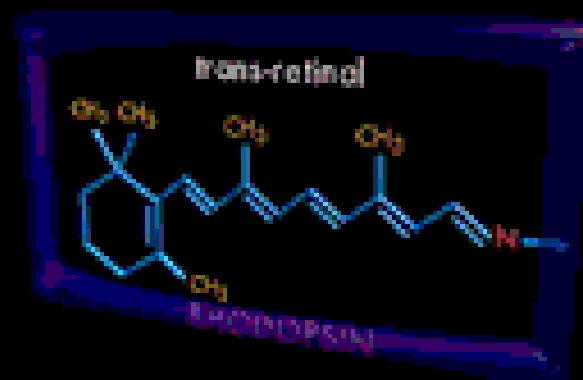
- Càrrega positiva situada al centre del canal entre Lys i el retinal.
- Juntament amb el retinal separen l'espai citoplasmàtic de l'extracel.lular

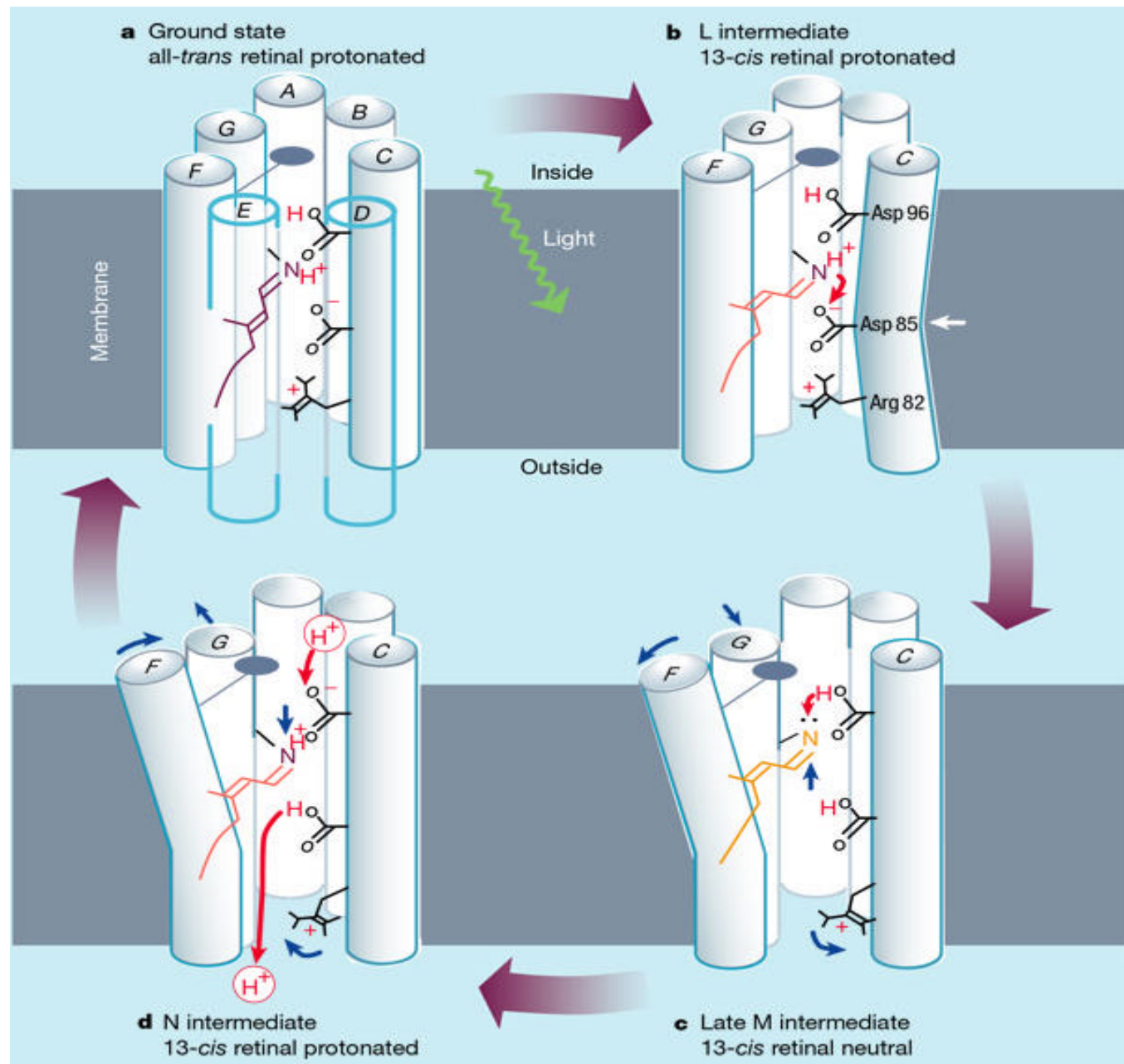


Quan arriba la llum...

Fotoisomerització

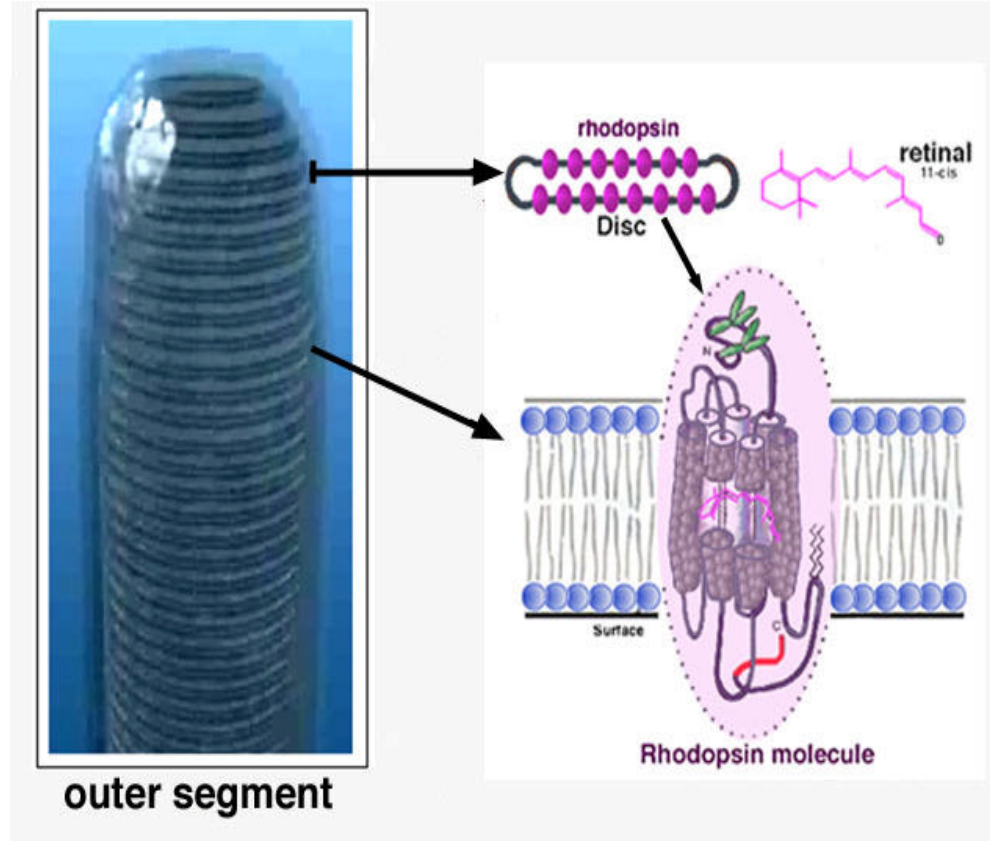
- Retinal passa de la forma trans→cis
- Conversió de la llum a energia química.





Rodopsina

- Proteïna transmembrana, pigment dels bastons
- Receptor de 7 hèlixs- α acoblat a proteïnes G.
- Consta de dues parts:
 - Protèica $\rightarrow$ **Opsina**
 - No protèica $\rightarrow$ 11-cis-**retinal** (derivat vit. A)



Opsina

- Polipèptid de 348 aa, distribuïda en 7 hèlixs en posició perpendicular.
- Part carboxiterminal al citosol, mentres que l'amino es troba interdiscal.

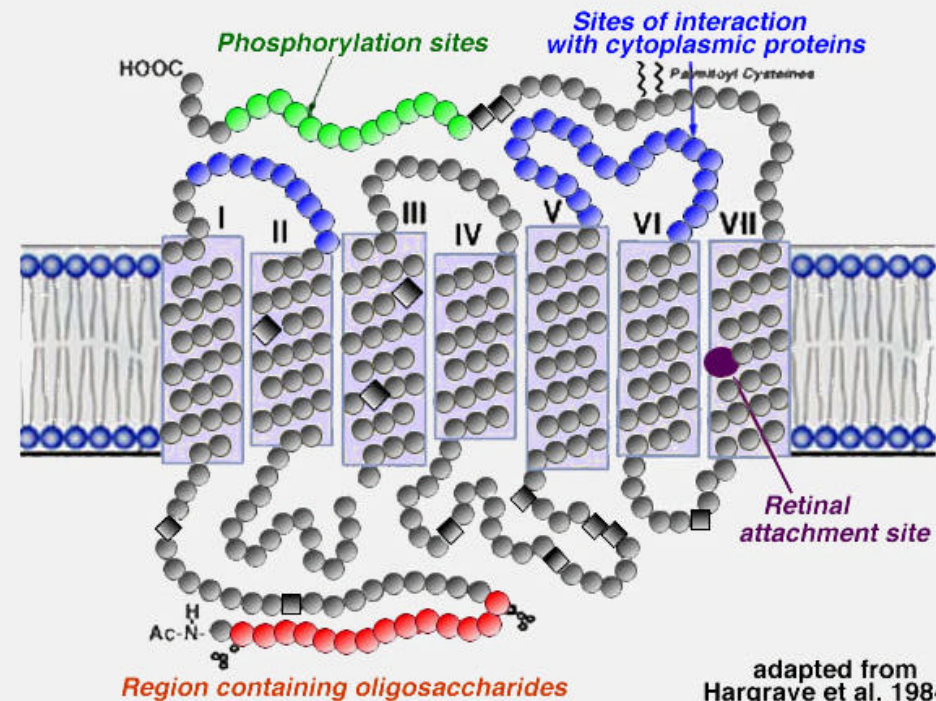
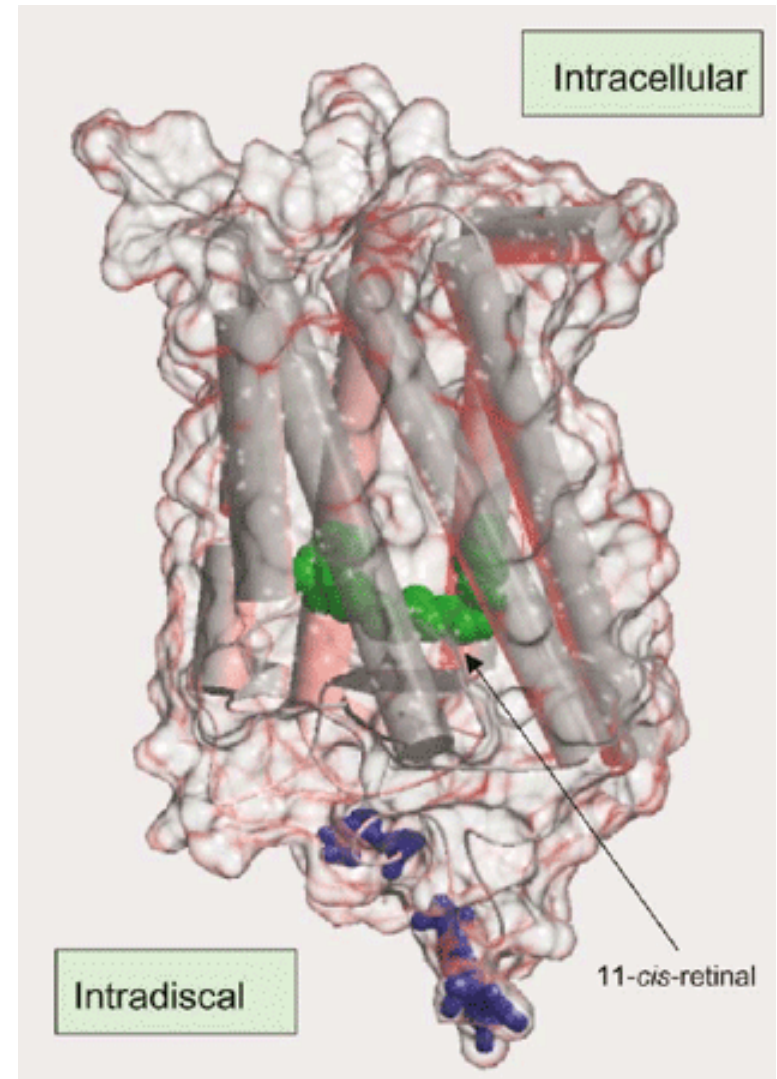


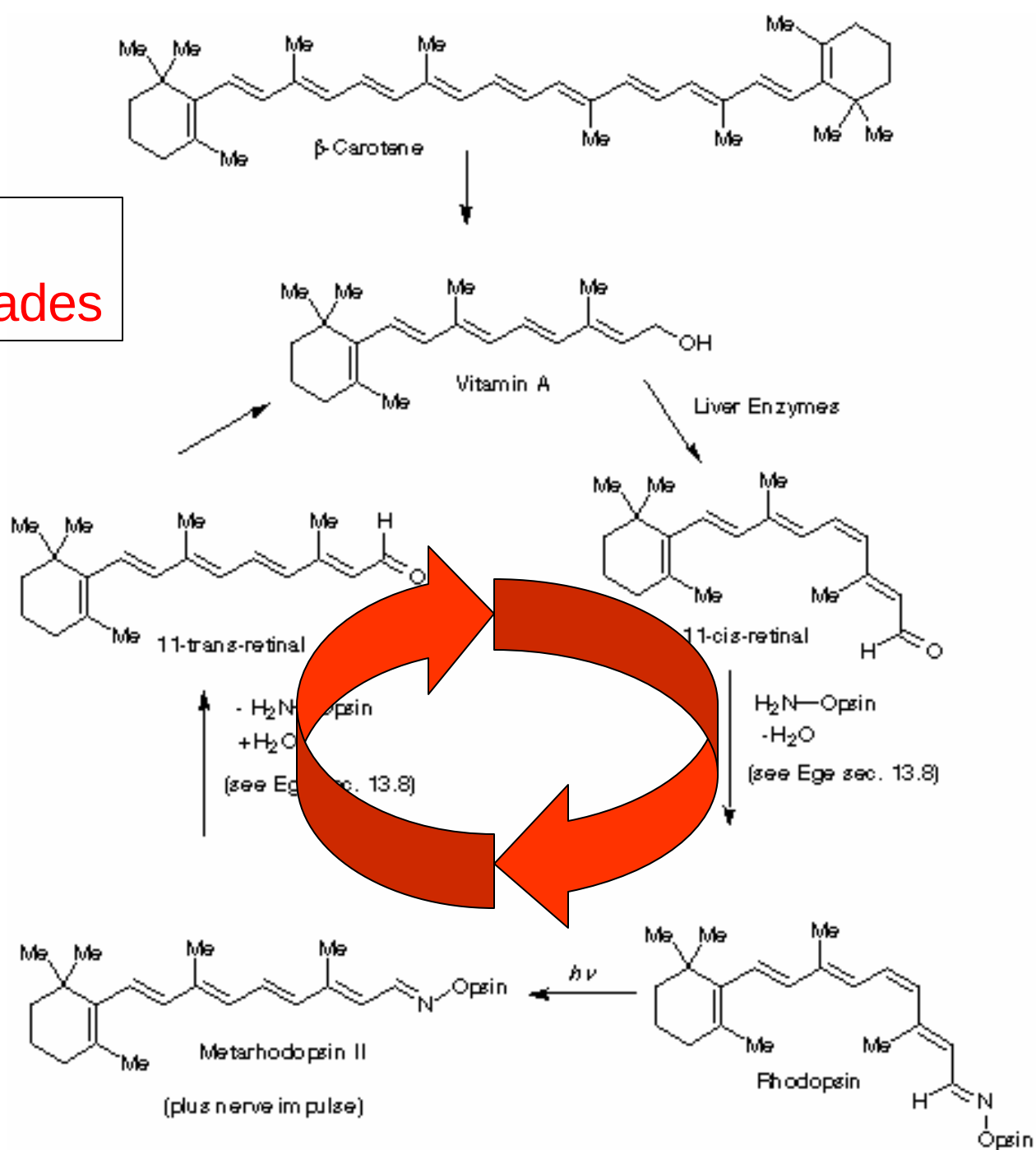
Fig. 9. Structural model of rhodopsin showing seven transmembrane components and the attachment site for retinal.

Retinal

- Aldehid de la vitamina A
- Formació a partir del retinol
- Unida a les hèlixs a la part central
- Posada perpendicularment

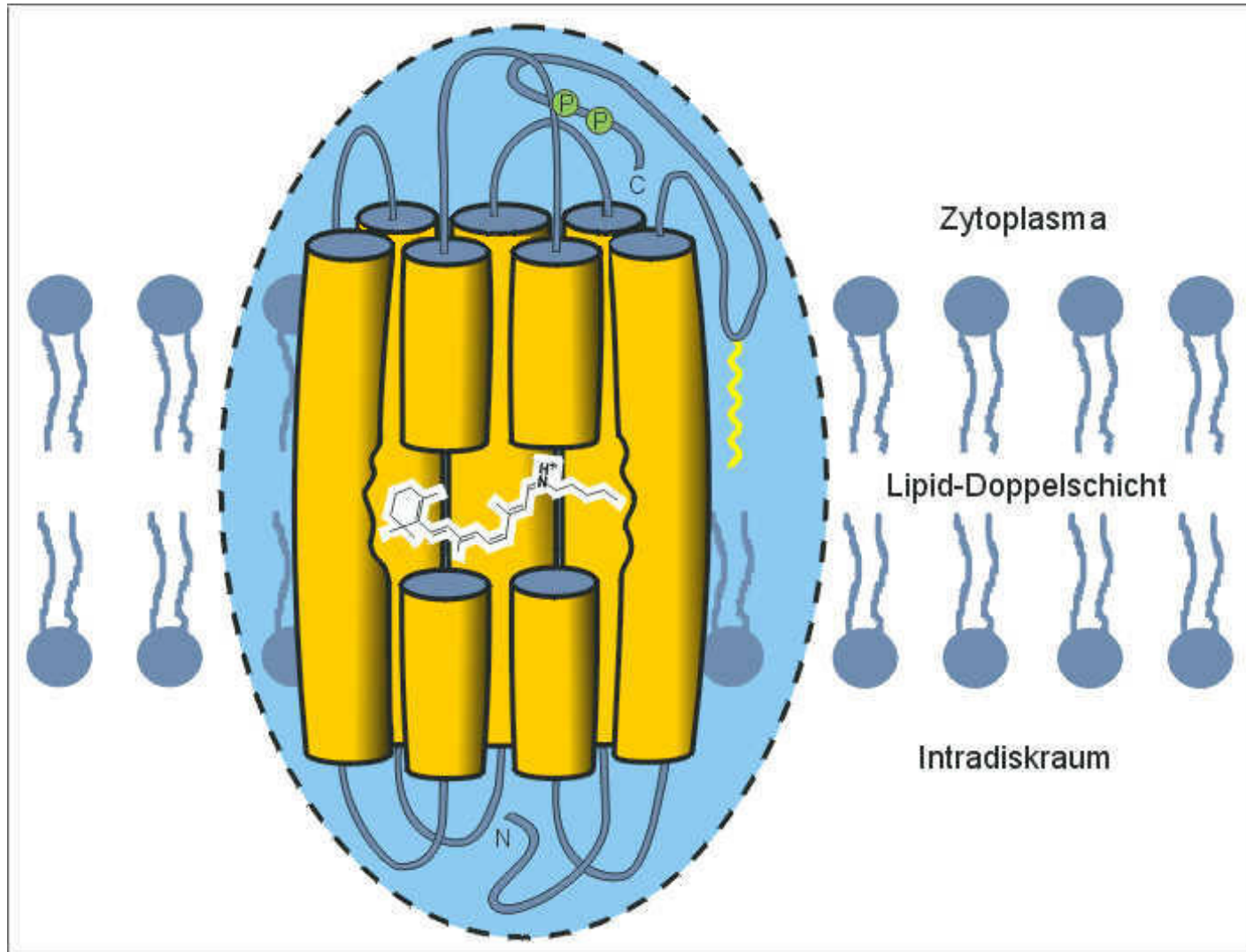


Síntesi del retinal i estructures derivades



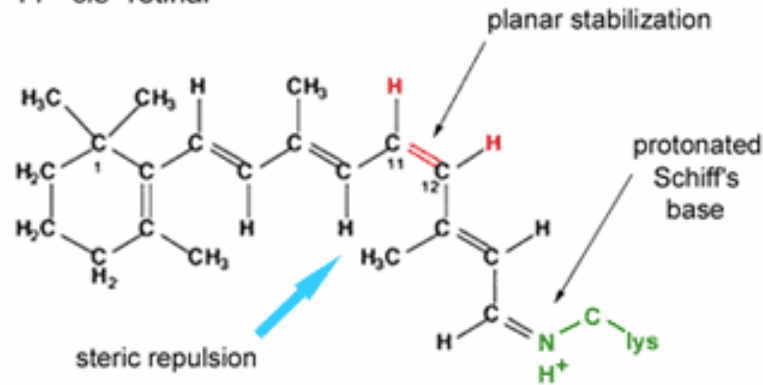
Procés cíclic

Rodopsina: Opsina i retinal juntes

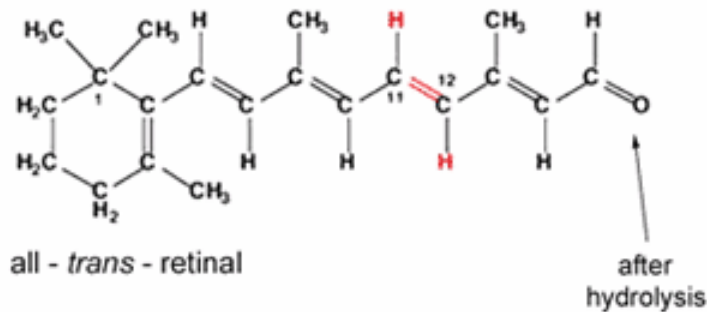


Quan arriben els fotons
de la llum...

11 - *cis* -retinal



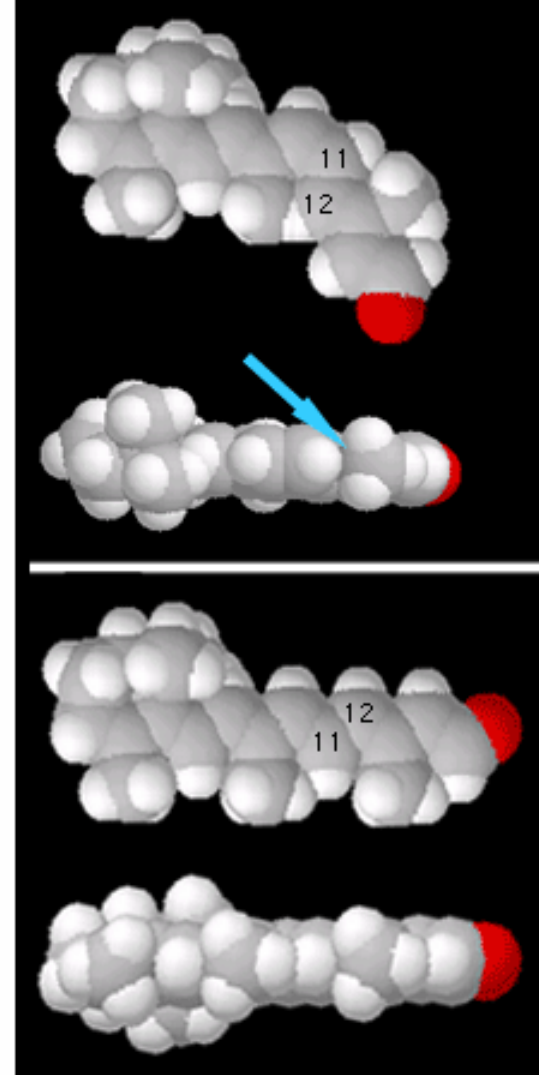
photon



all - *trans* - retinal

Canvi
conformacional
de *cis* → *trans*

La forma *trans* no encaixa tant bé en la opsina, i per tant serà molt susceptible de tornar a ser metabolitzada i regenerada



Es genera un impuls nerviós



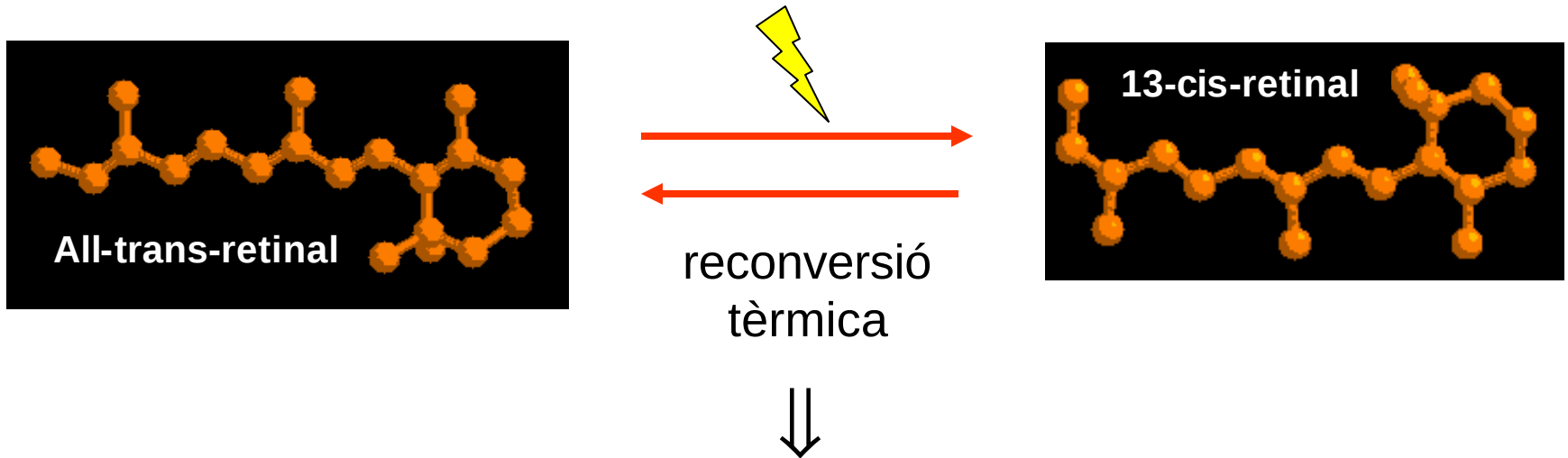
BACTERIORODOPSINA I RODOPSINA



BACTERIORODOPSINA (BR)

- *Halobacterium halobium* (arquees halofíliques)
- Proteïna integral de membrana (BOMBA DE PROTONS)

- Fotocicle:



- H^+ d'intracel·lular a extracel·lular $\rightarrow$ Gradient electroquímic
- Síntesi d'ATP (ATP sintetasa) i transport d'ions i aa

Determinació de l'estructura

- Reconstrucció 3D (7 Å) mitjançant microscopia electrònica de cristalls 2D
- Microscopia crio-electrònica de cristalls 2D (3 Å)
- Difracció raigs X de cristalls 3D (1,9 Å ; 1.55 Å)
 - Informació d'estadis intermediaris mitjançant anàlisi a temperatures criogèniques (pulsos lasers)
- Mètodes d'espectroscopia:
 - mesures òptiques en el rang del UV-visible
 - FTIR (Fourier Transform InfraRed)
 - espectroscopia Raman de ressonància
 - NMR
 - ESR (Electron Spin Resonance)

Classificació SCOP

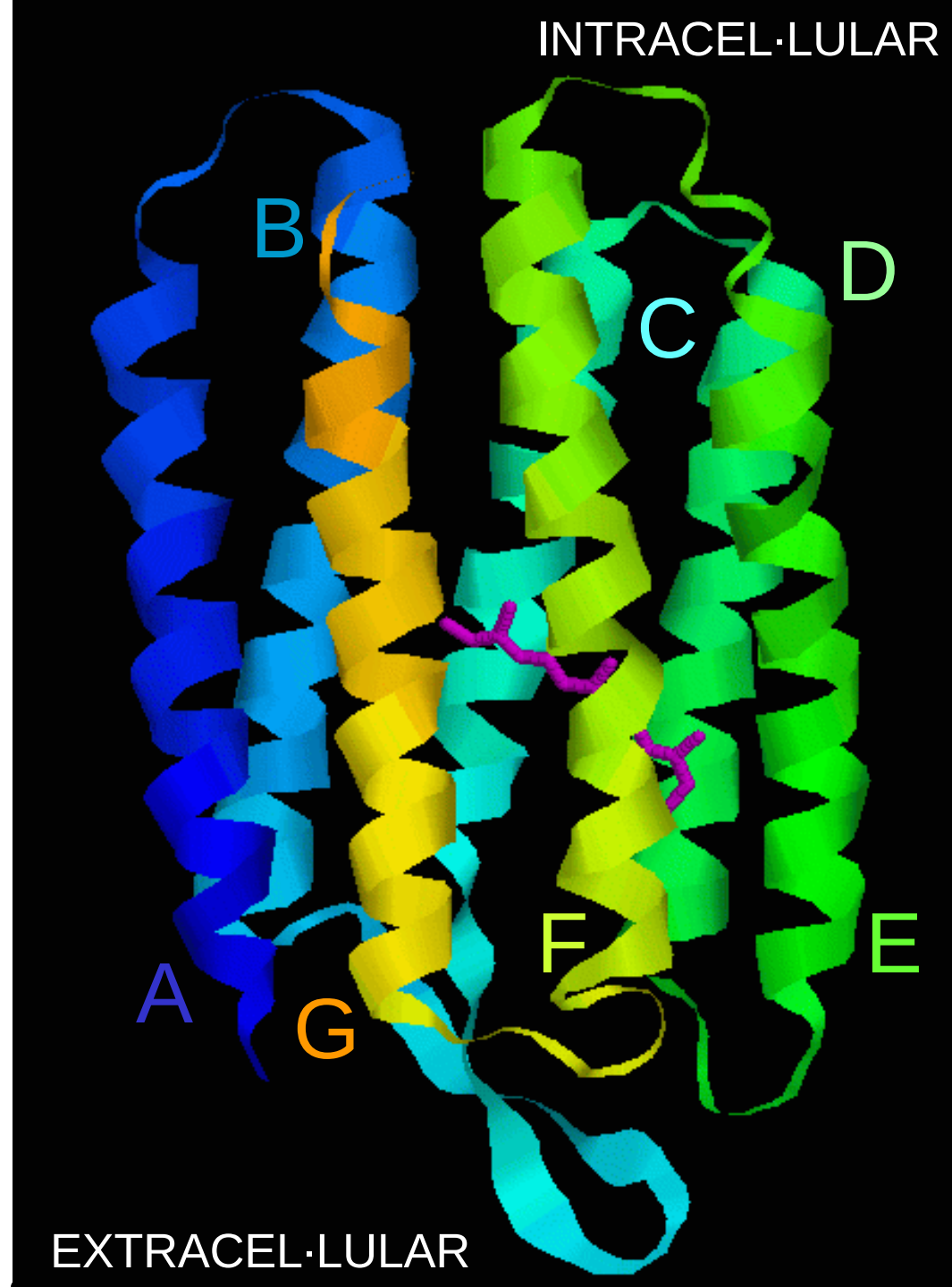
- Plegament: receptors acoblats a proteïnes G classe A
- Superfamília: receptors acoblats a proteïnes G classe A
- Família: bacteriorhodopsin-like

Entrada Protein Data Bank

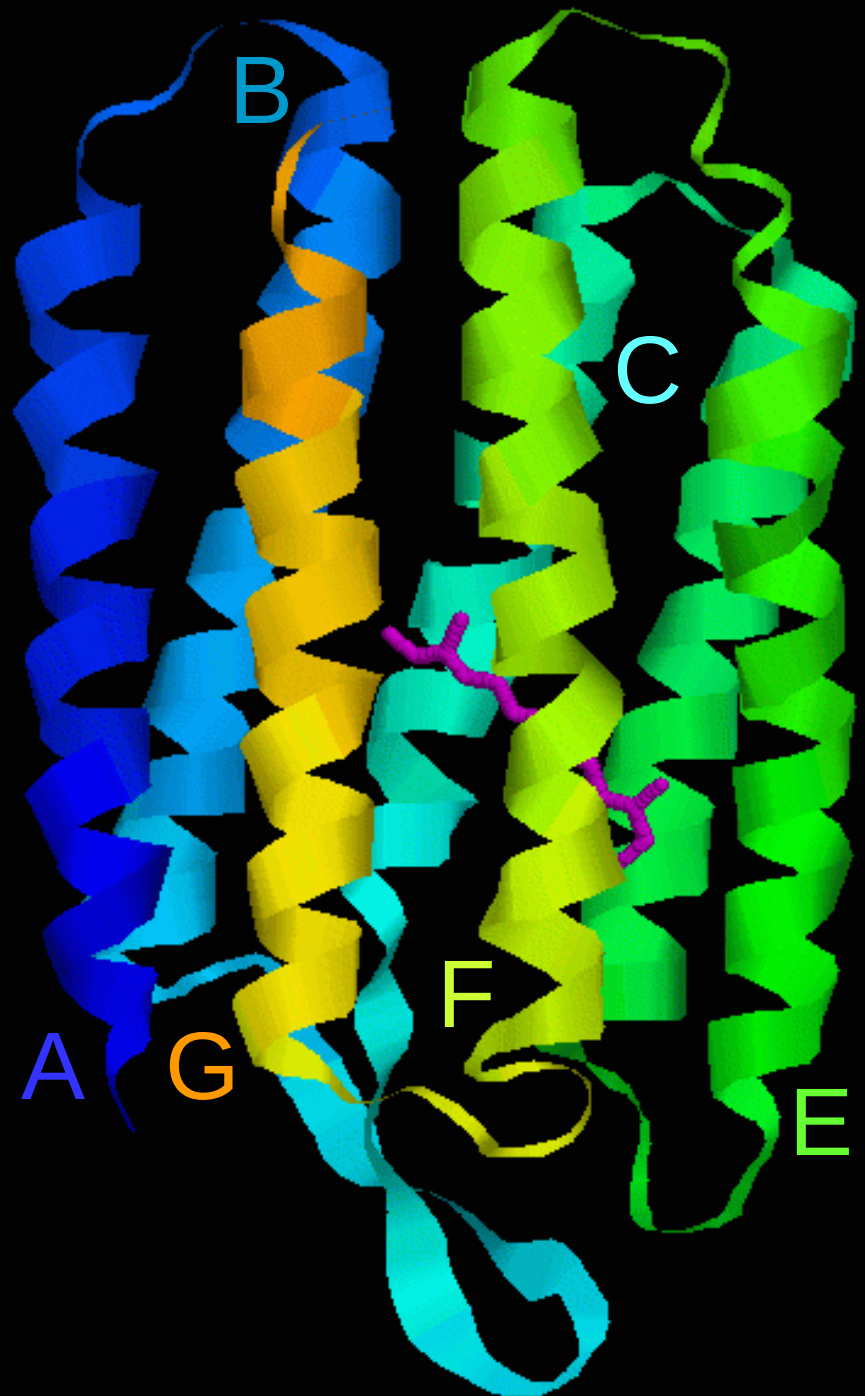
- 1bm1

Estructura

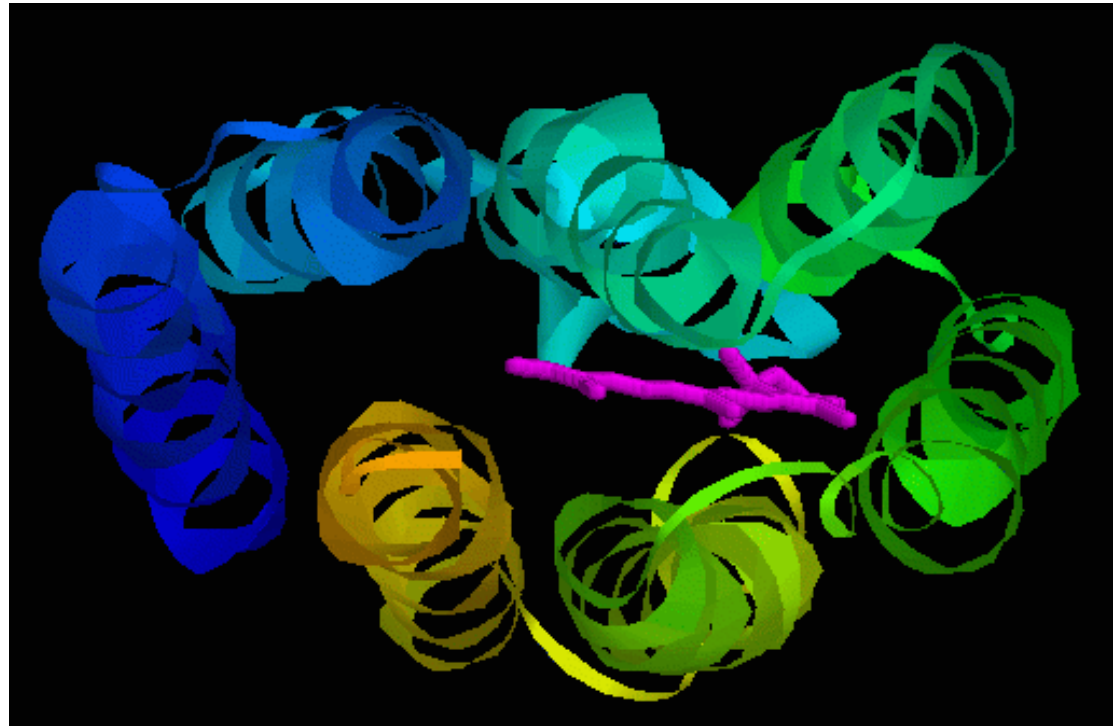
- 248 aa
- 7 hèlix transmembrana
- Retinal (cromòfor)
- N-terminal extracel·lular
- C-terminal intracel·lular
- Segments extramembr. no functionals



- Hèlix E, F i G perpendiculars al pla de la membrana
- Hèlix A, B, C i D atravessen membrana amb angle d'inclinació (20°)
- 7 hèlix defineixen una cavitat
- Cavitat:
 - Retinal + cadenes laterals dels aa
 - Pas del H^+



- Hèlix E, F i G perpendiculars al pla de la membrana
- Hèlix A, B, C i D atravessen membrana amb angle d'inclinació (20°)
- 7 hèlix defineixen una cavitat
- Cavitat:
 - Retinal + cadenes laterals dels aa
 - Pas del H^+



Retinal

- Interacció amb
càrregues veïnes:

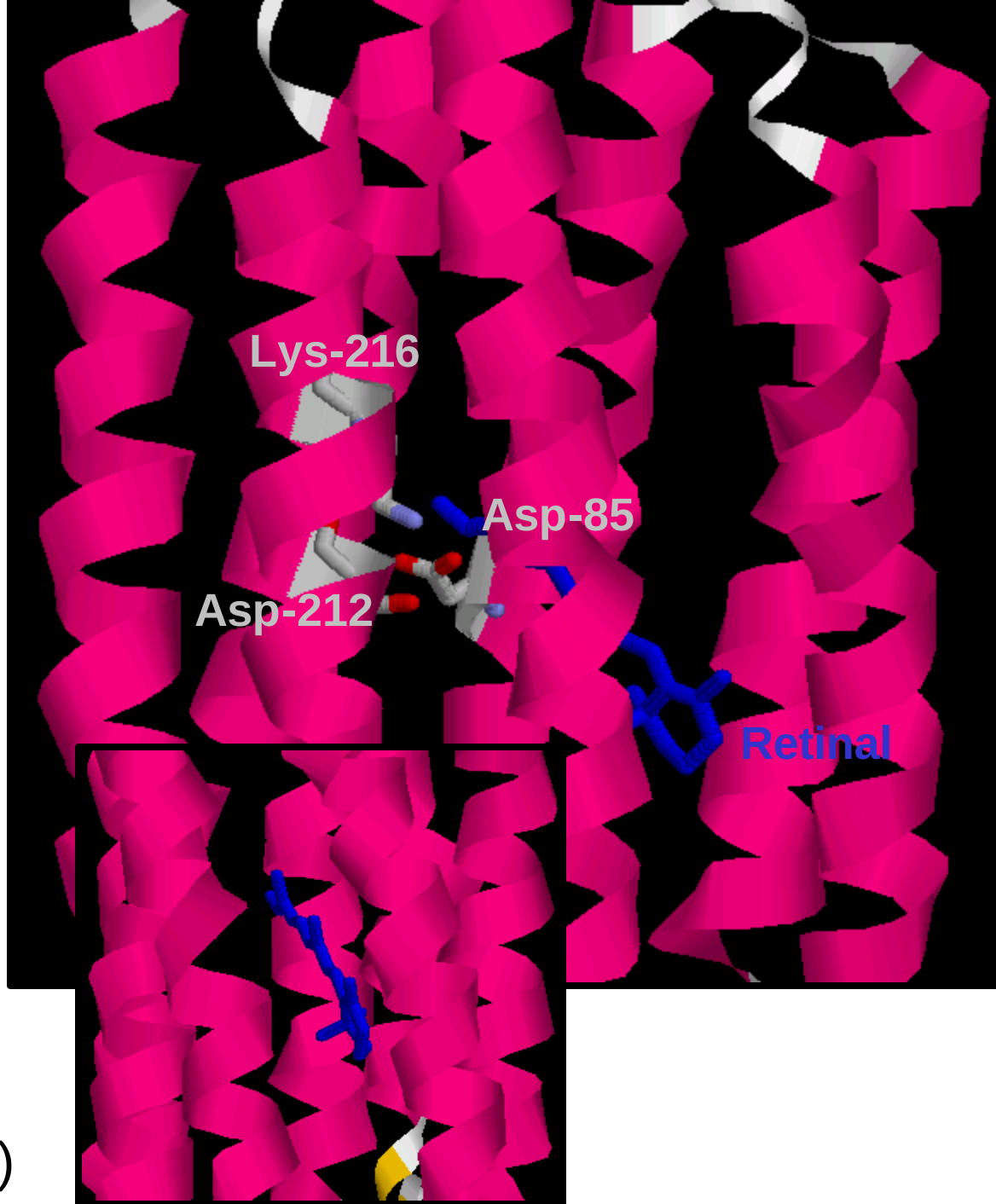
- Lys-216
- Asp-85
- Asp-212

- Planaritat de la
cadena poliènica i
l'anell ionona

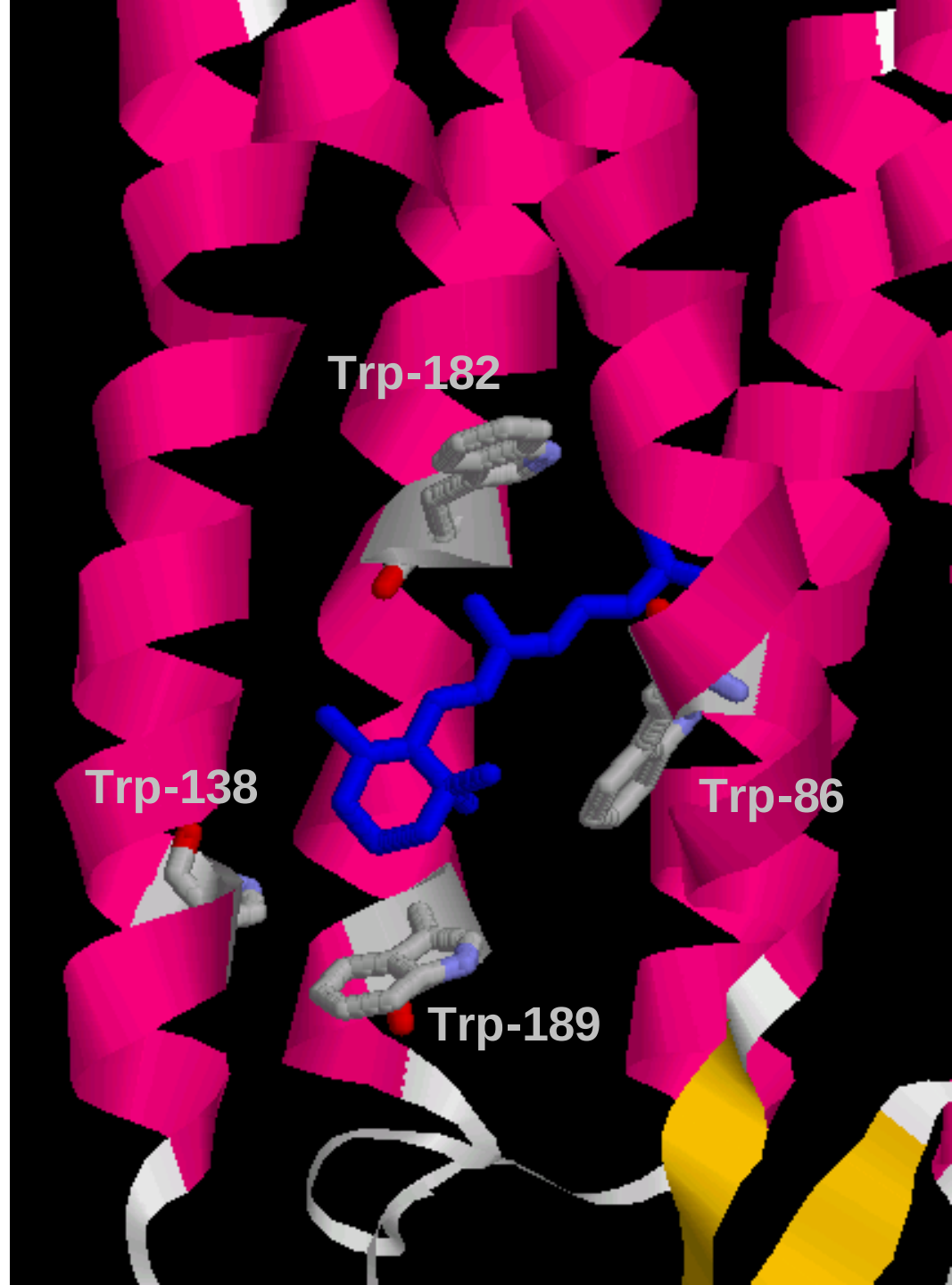


Absorció de longituds
d'ones dels vermells

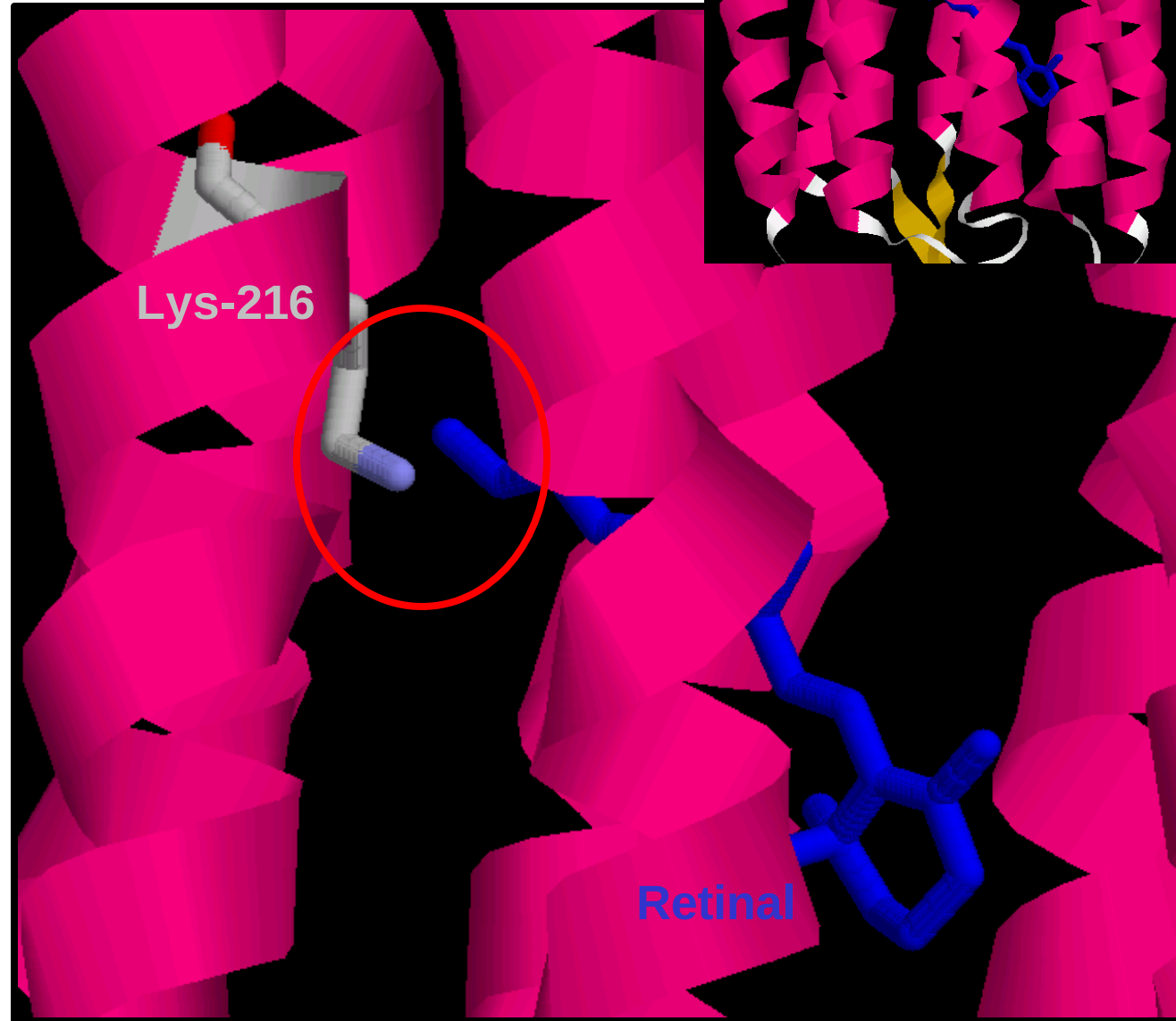
(*PURPLE MEMBRANE*)



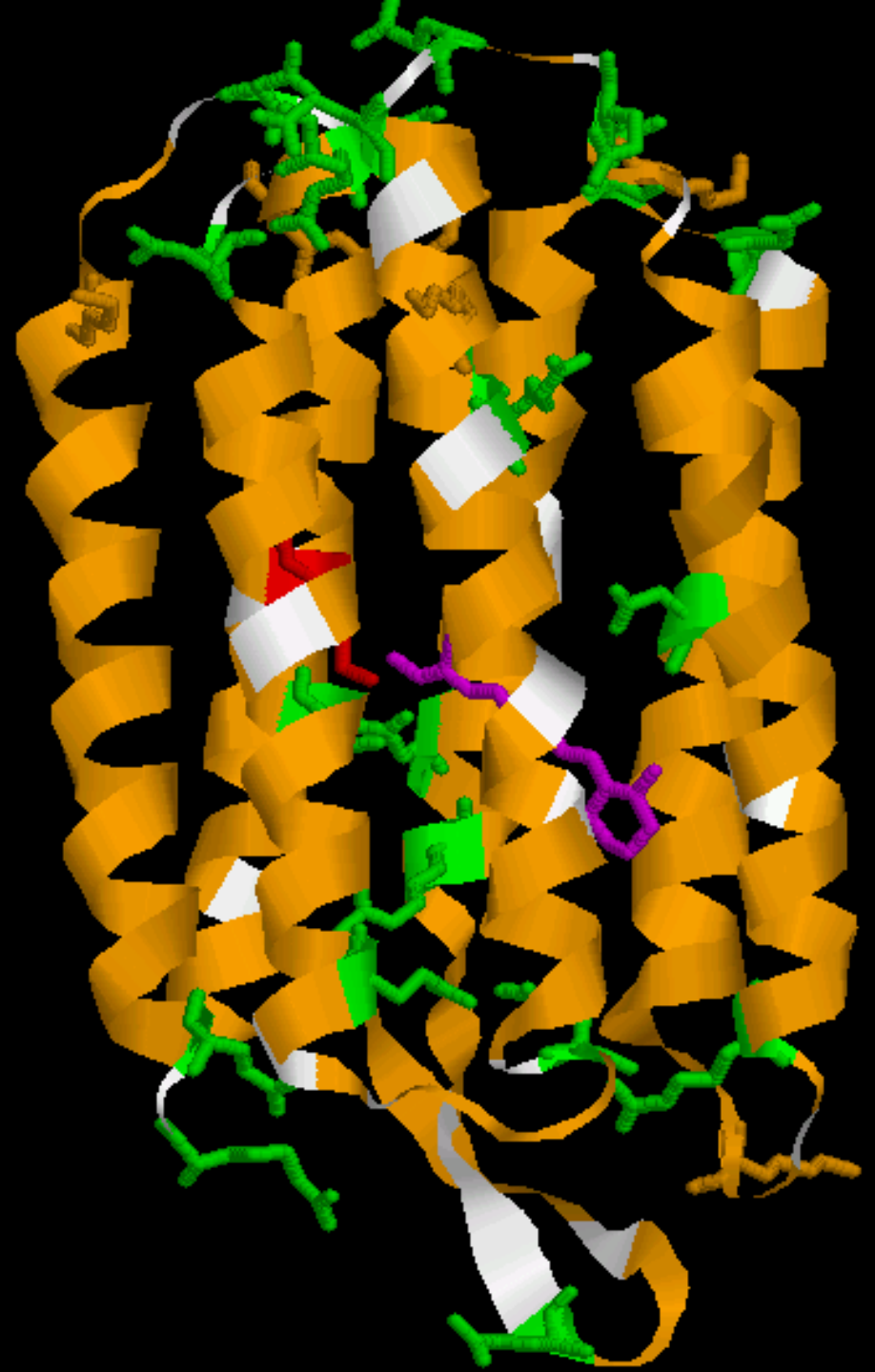
- Residus aromàtics envolten i inmobilitzen la cadena poliènica del retinal
- Regió proximal: Trp-86 i Trp-182
- Regió distal: Trp-138 i Trp-189



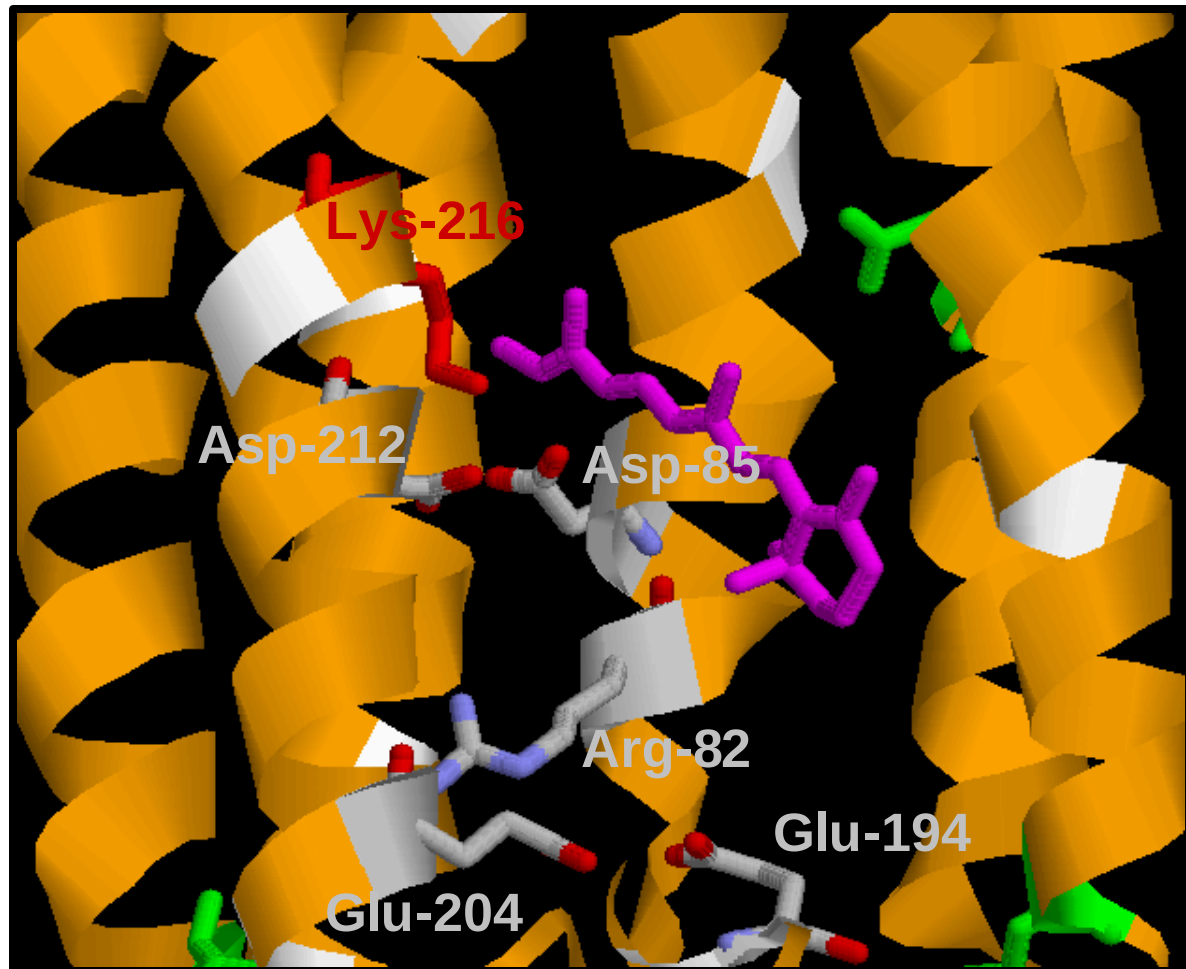
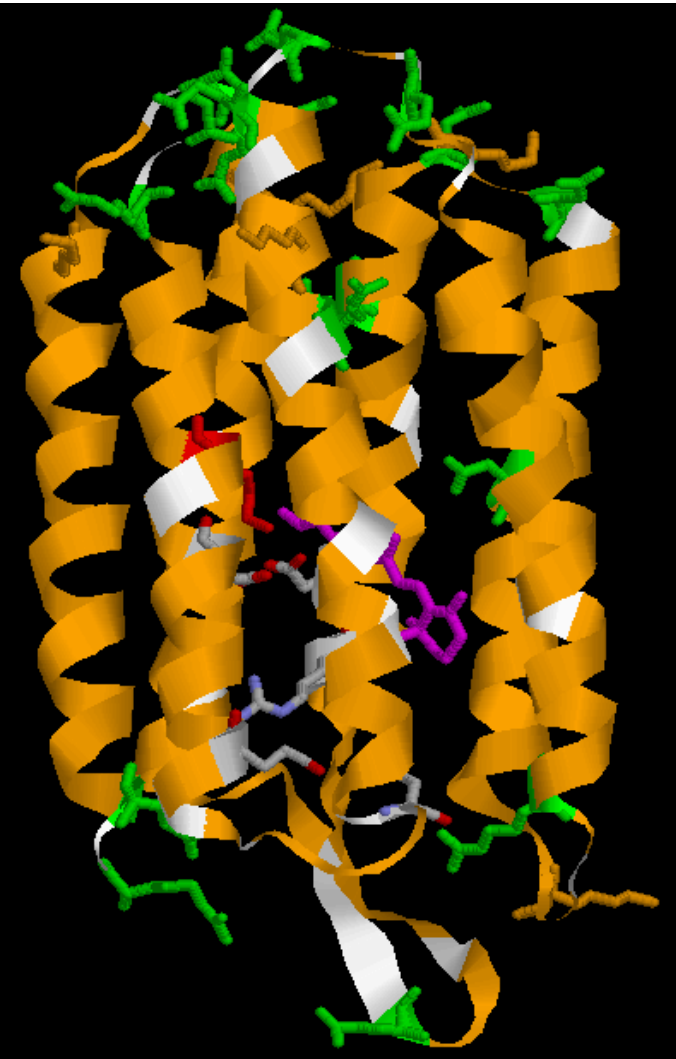
- Retinal forma una base de Schiff amb el grup amino de Lys-216 (hèlix G)



-Base de Schiff
divideix la cavitat
en dos seccions:

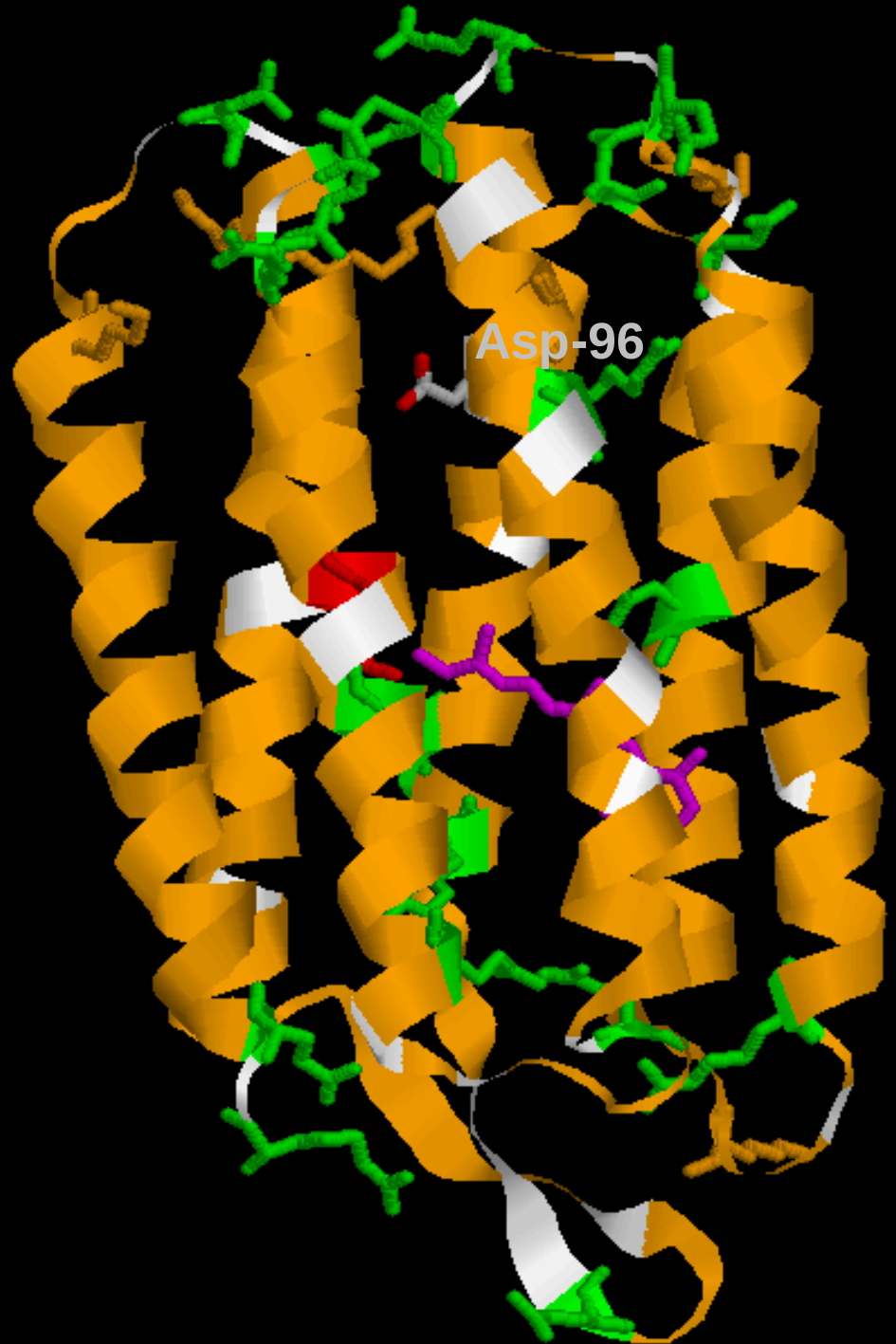


- Extracel·lular: residus carregats i polars
 - Asp-85
 - Asp-212, Arg-82, Glu-204, Glu-194



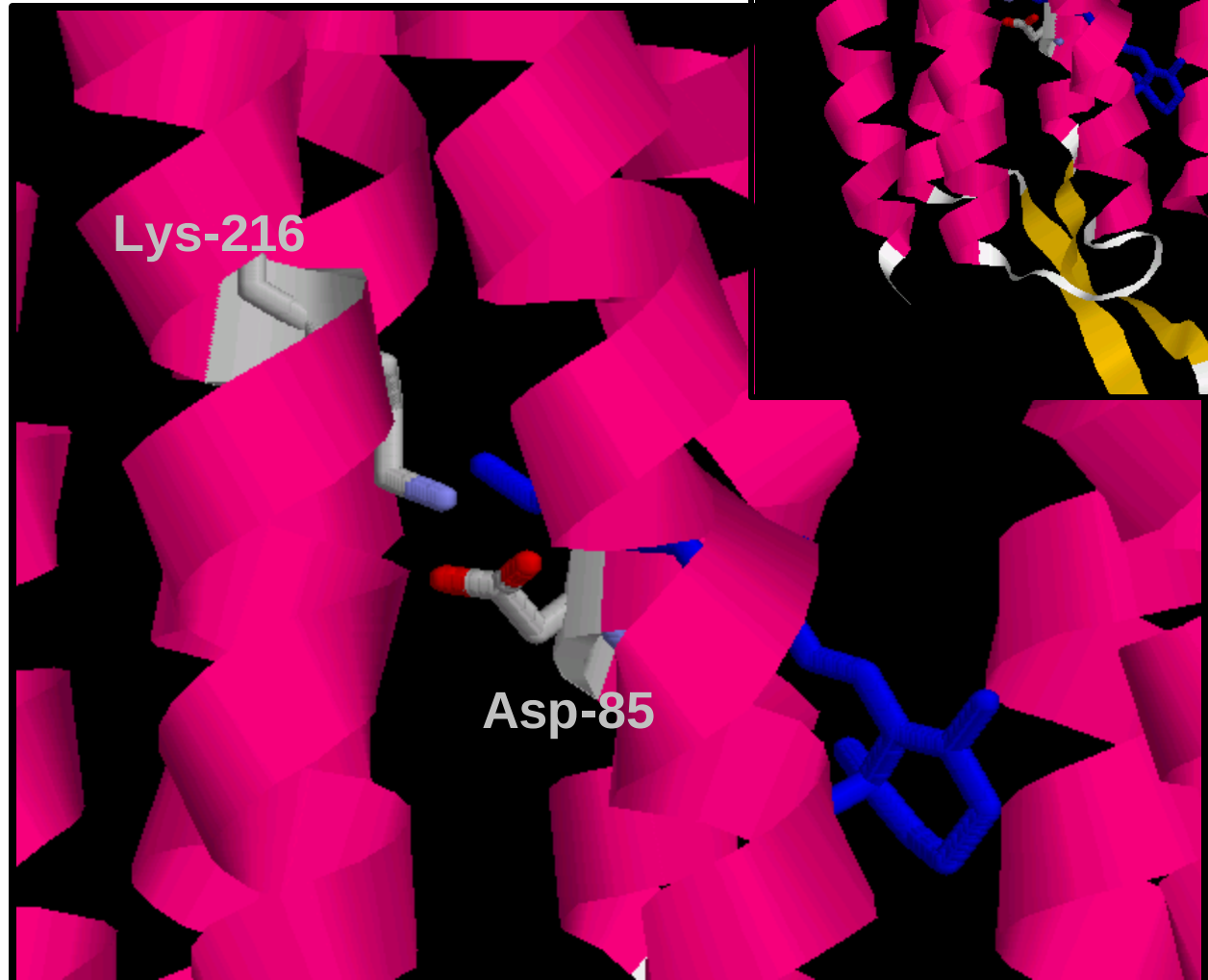
- Citoplasmàtica:
residus hidrofòbics

- Asp-96
(excepció)

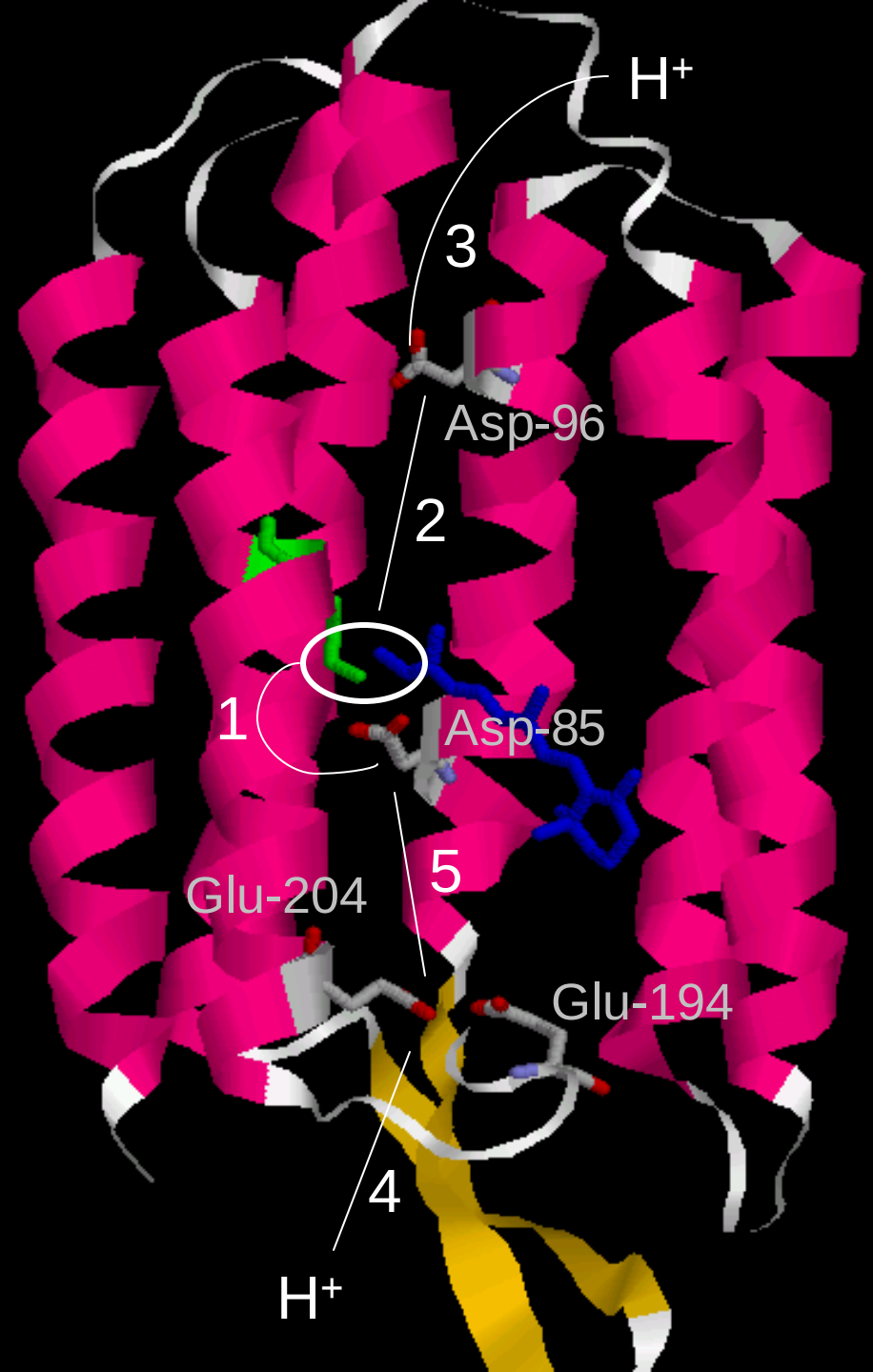


Transport de H^+ : protonació/desprotonació

- Lys-216 i Asp-85 són
imprescindibles
per el transport



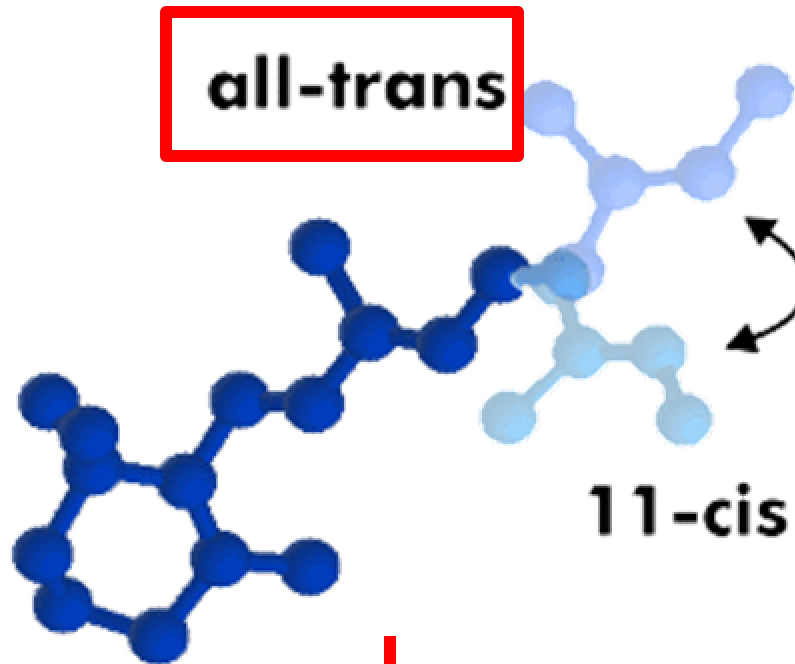
- Pas 1: Base de Schiff protona Asp-85
- Pas 2: Asp-96 reprotona la base de Schiff
- Pas 3: Reprotonació d'Asp-96
- Pas 4: Alliberament del H^+ al medi
- Pas 5: Transferència del H^+ de l'Asp-85 al grup alliberador de protons (Glu-204 i Glu-194)



RODOPSINA

-GPCR

-Retinal (cromòfor):



Cascada transmissió
senyal

Unió
transductina
(proteïna G)

Canvi conformacional

Descobrint l'estructura...

- Cryo-EM de cristalls 2D de rodopsina $\Rightarrow$ 7 hèlixs transmembrana.
- NMR $\Rightarrow$ caracterització de l'estructura i funció del cromòfor i pèptid.
- Any 2000 resolució de l'estructura d'un cristall 3D de rodopsina bovina.
- Estructura refinada a 2.8 Å de resolució.

Classificació SCOP

Plegament: receptors acoblats a proteïnes G classe A

Superfamília: receptors acoblats a proteïnes G classe A

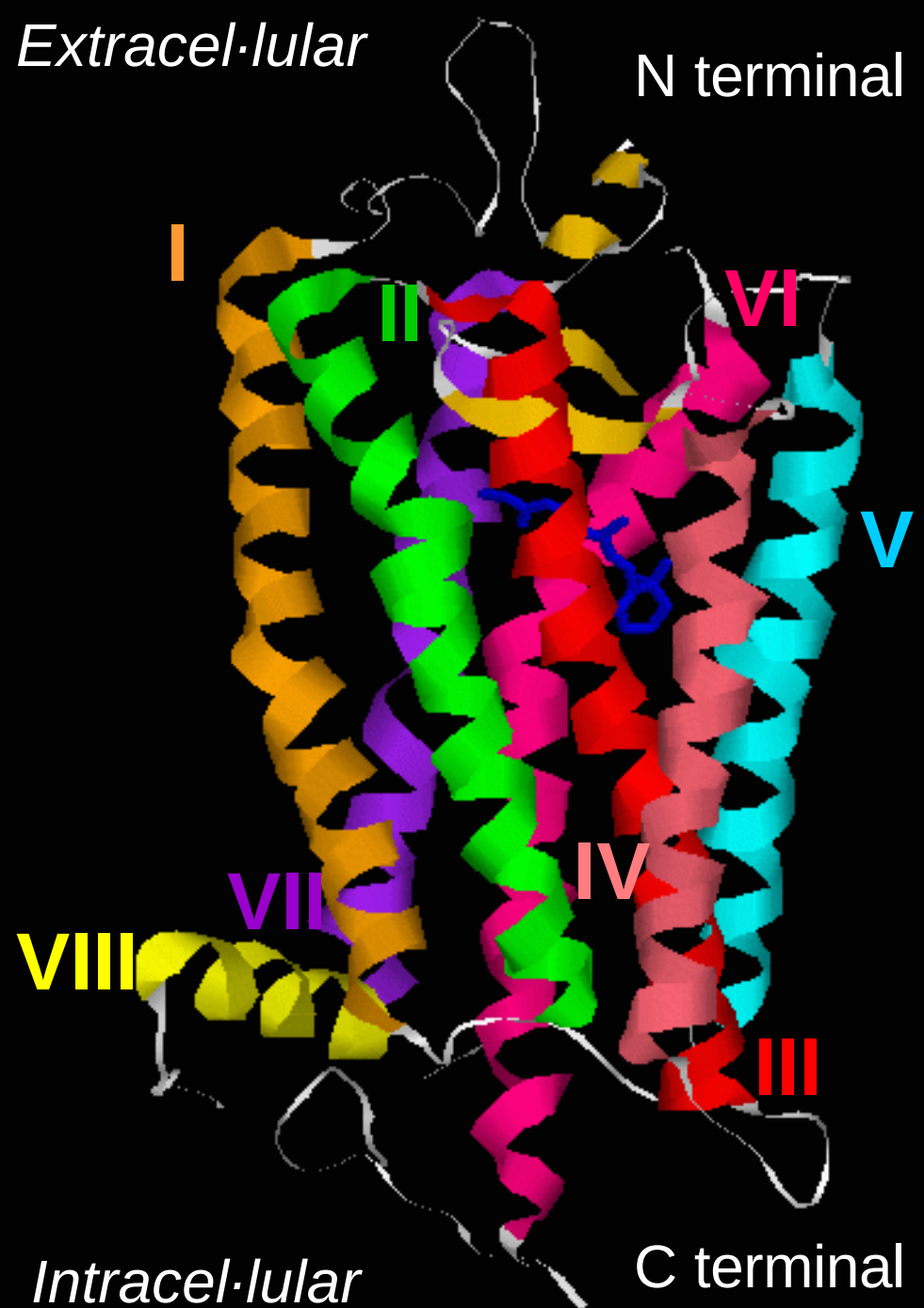
Família: rhodopsin-like

Entrada Protein Data Bank

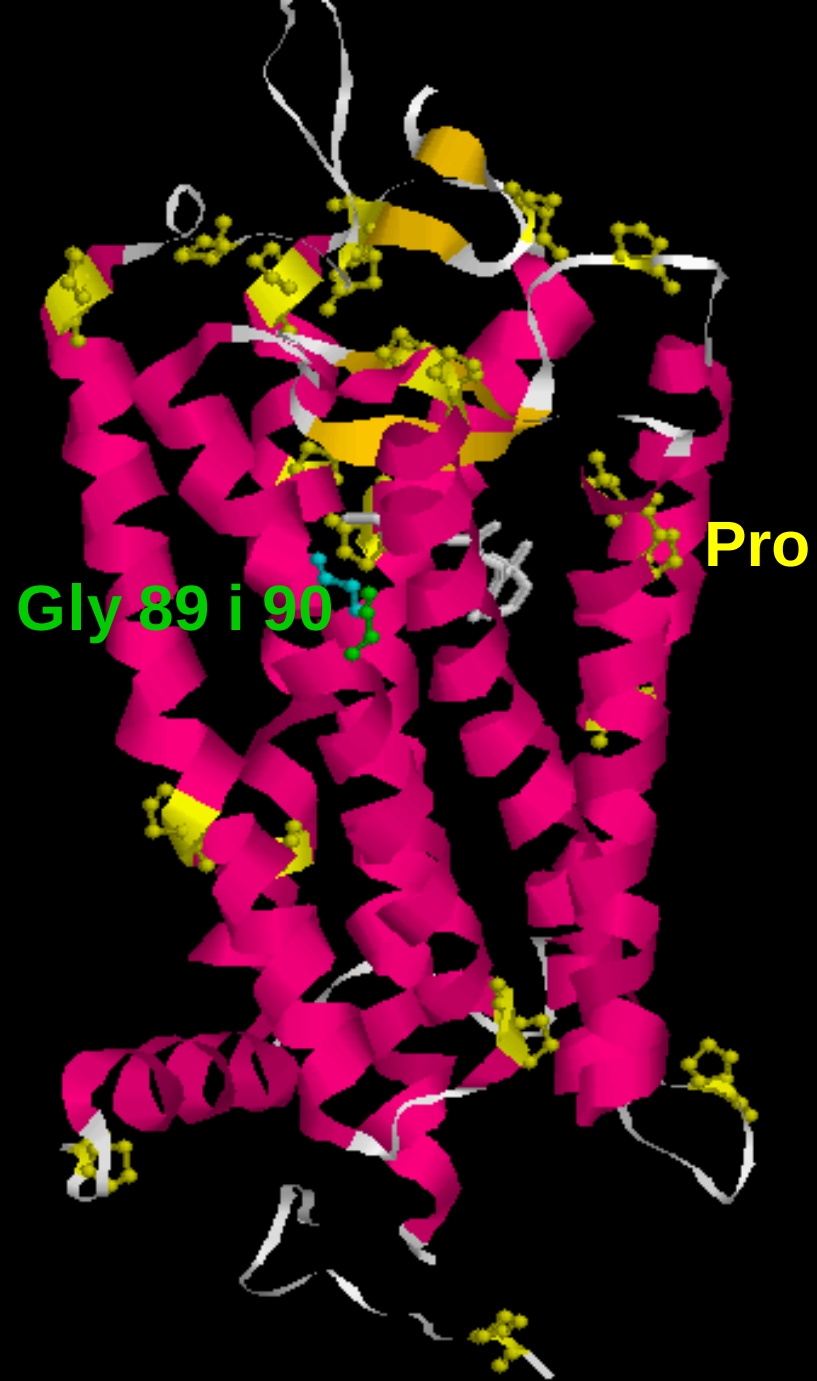
1l9h

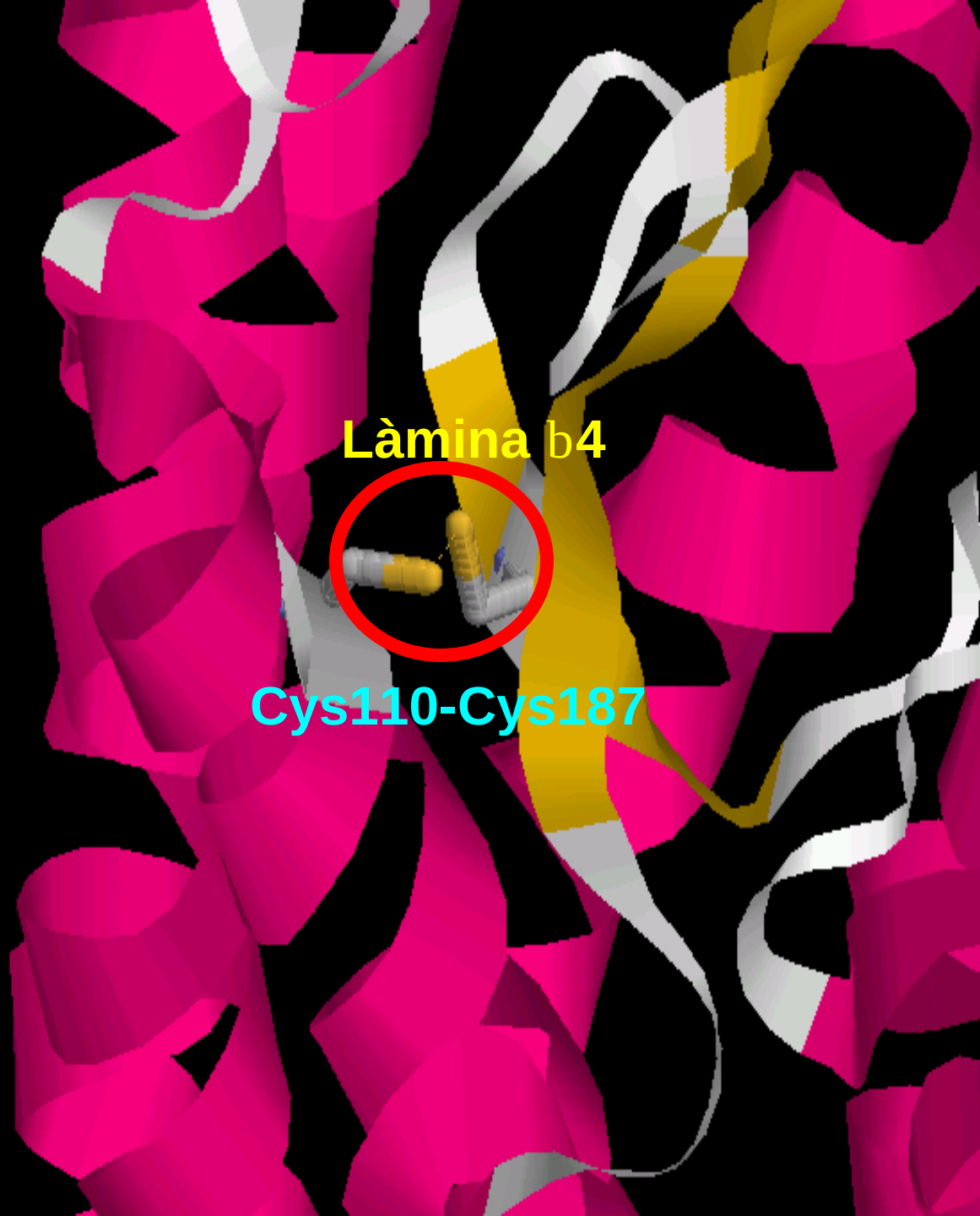
Estructura

- 7 hèlixs transmembrana
- 1 hèlix citoplasmàtica
- Hèlixs irregulars en longitud i orientació
- 4 làmines β extracel·lulars
- Retinal (no planar)

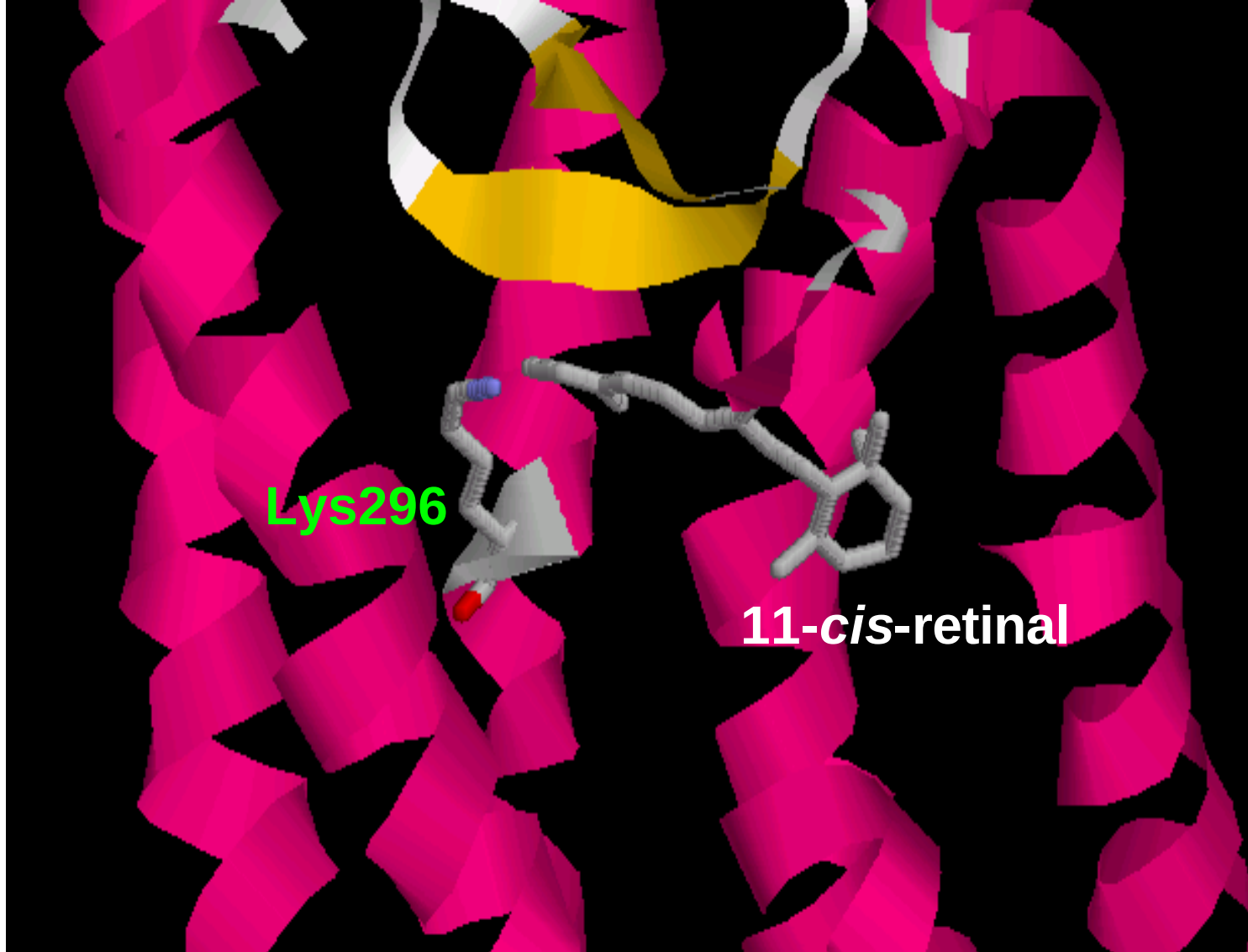


- Hèlixs no són rectes ni regulars $\Rightarrow$ Pro associades.
- Hèlix II Gly 89 i Gly 90.



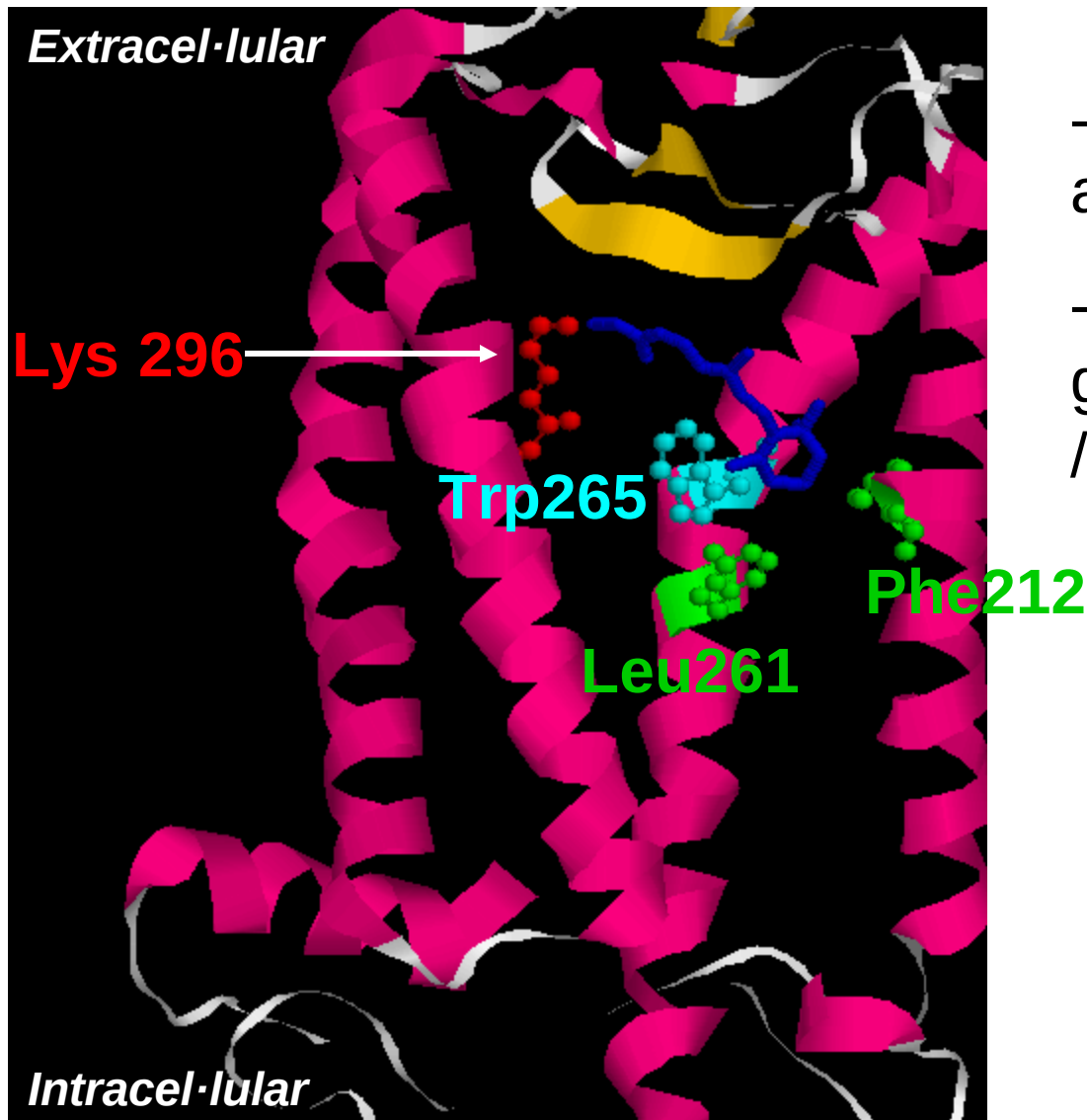


- Pont S-S molt conservat entre Cys 110 i Cys 187 per establitzar la làmina $\beta 4$.

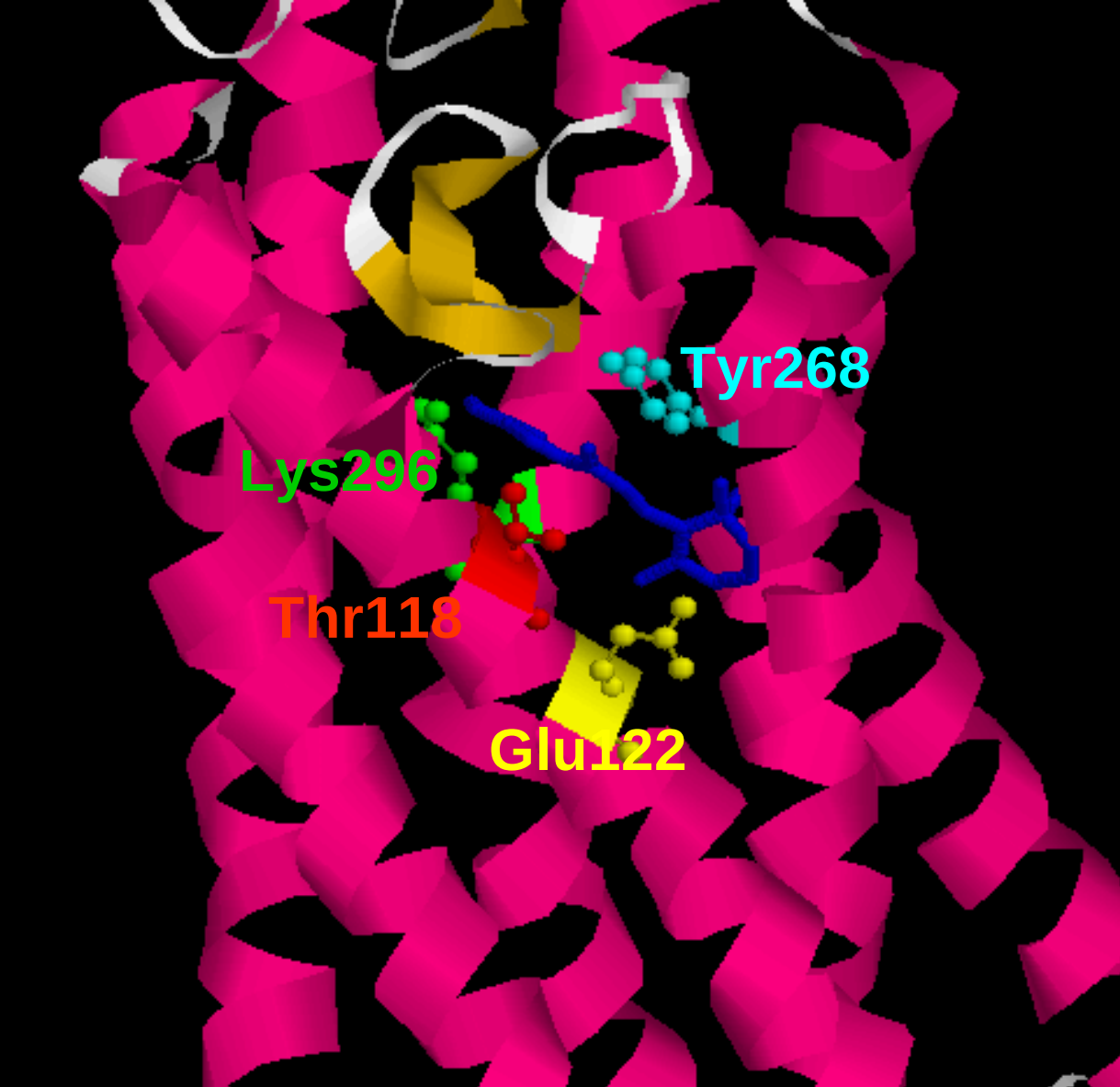


-Retinal forma una base de Schiff amb el grup amino de Lys296 (hèlix VII)

El retinal i el seu ambient



- Retinal localitzat proper a la cara extracel·lular.
- Medi d'unió barreja de grups hidrofòbics i polars / grups carregats:
 - Phe 212 i Phe 261 properes a l'anell β -ionona
 - Cadena lateral de Trp265 entre l'anell i la base de Schiff.



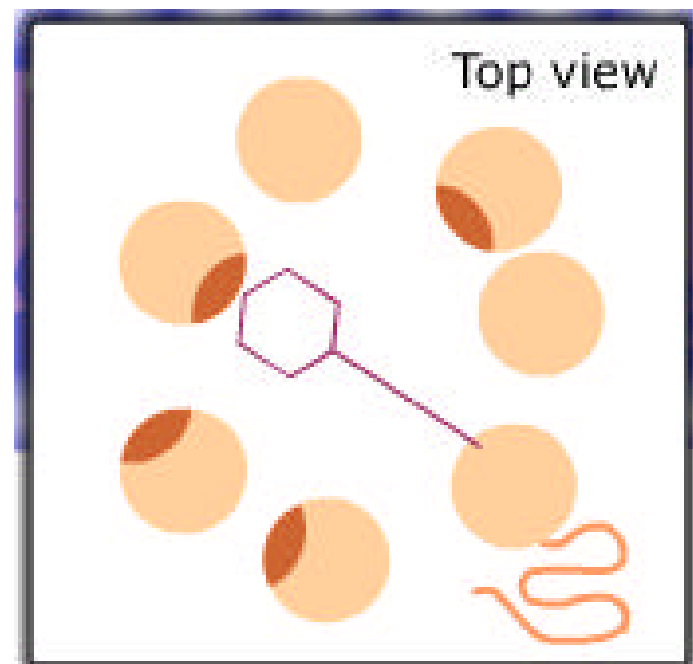
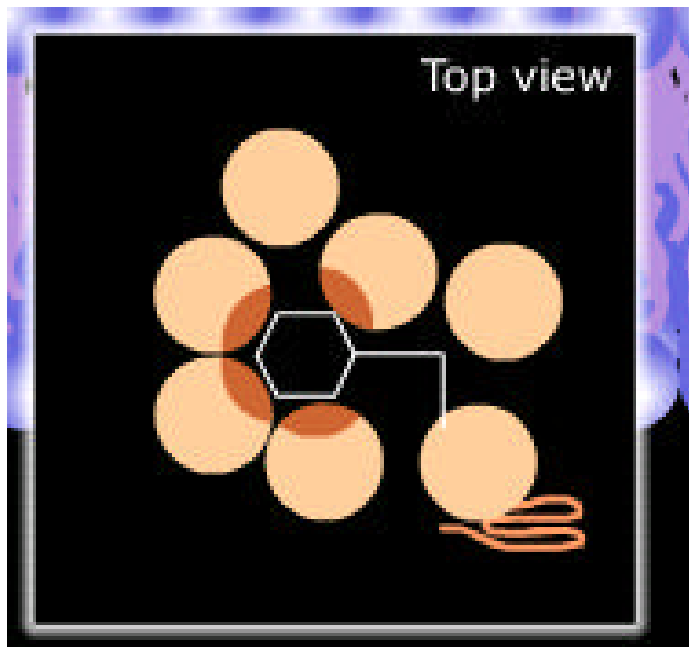
- Grups polars
Thr118 i Tyr268
propers al centre
del poliè.
- Cadena lateral
de Glu122 propera
a l'anell β -ionona.

Activació de la rodopsina

1r. Fotoisomerització del 11-*cis*-retinal a all-*trans*-retinal.

2n. Canvi conformacional del cromòfor $\Rightarrow$ moviment de les hèlixs:

- hèlix VII s'allunya de les hèlix I
- hèlix VI s'allunya de les altres hèlixs.



CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```

119hA      MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLIMLGFP-INFLT
1bm1      -----RPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKF
                        **      *      **      *

119hA      YVTVQHKKLRTPLNILLNLAVADLFMVFGGFTTILYTSLHGYFVFGPTGCNLEGGFFATL
1bm1      YAITTLVPAIAFTMYLSMLLGYGLTMVPFGGGEQNPIYWARYADWLFTHP-----
*              *      *      *      *      *      *      *

119hA      GGEIALWSLVVLAIERYVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLVGWSRYI
1bm1      -----LLLLDLALLVDADQGTILALVGADGIMIGTGLVGALTKVYSYR-FVWWA---
              *..*      *      *      *      *      *      *

119hA      PEGMQCSCGIDYYTPHEETNNEFVIYMFVVHFIIPLIIVIFFCYGQLVFTVKEAAAATTQ
1bm1      -----I---STAAML YILYVLFFGFTSKAESMRPEVAST--
                        .      * * **      .      .      *.*

119hA      KAEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPV
1bm1      --FKVLRNVTVVLWSAYPVVWLIGS-----EG--AGIVPLNIETLLFMVLDVSAKV
      *      .      .      *      *      *      .      *      *      *      *

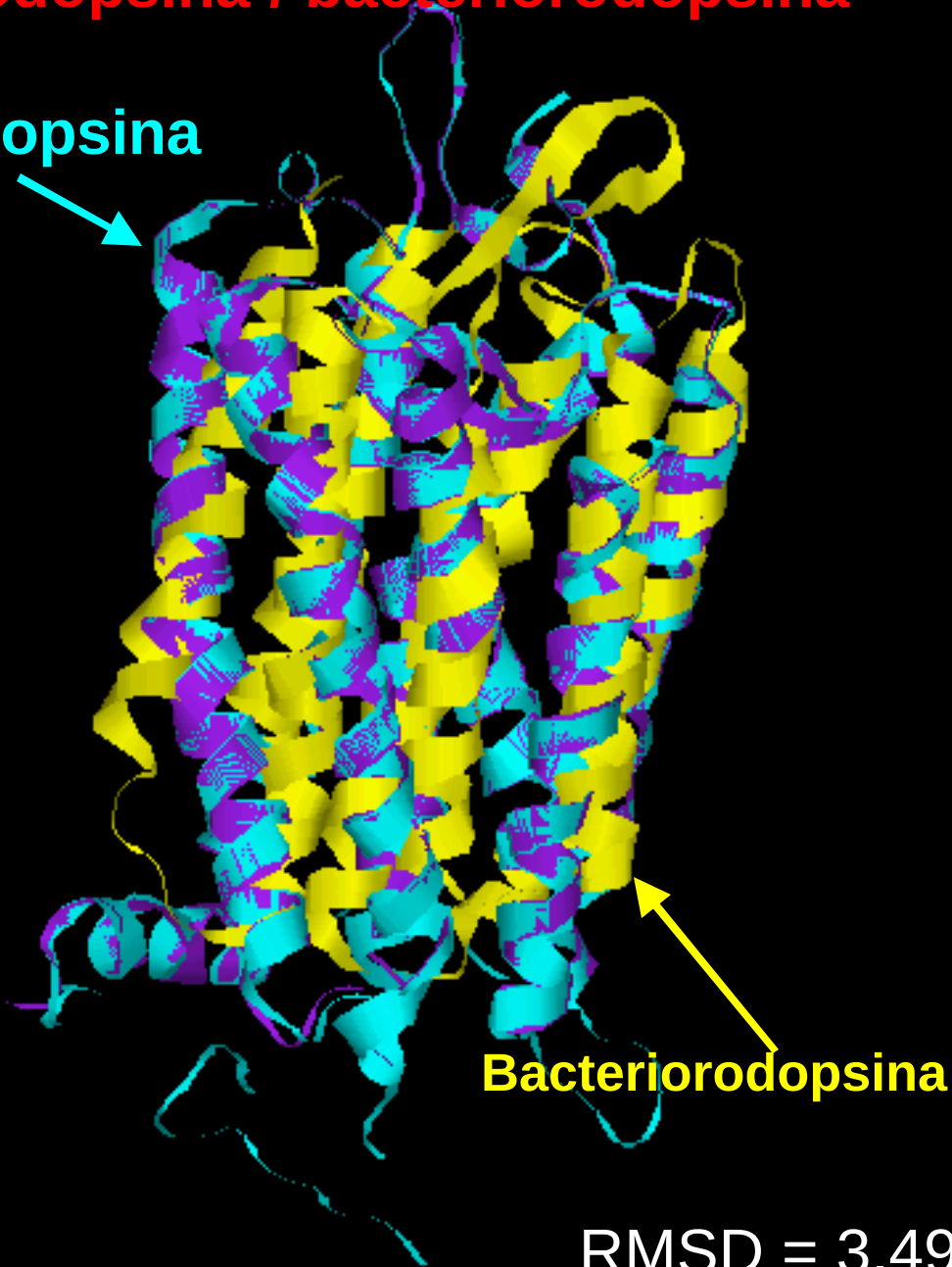
119hA      IYIMMNKQFRNCMVITLCCGKNPLGDSTTVSKTETSQVAPA
1bm1      GFGLILLRSR-----
      .      .      .      *

```

Aliniament clustalw: poca conservació en seqüència

Rodopsina / bacteriorodopsina

Rodopsina



Bacteriorodopsina

RMSD = 3.49

- Coincidència de les hèlixs transmembrana.
- Diferències degudes als kinks de la rodopsina.
- Diferències als loops.

CLUSTAL W(1.60) multiple sequence alignment

```
1bm1      -----RP--EWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMG-VS
119ha     MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIMLGFPINFLTLY

1bm1      DP-----DAKKFYAITTLVPAIAFTM-YL----SMLLGYGLTMVPFGGGEQNPI
119ha     VTVQHKKLRTPLN YILLNLAVADLFMVFGGFTTTL YTSLHGY-FVF-----

1bm1      Y-WARYADWLFTTPLL---DLALL-V-----D--ADQGTILALVGAD
119ha     GPTGCNLEGFFATLGGEIALWSLVVLAIERV VVCKPMSN-FRFGENHAIMGVAFTWVMA

1bm1      GIMIGTG--LVG-----ALTKVYSYRFV VWAISTAA-MLYILYVLFFG
119ha     LACAAPPLVGWSRYIPEGMQCSCGIDYYTPHE-E-TNNE SFVIYMFVVHFIIP LIVIFF-

1bm1      F-TSKA-----ESMRPEVASTFKVLRNVTTVLWSAYPVVWLIGSE-GAG-I
119ha     CYG-QLVFTVKEAAAATT-QKA-EKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFY-IFTHQGS

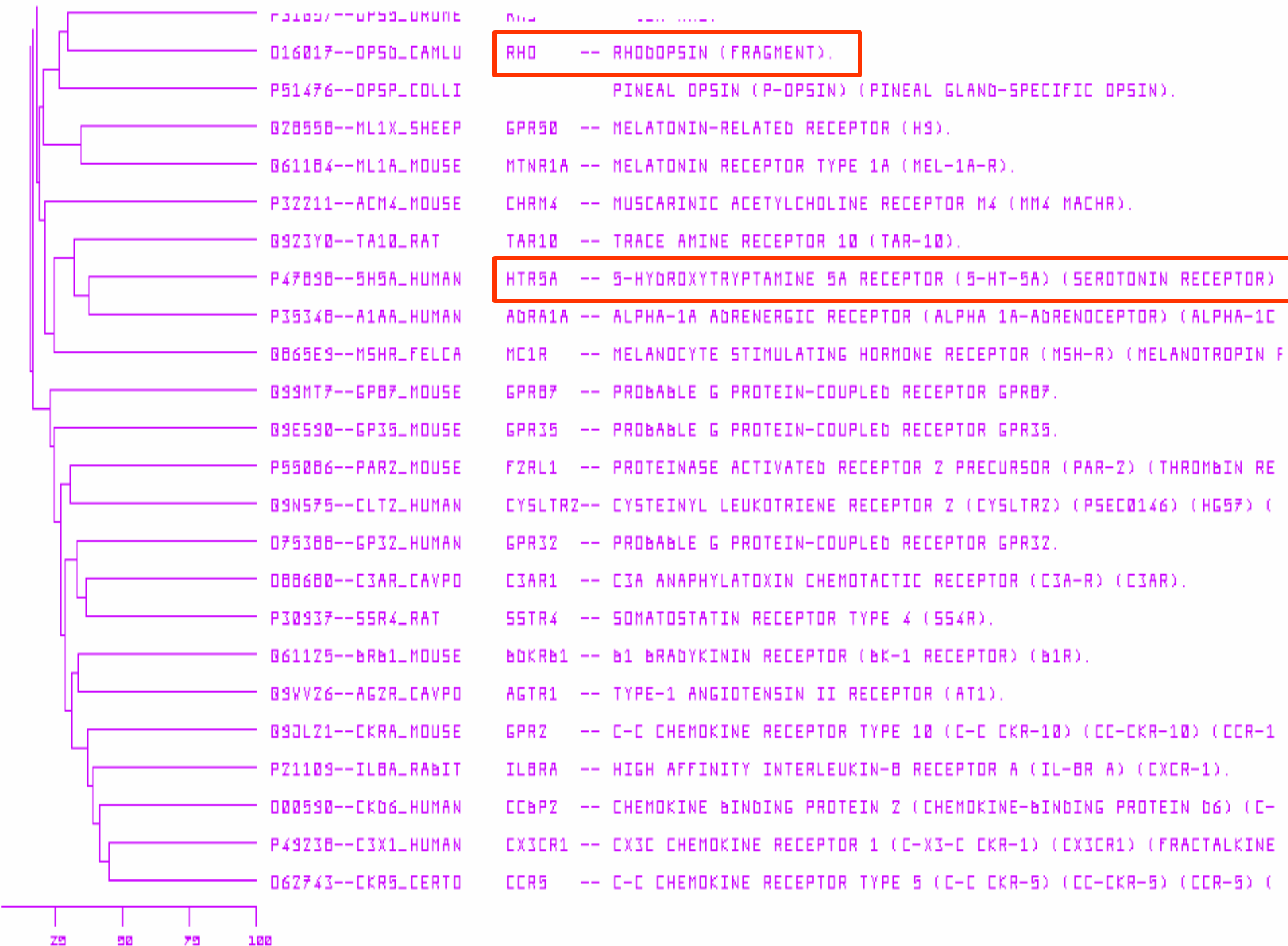
1bm1      VPLNIETLLFMVLDVSAKVGFGLI-L--LRSR-----
119ha     F-G---PIFMTIPAFFA-KTSAVYNPVIYIMMNKQFRNCMVTTLCGKNPLGDSTTVSKT

1bm1      -----
119ha     ETSQVAPA
□
```

Aliniament per estructura

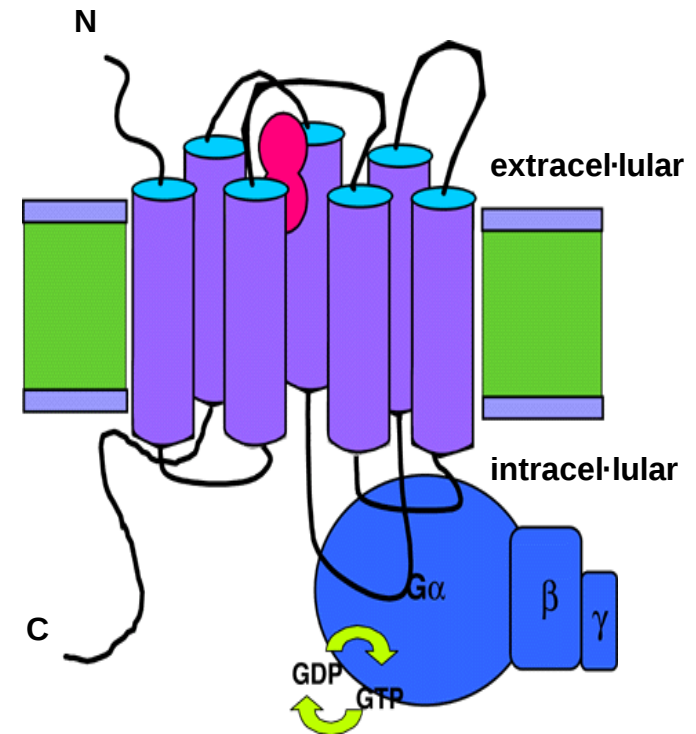
Rodopsina i funció GPCR

- Estructura del cristall de rodopsina $\Rightarrow$ 1a estructura 3D d'un GPCR.
- GPCRs gran interès biològic com a targets de drogues $\Rightarrow$ rodopsina com a model per entendre processos de senyalització.
- Irregularitats de les hèlixs de rodopsina $\Rightarrow$ distorsió models.
- Retinal site és representatiu de llocs d'unió de lligands d'aquestes proteïnes.



Receptor de Serotonina

- Pertany a la superfamília dels receptors acoblats a prot G. (GPCRs)
- 7 hèlix alfa transmembrana
- Interaccionen amb prot G amb el domini intracel·lular
- 7 subtipus
- Alt interès farmacèutic (migranya, depressió, Parkinson, esquizofrènia...)



NO CRISTAL·LITZADA



NECESSITAT D'UN MODEL

1. CERCA DE SEQÜÈNCIES HOMÓLOGUES

Seqüència
(id:AA69356)



PSI-BLAST

(base de dades PDB, SwissProt)



Resultats:

pdb|1F88|1F88-A rhodopsin

482 e-136

pdb|1HZX|1HZX-A rhodopsin

477 e-135



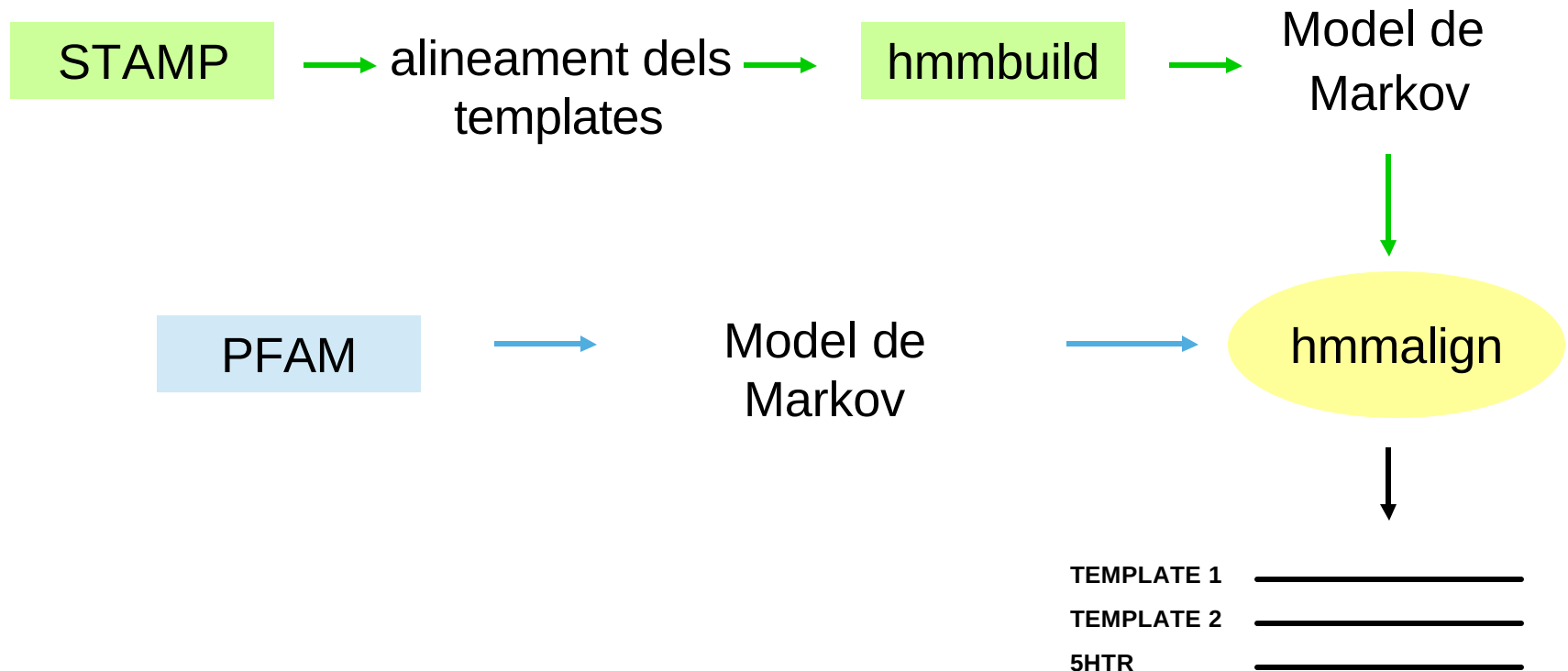
Obtenció dels pdb de l'SCOP
(pdb1f88.ent i pdb1hzx.ent)

2. ALINEAMENTS

Per seqüència:

CLUSTALW: 18.2% d'identitat

Per estructura:



2. ALINEAMENT

PREDICCIÓ D'HÈLIX TRANSMEMBRANA

Millora de l'alineament: predicció d'hèlix transmembrana.

TMHMM Server v. 2.0

Prediction of transmembrane helices in proteins

Update Nov. 29 2001: Minor change to the html output.

NOTE: You can submit many proteins at once in one fasta file. Please limit each submission to at most 4000 proteins. Please tick the 'One line per protein' option. Please leave time between each large submission.

Instructions

SUBMISSION

Submission of a local file in **FASTA** format (HTML 3.0 or higher)

OR by pasting sequence(s) in **FASTA** format:

Output format:

☒ Extensive, with graphics

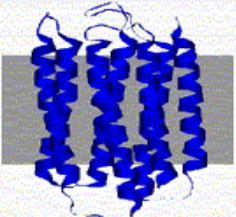
☐ Extensive, no graphics

☐ One line per protein

Other options:

☐ Use old model (version 1)

SEQUENCE ANALYSIS ■ TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK DTU



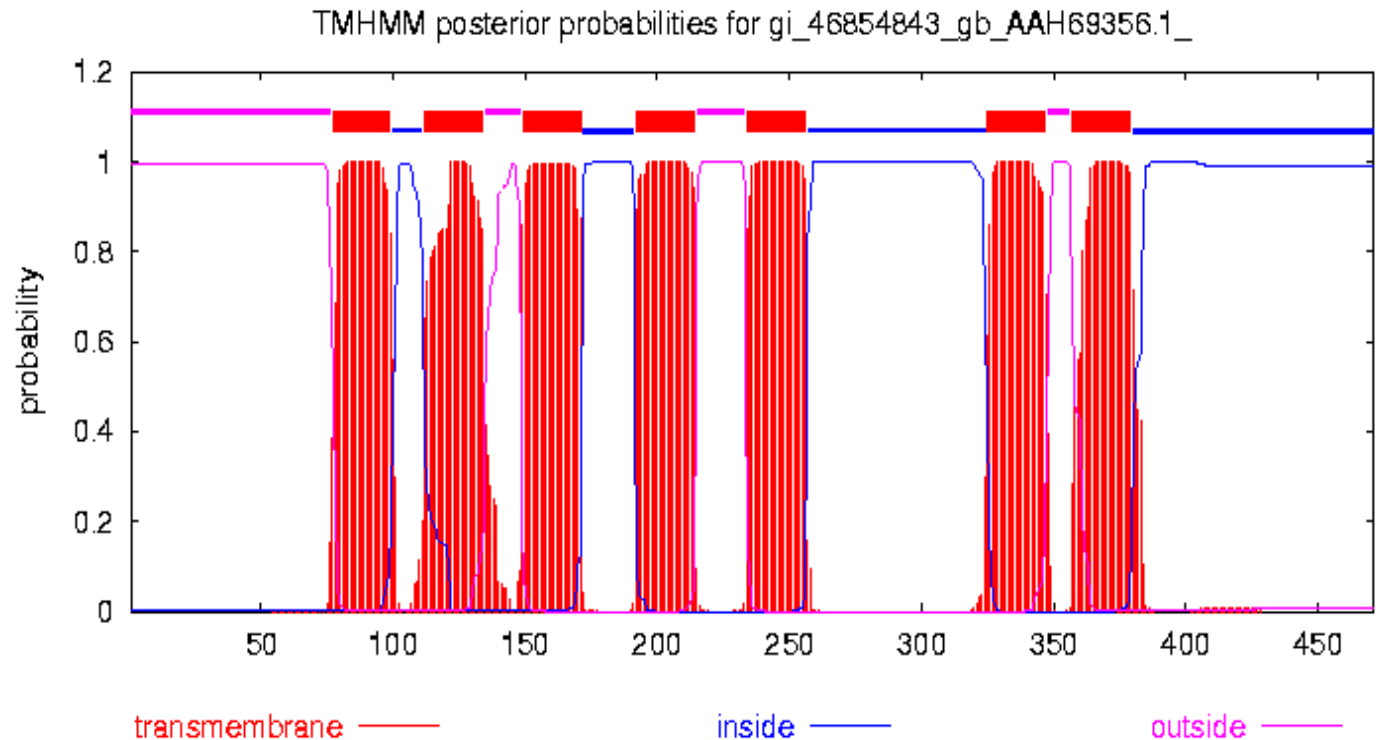
2. ALINEAMENT

PREDICCIÓ D'HÈLIX TRANSMEMBRANA

5HTR

TMHMM results

outside	1	76
TMhelix	77	99
inside	100	111
TMhelix	112	134
outside	135	148
TMhelix	149	171
inside	172	191
TMhelix	192	214
outside	215	233
TMhelix	234	256
inside	257	324
TMhelix	325	347
outside	348	356
TMhelix	357	379
inside	380	471



També amb les seqüències homòlogues (rodopsines)

2. ALINEAMENT

MODIFICACIÓ DE L'ALINEAMENT

PDB ————— Hèlix alfa

Template 1

```
>1f88A
MNGTEGPNFY VPFSNKTGVV RSPFEAPQYY LAEPWQFSML AAYMFLLIML GFPINFLTLY VTVQHKKLRT
PLNYILLNLA VADLFMVFGG FTTTLYTSLH GYFVFGPTGC NLEGFFATLG GEIALWSLVV LAIERYVVVC
KPMSNFRFGE NHAIMGVAFT WVMALACAAP PLVGWSRYIP EGMQCSCGID YYTPHEETNN ESFVIYMFVV
HFIIP LIVIF FCYGQLVFTV KEAAASATTQ KAEKEVTRMV IIMVIAFLIC WLPYAGVAFY IFTHQGSDFG
PIFMTIPAFF AKTSAVYNPV IYIMMNKQFR NCMVTTLCCG KNPSTTVSKT ETSQVAPA
```

2. ALINEAMENT

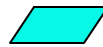
MODIFICACIÓ DE L'ALINEAMENT

TMHMM ———Regions transmembrana de les hèlix 

Template 1

```
>1f88A
MNGTEGPNFY VPFSNKTGVV RSPFEAPQYY LAEPWQFSML AAYMFLIML GFPINFLTLY VTVQHKKLRT
PLNYILLNLA VADLFMVFGG FTTTLYTSLH GYFVFGPTGC NLEGFFATLG GEIALWVSLVW LAIERVWVVC
KPMSNFRFGE NHAIMGVAFT WVMALACAAP PLVGWWSRYIP EGMQCSCGID YYTPHEETNN ESFVIYMFVV
HFIIPLIVIF FCYGQLVFTV KEAAASATTQ KAEKEVTRMV IIMVIAFLIC WLPYAGVAFY IFTHQGSDFG
PIFMTIPAFF AKTSAVYNPV IYIMMNKQFR NCMVTTLCCG KNPSTTVSKT ETSQVAPA
```

Regions transmembrana

 5HTR

 Template 1

 Template 2

```
ANTSDAFNWT VDSENRTNL: cegCLSP3CL 3LLHLQEKW SALLTAUVII
MNGTEGPNFY VPFSNKTGV. ...URSPFEA PQYYLAEPWQ FSMLAAMFL
MNGTEGPNFY VPFSNKTGV. ...URSPFEA PQYYLAEPWQ FSMLAAMFL
```

```
LTIAG---NI LVIMAVSLEK KLQNTNYFL MSLAIADMLLG FLUMPVSML
LIMLGFPINF LTLYTUVQHK KLRTPLNYIL LMLAVADLFMV FGGFTTTLV
LIMLGFPINF LTLYTUVQHK KLRTPLNYIL LMLAVADLFMV FGGFTTTLV
```

```
TILYGYRWPL PSKICAVMIY LDVLFSTASI MHLCAISLDY VAIQNPIMH
TSLHGYFVFG PTG.CNLEGF FATLGGEIAL WSLUWLAIERY WUUCKPM3N
TSLHGYFVFG PTG.CNLEGF FATLGGEIAL WSLUWLAIERY WUUCKPM3N
```

```
SRFhSRTKAF LKIIAVWTIS VGI3MPiPUF GLdddSKVKE G---SCLL-
FRF.GENHAI MGVAFTWMA LACAAP.PLV GW...SRYIPE GMQCSCGID
FRF.GENHAI MGVAFTWMA LACAAP.PLV GW...SRYIPE GMQCSCGID
```

```
-----AD DNFULIG3V SFFIPLTIMV ITYILTIKSL KEATLCUSD
YYTPHEETNN ESFVIYMPV HPIIPLIVIF PCYGLQVFTV. KEAAAS--A
YYTPHEETNN ESFVIYMPV HPIIPLIVIF PCYGLQVFTV. KEA---AAA
```

```
LGTRAklaaf sflpqsalsz eklfgzihr epqzvtgrrtm qziszEOKa
TTQKA..... EKEV
TTQKA..... EKEV
```

```
CKULGIUFFL FUMWCPFFI TNIMAVICKE Sca+DWIGALL NUFUWIGYL
TRMVIIMVIA FLICWLPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIM TIPAFAKT
TRMVIIMVIA FLICWLPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIM TIPAFAKT
```

```
SSAUNFLUYT LFKTYRSAP SRYIQCYKE NKKPLQLILVN T-----IPA
SAUYNPUIYI MMDKQFRNCM UTTLCCKMP -----STTVSK TETSQUAPA
SAUYNPUIYI MMDKQFRNCM UTTLCCKK-- NPLGdstTVSK TETSQUAPA
```

Regions transmembrana

```
CKVLGIIVFFL FQMMWCPFFI TNIMAVICKE ScdeDVIGALL NVFVWIGYL
TRMVIIMVIA FLICULPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIFM TIPAFFAKT
TRMVIIMVIA FLICULPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIFM TIPAFFAKT
```

```
SSAUMPLVYT LFNKTYRSAP SRYIQCYKE NKKPLQLILVN T-----IPA
SAFYNPVIYI MMNKQFRNCM VTTLCCKNP -----STTVSK TETSQUAPA
SAFYNPVIYI MMNKQFRNCM VTTLCCK-- NPLGDSTTVSK TETSQUAPA
```

modificació manual!!



 5HTR

 Template 1

 Template 2

```
CKVLGIIVFFL FQMMWCPFFI TNIMAVICKE ScdeD---VIG ALLNVFWI
TRMVIIMVIA FLICULPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIFM TIPAFFAKT
TRMVIIMVIA FLICULPYAG VAFYIFTHQG S...DFGPIFM TIPAFFAKT
```

```
GYLSSAUMPL VYTLFNKTYR SAFSRYIQCY YKENKKPLQLI LVNT--IPA
SAFYNPVIYI MMNKQFRNCM VTTLCCKNP -----STTVSK TETSQUAPA
SAFYNPVIYI MMNKQFRNCM VTTLCCK-- NPLGDSTTVSK TETSQUAPA
```

3. MODELING

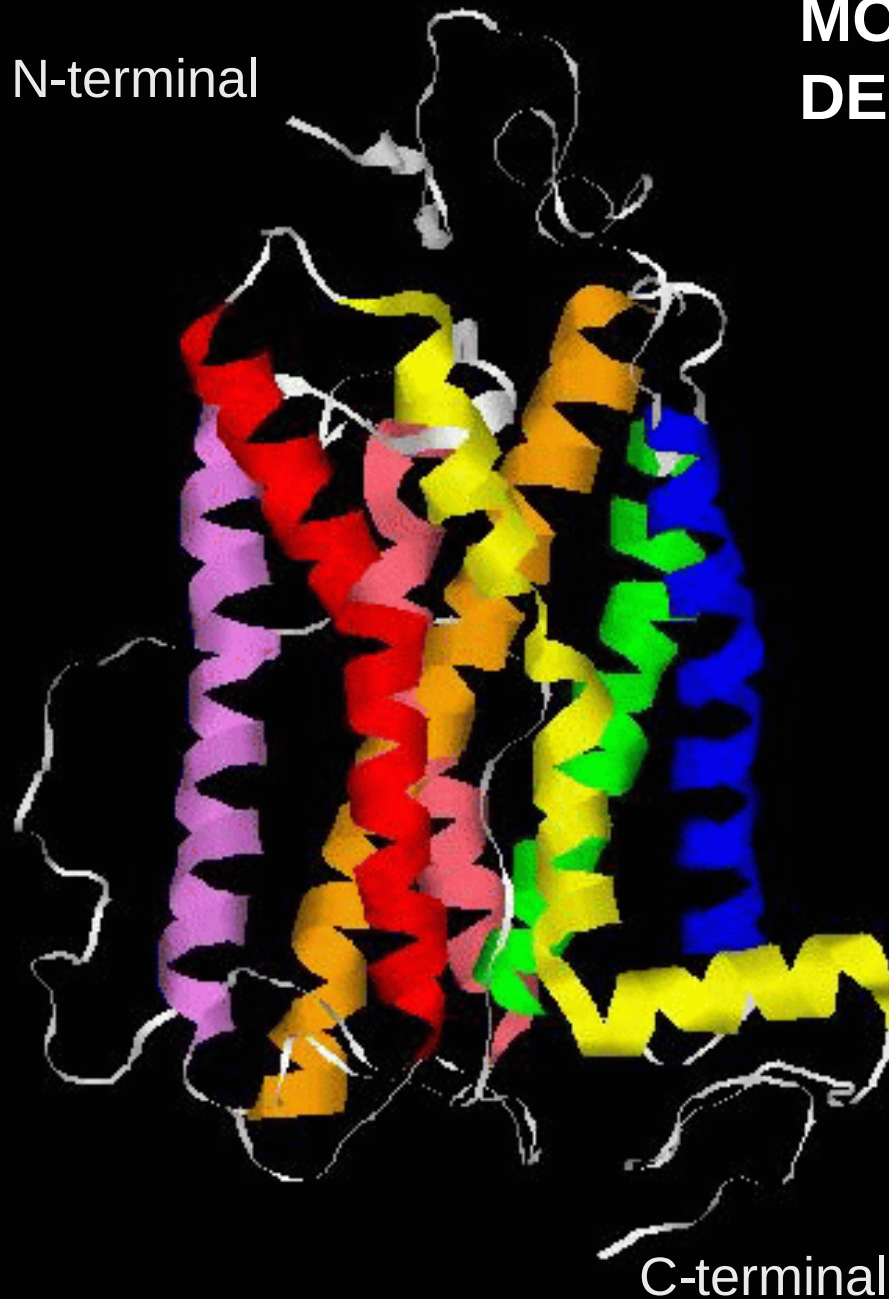
Model 1



Model 2



MODEL RECEPTOR DE SEROTONINA



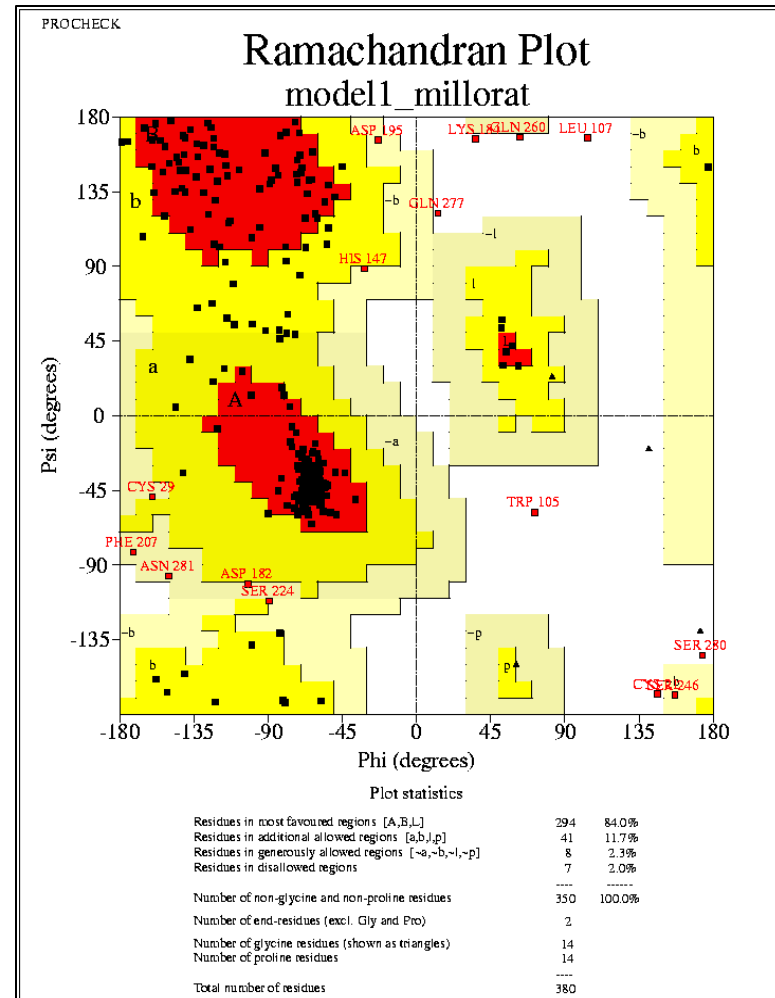
Helix transm 1
Helix transm 2
Helix transm 3
Helix transm 4
Helix transm 5
Helix transm 6
Helix transm 7

4. VALORACIÓ DEL MODEL

1. GEOMÈTRICAMENT: PROCHECK

Ramachandran plot:

84.0% core
11.7% allow
2.3% gener
2.0% disall



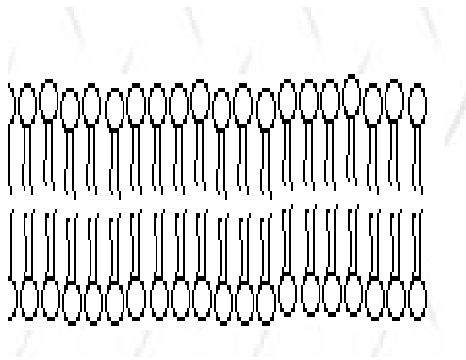
VALORACIÓ DEL MODEL

2.- ENERGÈTICAMENT: PROSA

No és possible per l'ambient lipídic.

3.- POSICIÓ DE RESIDUS CATIÒNICS:

Interacció amb el
grup fosfat del



RMSD

5HTR-bRho: 2.36

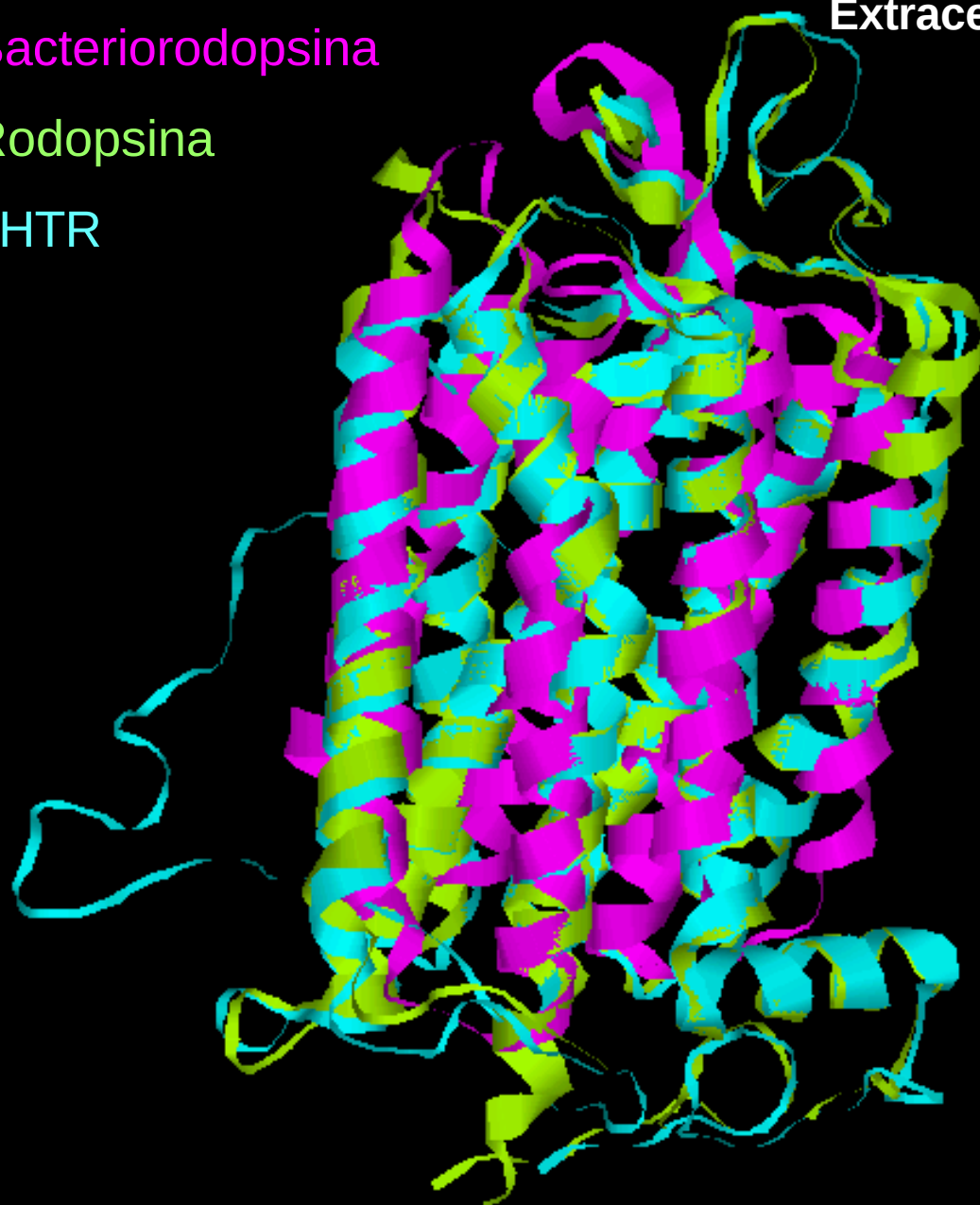
5HTR-Rho: 1.02

Bacteriorodopsina

Rodopsina

5HTR

Extracel·lular

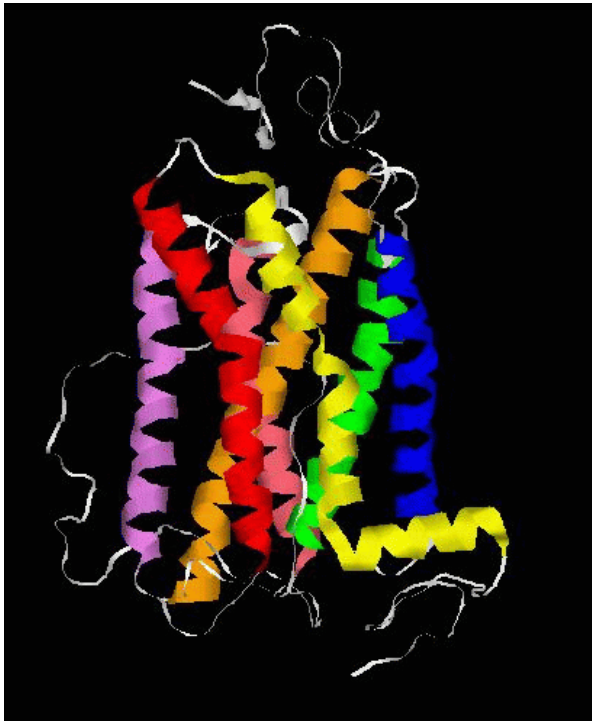


Intracel·lular

ESTRUCTURA DEL 5HTR

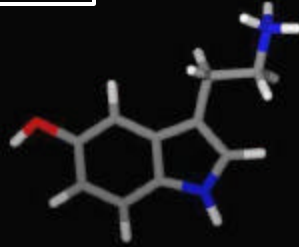
1. DOMINI UNIÓ AL LLIGAND

- Estudis per mutagènesi dirigida
- Implicació de:
butxaca entre les 7 hèlix transmembrana (domini extracel·lular)



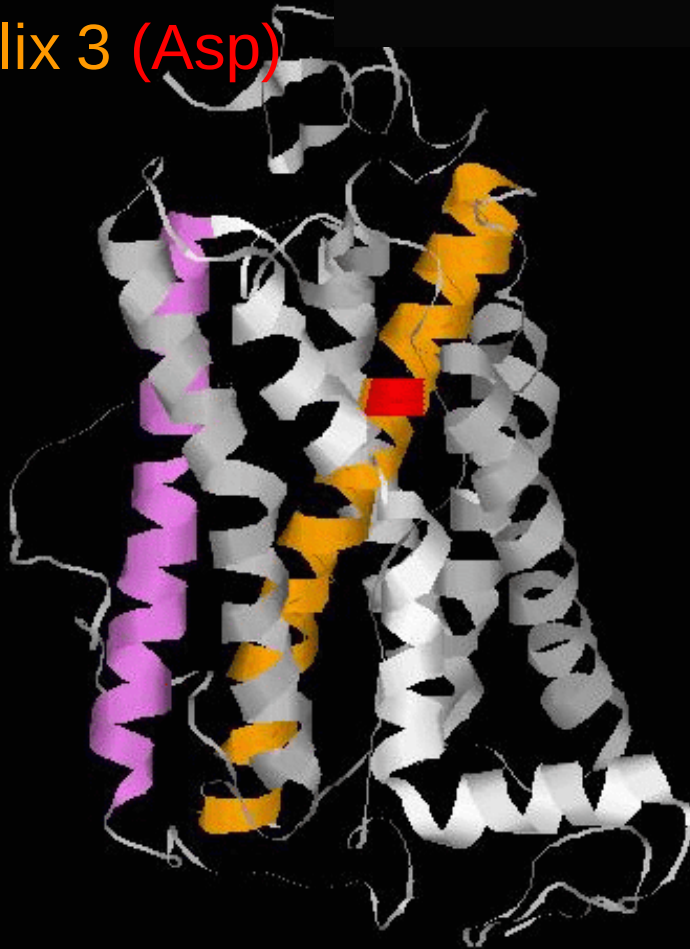
Ligand petit

Serotonin



Hélix 5

Hélix 3 (Asp)

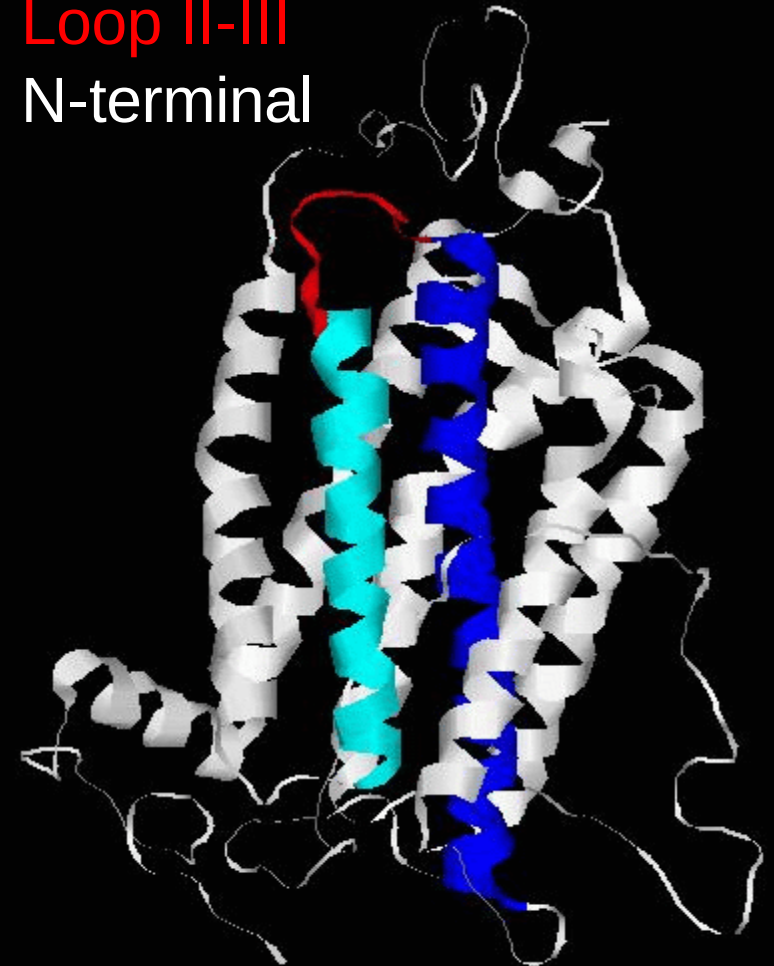


Ligand gran

Neuropéptids

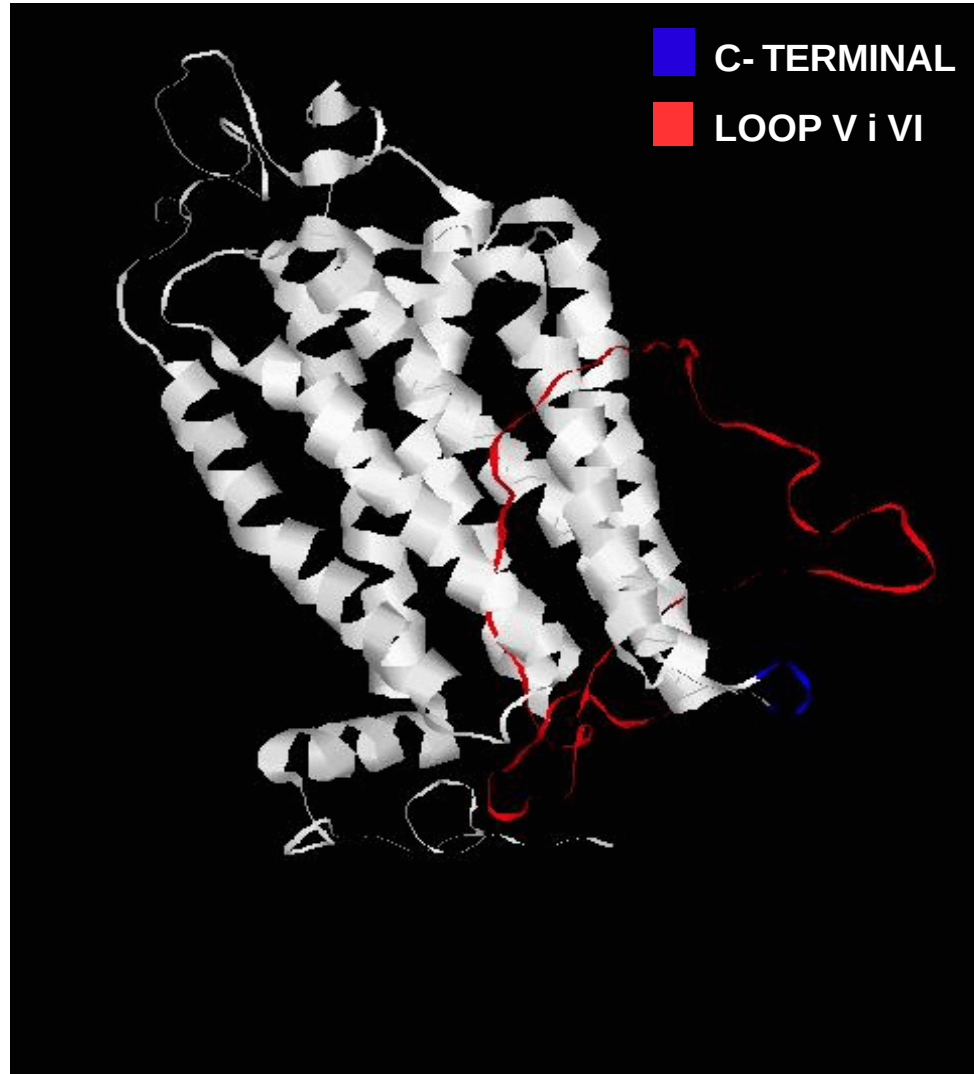
Loop II-III

N-terminal



ESTRUCTURA DEL 5HTR

2. DOMINI INTERACCIÓ A PROTEÏNA G



CONSERVACIÓ d'AA de RODOPSINA en altres GPCR

CLUSTALW

Aa unió al retinal

Base de Shift

Phe 261 Trp 265 Tyr 168

Lys 268

5HTR

altres
GPCR

```
home2C_ser      IVFFVFLIMWCPFFIT-NILSVLCEKSCNQK-----LMEKLLNVFVWIGYVCS---
serhome2A       IVFFLFVVMWCPFFIT-NIMAVICKESCNE-----VIGALLNVFVWIGYLSS---
serhome2B       IVFFLFLLMWCPFFIT-NITLVLCDS-CNQT-----TLQMLLEIFVWIGYVSS---
ser2B_mous      VVFFLFLLMWCPFFIT-NLTLALCDS-CNQT-----TLKTLLEIFVWIGYVSS---
ser2A_MOUS      IVFFLFVVMWCPFFIT-NIMAVICKESCNE-----VIGALLNVFVWIGYLSS---
serporc7A       IIVGAF TVCULPFFLLSTARPFICGTACSCI-----PLWVER-TFLWLGYANS---
rodopsina       IMVIAFLICWLPYAGVAFYIFTHQGS---D-----FGPIFMTIPAFFAL TSA---
h1R_HUMAN       VVFSQEDDREVDKLYCFPLDIVHMQAAAE-----SRDYVAVNRSHGQLKTDEQ
dAR_HUMAN       VIMGVFVCCWLPFFIL-NCILPFCGSGETQPF-----CIDSNTFDVFVWFGWANS---
B2AR_HUMAN      IIMGFTTLCWLPFFIV-NIVHVIQDN-----LIRKEVYILLNWIGYVNS---
A1AR_HUMAN      IVVGCFVLCWLPFFLVMPIGSFFPDF--KP-----SETVFKIVFWLGYLNS---
ACM3_HUMAN      TRAIYSIVLKLPGHSTILNSTKLPSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDG---
CKR3_HUMAN      VIMAVFFIFWTPYNVAILLSSYQSILFGNDCER-----SKHLDLVMLVTEVIAYSHC---
IL8A_HUMAN      AVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCE---RRNNIGRALDATEILGFLHS---
CB1R_HUMAN      LILVVLIICWGPLLAIMVYDVFGKMN---K-----LIKTVFAFCSMCLLNS---
ML1A_HUMAN      VVFLVFAICWAPLNFIGLAVASDPASMVPR-----IPEWLFVASYYMAYFNS---
```

CONSERVACIÓ d'AA de RODOPSINA en altres GPCR

Aa del Pont S-S

Cys 110

Cys 187

home2C_ser	DYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCALISLDRYVAIRNPIEHSRFNSRTKAIMKIA
serhome2A	GYRWPLPSKLCVWIIYLDVLFSTASIMHLCALISLDRYVAIQNP I HHSRFNSRTKAFLKII
<u>serhome2B</u>	EAMWPLPLVLCPAWFLDVLFFSTASIMHLCALISVDRYIAIKKPIQANQYNSRATAFIKIT
ser2B_mous	EAIWPLPLALCPAWFLDVLFFSTASIMHLCALISLDRYIAIKKPIQANQCNRATAFIKIT
ser2A_MOUSE	GYRWPLPSKLCVWIIYLDVLFSTASIMHLCALISLDRYVAIQNP I HHSRFNSRTKAFLKII
serporc7A	GGKWIFGHFFCNVFIAMDVMCCTASIMTLCVISIDRYLGITRPLTYPVRQNGKCMAMKIL
<u>rodopsina</u>	G-YFVFGPTGCNLEGFATLGGEIALWSLVVLAIERVYVVCCKPMSNFR-FGENHAIMGVA
h1R_HUMAN	S-KWSLGRPLCLFWLSMDYVASTASIFSIFLCIDRYRSVQQLRYLKRYRTKTRASATIL
dAR_HUMAN	G-FWPFQ-SFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVISVDRYWAISSPFYERKMTPKAAFILIS
B2AR_HUMAN	K-MWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASITELCVIAVDRYFAITSPFKYQSLLTKNKARVIL
A1AR_HUMAN	G-YWAFGRVFCNIWAAVDVLCCTASIMGLCIISIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALL
ACM3_HUMAN	N-RWALGNLACDLWLAIQVYASNASVMNLLVISFDYFYSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIG
CKR3_HUMAN	H-NWVFGHGMCKLLSGFYHTGLYSEIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALRARTVTTFGVITSI
IL8A_HUMAN	G--WIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRTLT-QKRHLVKFVCL
CB1R_HUMAN	H--RKDSRNVLFLKLGQVTASFTASVGSFLTAIDRYISIHRLAYKRIYTRPKAVVAF
ML1A_HUMAN	N-GWNLGYLHCQVSGFLMGLSVIGSIFNITGIAINRYCYICHSLKYDKLYSSKNSLCYVL
	. . . ** .
home2C_ser	IVWAIISIGVSVPIPVIGLRDEEKV-FVNN-----TTCVLNDP---NFVLIGSFVAF
serhome2A	AVWTISVGISMPIPVFGLODDSKV-FKE-----GSCLLADD---NFVLIGSFVAF
<u>serhome2B</u>	VVWLISIGIAIPVPIKGIETVDVN-PNN-----ITCVLTKEKRGDFMLFGSLAAF
ser2B_mous	VVWLISIGIAIPVPIKGIETVDVIN-PHN-----VTCELTKEKRGDFMFGSLAAF
ser2A_MOUSE	AVWTISVGISMPIPVFGLODDSKV-FKE-----GSCLLADD---NFVLIGSFVAF
serporc7A	SVWLLSASITLP-PLFGWAQNVN---DD-----KVCLISQD---FGYTIYSTAVAF
<u>rodopsina</u>	FTWVMALACAAP-PLVGWSRYIPEGMQSCG-----IDYYPHEETNNESFVIYMFVVHF
h1R_HUMAN	GAWFLSFLWVIP--ILGWNHFMQOTSVRR-----EDKCETDFYDVTWFKVMTAIIHF
dAR_HUMAN	VAWTSLSVLISFIPVQLSWHKAKTSPSDGNATSLAETIDNCDSSLS--RTYAISSSVISF
B2AR_HUMAN	MVWIVSGLTSFLPIQMHVYRATHQEAINCYN-----ETCCDFFTN--QAYAIASSIVSF
A1AR_HUMAN	CVWALSLVISIG-PLFGWRQAP--EDE-----TICQINEE--PGYVLFSAIGSF
ACM3_HUMAN	LAWVISFVLWAP-AILFWQYFVGKRTVPP-----GECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
CKR3_HUMAN	VTUGLAVLAALPEFIFYETEELFEETLCS-----ALYPEDTVYSWRHFHTLRMTIFCL
IL8A_HUMAN	GCWGLSMNLSLP--FFLFRQAYHPNNS-----PVCYEVLG---NDTAKWRMVLR
CB1R_HUMAN	LMWTIAIVIAVL-PLLGWNCCKLQ-----SVCSDIFP--HIDETYLFWIG
ML1A_HUMAN	LIWLLTLAAVLPNLRAGTLQYDPR-----IYSCFQAQSVSSAYTIAVVVFHF

* ..

CONSERVACIÓ d'AA de RODOPSINA en altres GPCR

PFAM



Model de
Markov

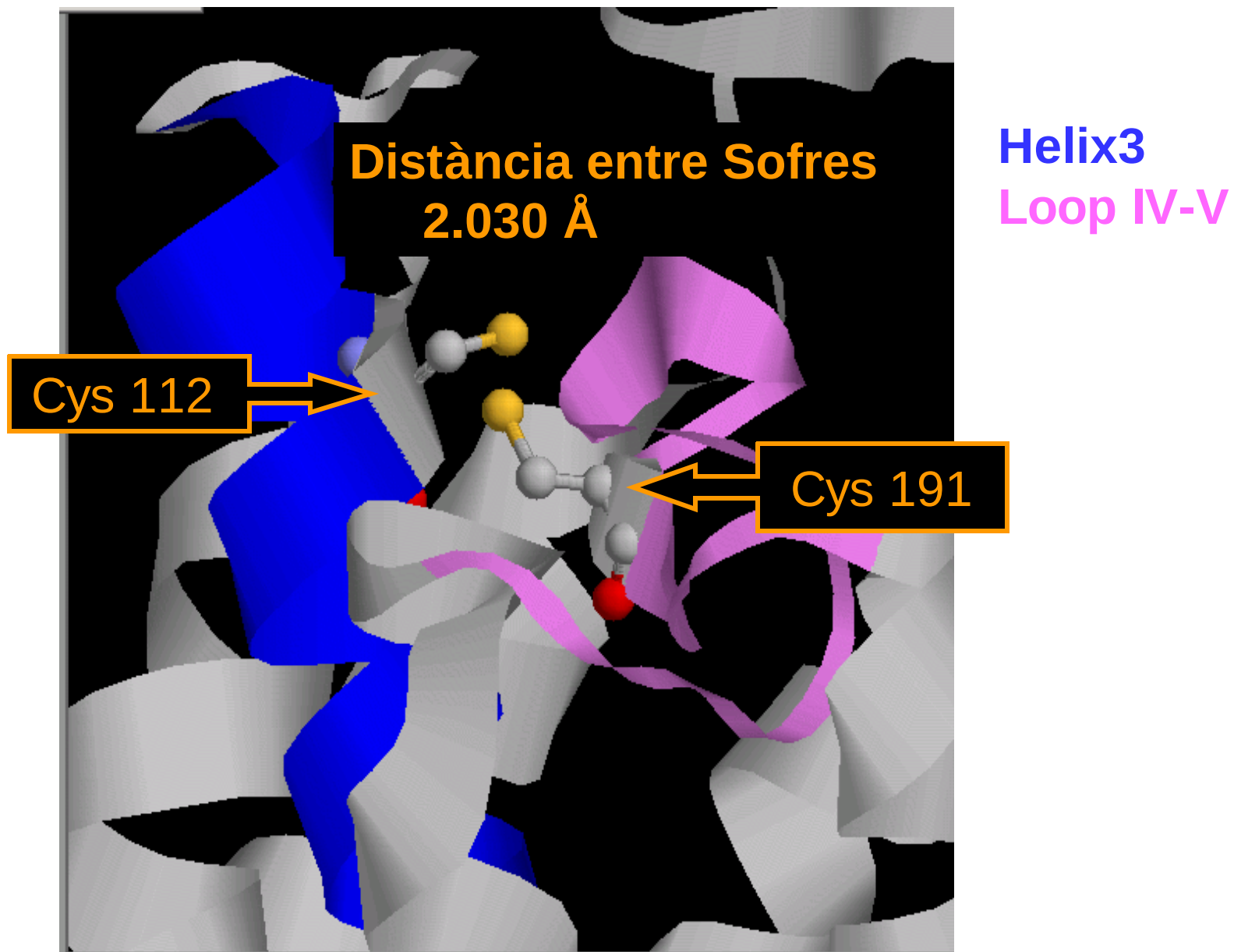


hmmlalign

```
home2c          VSVPIPVVI-G.....LRDEEKVFN---NTTCVLNDPNF-----
serhome2A       ISMPIPVFGL.....QDDSKVFK-----EGSCLLADDNF-----
serhome2B       IAIPVPIKGI.....ETDVDNPN-----NITCVLTKERFGD-----
ser2B_mouse     IAIPVPIKGI.....ETDVINPH-----NVTCELTCKDRFG-----
ser2A_MOUSE     ISMPIPVFGL.....QDDSKVFK-----EGSCLLADDNF-----
serporc7A       ITLPPLFG-W.....AQNVNDDK-----VCLISQDFG-----
rodopsina_vaca  CAAPPLVGWS.....RYIPEGM-----QCSCGIDYYTPH---EETNNE
h1R_HUMAN       WVIPI-LGWN.....HFMQQTSVRR---EDKCETDFYDVT-----
dAR_HUMAN       ISFIPVQLSW.....HKAKPTSPS-----DGNATSLAETIDNC-DSSLR
B2AR_HUMAN      TSFLPIQMHWyrathQEAINCYA-----NETCCDFFTNQA-----
A1AR_HUMAN      ISIGPLFG-W.....RQPAPED-----ETICQINEEPG-----
ACM3_HUMAN      LWAPAILF-W.....QYFVGKRT---VPPGECFIQFLSEP-----
CKR3_HUMAN      AALPEFIFYE.....TEELFEE-----TLCSALYPEDT---VYSWRH
IL8A_HUMAN      LSLPFFLFRQ.....AYHPNNS-----SPVCYEVLGNDT---AKWRM
CB1R_HUMAN      IAVLPLLGNW.....CEKLQSV-----CSDIFPHID-----
ML1A_HUMAN      AVLPN--LRA.....GTLQYDPR-----IYSCTFAQSVSS-----
#=GC RF        xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
```

Conservació del pont disulfur

PONT S-S DEL MODEL



CONSERVACIÓ d' AA en diferents 5HTR

Clustalw

Aa unió al lligand segons mutagènesi dirigida

```
home2C_ser      KLHNATNYFLMSLAIAADMLVGLLVMPVLSLLAILYDYVWPLPRYLCPVWISLDVLFSTASI
serhome2A       KLQNATNYFLMSLAIAADMLLGFLVMPVSMILTILYGYRWPLPSKLCVWIIYLDVLFSTASI
serhome2B       KLQYATNYFLMSLAIVADLLVGLFVMPIALLTIMFEAMWPLPLVLCPAWLFLDVLFSTASI
ser2B_mous      RLQYATNYFLMSLAIAADLLVGLFVMPIALLTIMFEAIWPLPLALCPAWLFLDVLFSTASI
ser2A_MOUSES    KLQNATNYFLMSLAIAADMLLGFLVMPVSMILTILYGYRWPLPSKLCVWIIYLDVLFSTASI
serporc7A       KLRQPSNYLIVSLALADLSVAVAVMPFVSVTDLIGGKWIFGHFFCNVFIAMDVMCCTASI
.*.  .** ..***.***. .  ***  ..  .  *  *  .  ***.  ****
```

//

```
home2C_ser      NNTTCVLNDP---NFVLIGSFVAFFIPLTIMVITYCLTIYVLRRCALMLLHGHTEEPGL
serhome2A       E-GSCLLADD---NFVLIGSFVSFFIPLTIMVITYFLTIKSLQKEATLCVSDLGTRAKLA
serhome2B       N-ITCVLTKERFGDFMLFGSLAAFFTPLAIMIVTYFLTIIHALQKKAAYLVKNKPPQRLTWL
ser2B_mous      N-VTCELTKDRFGSFMVFGSLAAFFVPLTIMVVTYFLTIIHTLQKKAAYLVKNKPPQRLTRW
ser2A_MOUSES    E-GSCLLADD---NFVLIGSFVAFFIPLTIMVITYFLTIKSLQKEATLCVSDLSTRAKLS
serporc7A       D-KVCLISQD--FGYTIYSTAVAFYIPMSVMLFMYQIYKAARKSAAKHKFPGFPREPD
* .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
```

//

```
home2C_ser      SKVLGIVFFVFLIMWCPFFIT-NILSVLCEKSCNQKLMKLLNVFVWIGYVCSGINPLVY
serhome2A       CKVLGIVFFLFLVVMWCPFFIT-NIMAVICKESCNEVDIGALLNVFVWIGYLSSAVNPLVY
serhome2B       SKVLGIVFFLFLIMWCPFFIT-NITLVLCDS-CNQTTLQMLLEIFVWIGYVSSGVNPLVY
ser2B_mous      SKALGVVFFLFLIMWCPFFIT-NLTALCDS-CNQTTLKTLLEIFVWIGYVSSGVNPLIY
ser2A_MOUSES    CKVLGIVFFLFLVVMWCPFFIT-NIMAVICKESCNEVDIGALLNVFVWIGYLSSAVNPLVY
serporc7A       ATTLGIIVGAFTVCWLPFFLLSTARPFICGTACSCIPLWVER-TFLWLGYANSLINPFIY
.  ***.  *  *  ***.  .  .  *  *  .  .  ***  *  ***.  *
```

I aquí hi ha feina per anys...

model elaborat per C.Dezi (CRG)

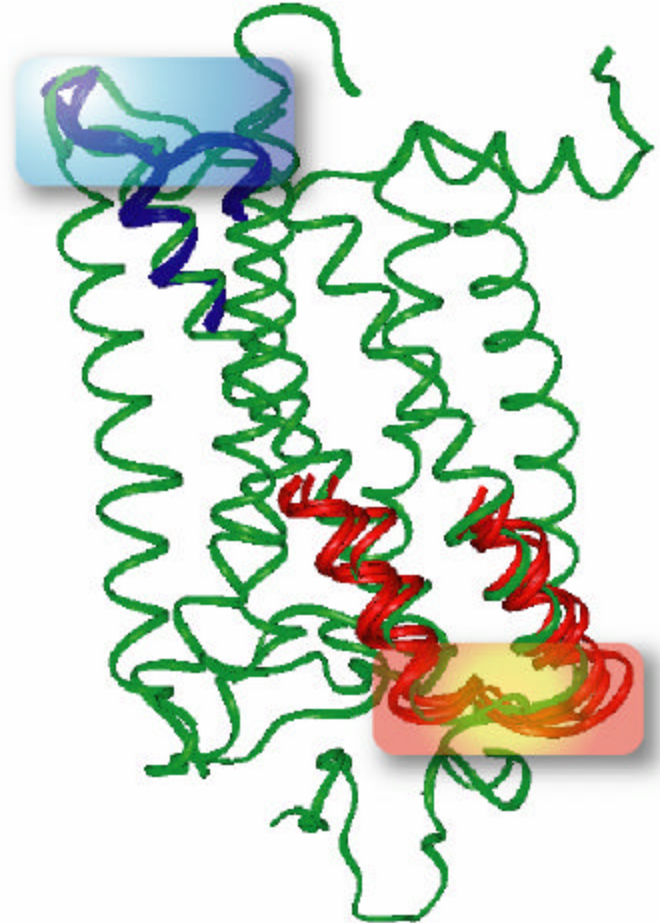
- ✓ 61 seq de 5HTR de partida i 50 models a Modeller
- ✓ Refinament manual de l'alineament per mantenir residus conservats
- ✓ Predicció: regions transmembrana amb 3 programes
(SWISS-Prot, TMAP i TMPred)
estructura secundària (Jpred)
- ✓ Loops: mantenir distància entre extrems d'hèlix semblants a rodopsina
i número de residus dels loops
- ✓ Xarxa de ponts d'H i orientació dels residus dels llocs actius, segons
dades de la literatura

COMPARACIÓ DELS MODELS

El nostre model



Model de C. Dezi



AGRAÏMENTS

Agraïm la col·laboració de Nuria B.
Centeno i Cristina Dezi

Bibliografia

- R. E. Stenkamp, D. C. Teller, and K. Palczewski: **Crystal Structure of Rhodopsin: A G-Protein-Coupled Receptor**. ChemBioChem 2002, 3, 963 – 967.
- Thomas P Sakamar: **Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same**. Current opinion in Cell Biology 2002, 14: 189 – 195.
- Janos K. Lanyi: **Bacteriorhodopsin**. Department of Physiology & Biophysics, University of California, Irvine, CA 92697-4560
- Elaine C Meng and Henry R Bourne: **Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us?** Trends in Pharmacological Sciences. Volume 22, Issue 11, 1 November 2001, pages 587 – 593.
- Sprang SR: **G protein mechanisms: insights from structural analysis**. Annu Rev Biochem 1997, 66:639-678
- Teller DC, Okada T, Behnke CA, Palczewski K, Stenkamp RE: **Advances in determination of high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)**. Biochemistry 2001, 40:7761-7772
- Joyce M Baldwin: **Structure and function of receptors coupled to G proteins**. Current Opinion in Cell Biology 1994, 6:180-190

Materials i mètodes

Materials

-PBDs utilitzats:

- . 1l9h (rodopsina)
- . 1bm1 (bacteriorodopsina)

-Seqüència del receptor de serotonina:

- . AAH69356 (NCBI)

Mètodes

-RasMol -Procheck

-SplitChain -HMMER

-Stamp

-TMHMM

-Modeller

Comandes

-RasMol:

RasMol> select *Y	}	Selecció de la cadena que no interessa i eliminació
RasMol> backbone off		
RasMol> select retX	}	Selecció del cromòfor (retinal) i colorejat
RasMol> color xxxxx		
RasMol> select nnnX- <i>nnnX</i>	}	Selecció d'interval de residus pertanyents a la cadena d'interés i colorejat
RasMol> color xxxxx		
RasMol> select hydrophobic	}	Selecció de residus hidrofòbics de la cadena d'interés i colorejat
RasMol> color xxxx		
RasMol> select polar	}	Selecció de residus polars de la cadena d'interés i colorejat
RasMol> color xxxx		
RasMol> select nnnX, <i>nnnX</i>	}	Selecció de residus involucrats en un pont disulfur
RasMol> ssbonds		

nnnn = nombre ; X,Y = cadena; xxxx = qualsevol color

-Stamp:

Fitxer d'entrada:

```
pdhc -d 1l9hA.pdb > rodopsina.domains
```

```
pdhc -d 1bm1.pdb >> rodopsina.domains
```

Stamp: stamp -l rodopsina.domains -rough -n 2 - prefix rodopsina

Aconvert: aconvert -in b -out c < rodopsina.2> rodospina2.clw

Transform: transform -f rodopsina.2 -g -o rodopsina2.pdb