

# Percepção da Luz: dos Microrganismos à Visão Humana

Suely Lopes Gomes

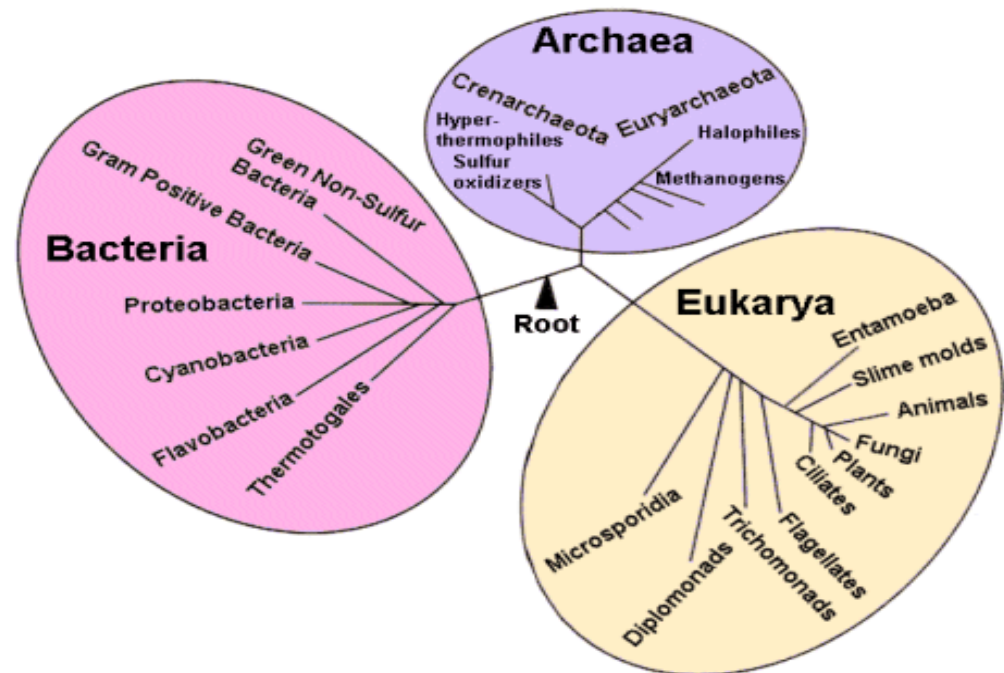
Instituto de Química  
Universidade de São Paulo

# A luz solar é essencial para a vida na terra tanto pela energia calorífica como pela energia luminosa

- A luz é um dos mais importantes sinais que fornecem informação crítica para os sistemas biológicos.
- A capacidade de detectar a luz e de utilizá-la para obter energia confere considerável vantagem aos organismos fotossintéticos.
- Mesmo organismos que não realizam fotossíntese são capazes de perceber a luz, p.e., aqueles capazes de se movimentar em resposta a este sinal (fototaxia), e podendo garantir assim sua sobrevivência ao alcançar ambientes mais apropriados ao seu crescimento.
- Para detectar a luz os organismos vivos possuem várias moléculas fotorreceptoras como fitocromos, criptocromos, xantopsinas, rodopsinas, que são todas elas proteínas sensíveis à luz de diferentes comprimentos de onda.

# Rodopsinas estão entre as mais importantes classes de proteínas sensíveis à luz

Rodopsinas são proteínas fotorreceptoras que podem ser encontradas nos 3 grandes domínios dos seres vivos: **Bactérias, Archaeas e Eucariotos**, onde exercem diversas funções. São classificadas como **microbianas (Tipo I)** ou **animais (Tipo II)**. Apresentam alta **homologia estrutural**, porém **baixa similaridade na sequência de aminoácidos**.

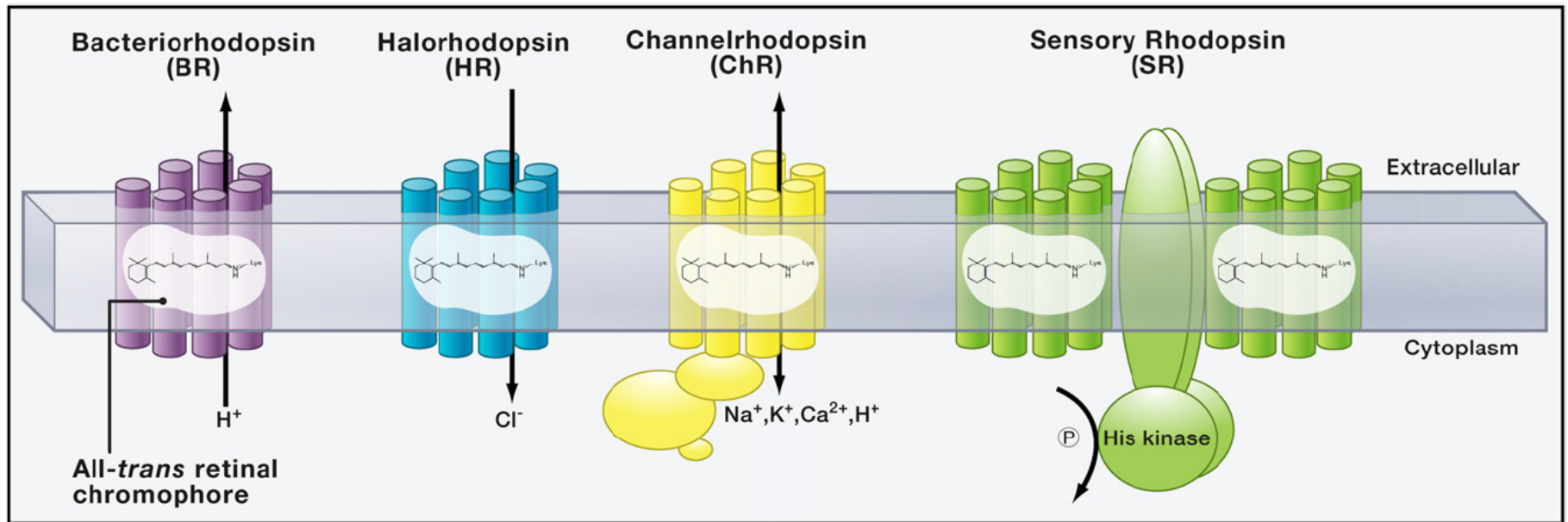


# Rodopsinas

- **Rodopsinas** possuem **7 alfa-hélices transmembrana** e contêm o **cromóforo retinal** (aldeído da vitamina A). O retinal sofre **isomerização** na presença da **luz** provocando mudança **conformacional da Rodopsina**.
- Muitos **procariotos** (bactérias e archaeas) empregam **Rodopsinas** para controlar **gradientes de prótons** e manter o **potencial de membrana** e a **homeostase iônica**.
- Vários **microrganismos** que apresentam **motilidade** possuem **Rodopsinas fotorreceptoras (Tipo I)**, que em resposta à luz modulam, p.e., o batimento do **flagelo** ou a **motilidade por deslizamento** e produzem uma resposta denominada de **fototaxia**.
- A importância da **Rodopsina** também está associada ao seu papel na **visão de vertebrados**, que utilizam a **Rodopsina Tipo II** como fotorreceptor, como veremos a seguir.



# Muitas Rodopsinas microbianas (Tipo I) atuam como canais iônicos: ChR (1 e 2) atuam como canais de cátions e são responsáveis pela fototaxia na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*



**Figure 1. Type I Microbial Rhodopsins**

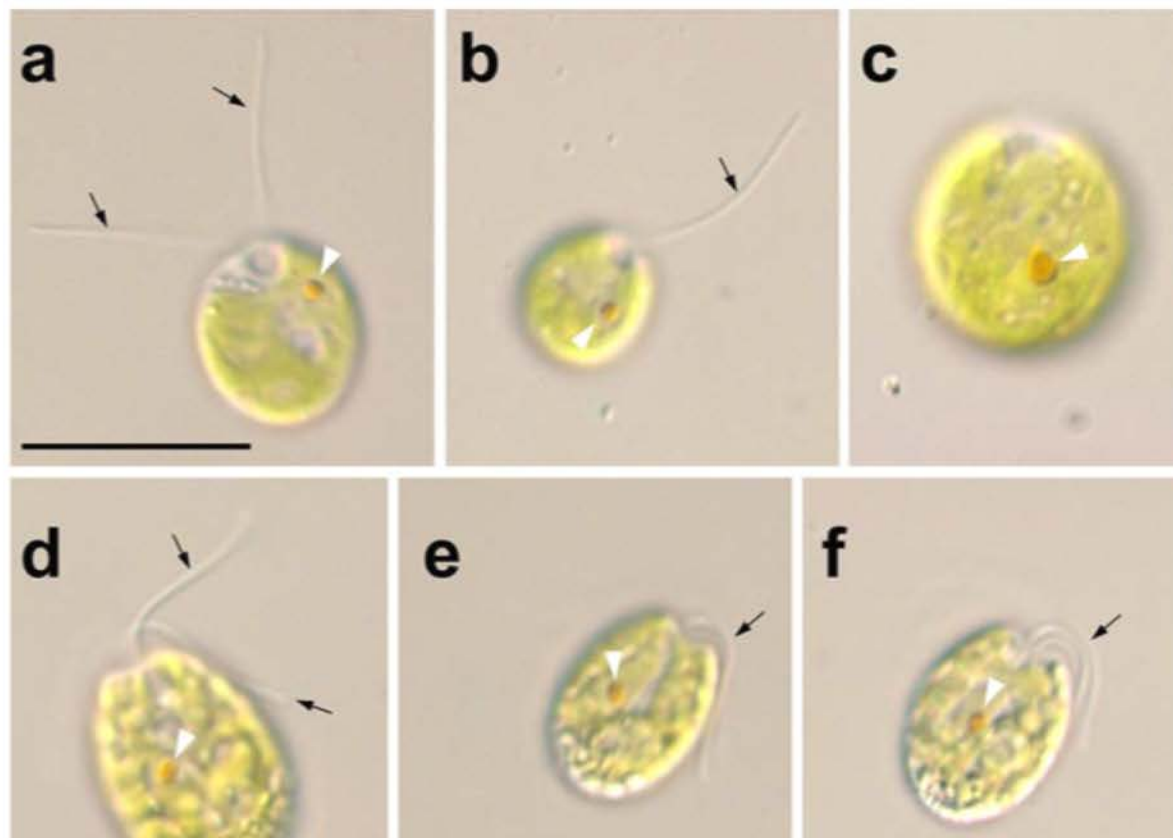
BR (and PRs) pump protons from the cytoplasm to the extracellular medium, and HRs pump chloride into the cytoplasm; all three hyperpolarize the cell. SRs lack TM ion transport in the presence of the His kinase transducer protein Htr; and algal ChRs conduct cations across the membrane in both directions but always along the electrochemical gradient of the transported ions. In SRs and ChRs, proton translocation within the protein is linked to efficient photocycle progression, but these protons are not necessarily exchanged between the intra- and extracellular spaces.

# Eyespot da alga verde *Chlamydomonas*: estrutura que contém glóbulos de lipídeos ricos em carotenóides, onde se localizam as rodopsinas ChR1 e ChR2

22

Curr Genet (2009) 55:19–43

**Fig. 1** Differential contrast images of some freshwater and marine green algae demonstrating appearance and position of the eyespot. (a–c) *Chlamydomonas reinhardtii* wt 137c mt<sup>+</sup>, (d–f) *Tetraselmis astigmatica*, (g–i) *Dunaliella bioculata*, and (j–m) *Spermatozopsis similis*. Figure l and m show predivision cells of *S. similis*, which have already formed a second eyespot near the posterior end of the chloroplast. Note that in (m) chloroplast division has already started. White arrow heads point to the eyespot, black arrows to the flagella, and black arrow-heads to the nucleus. Scale bar 10  $\mu$ m

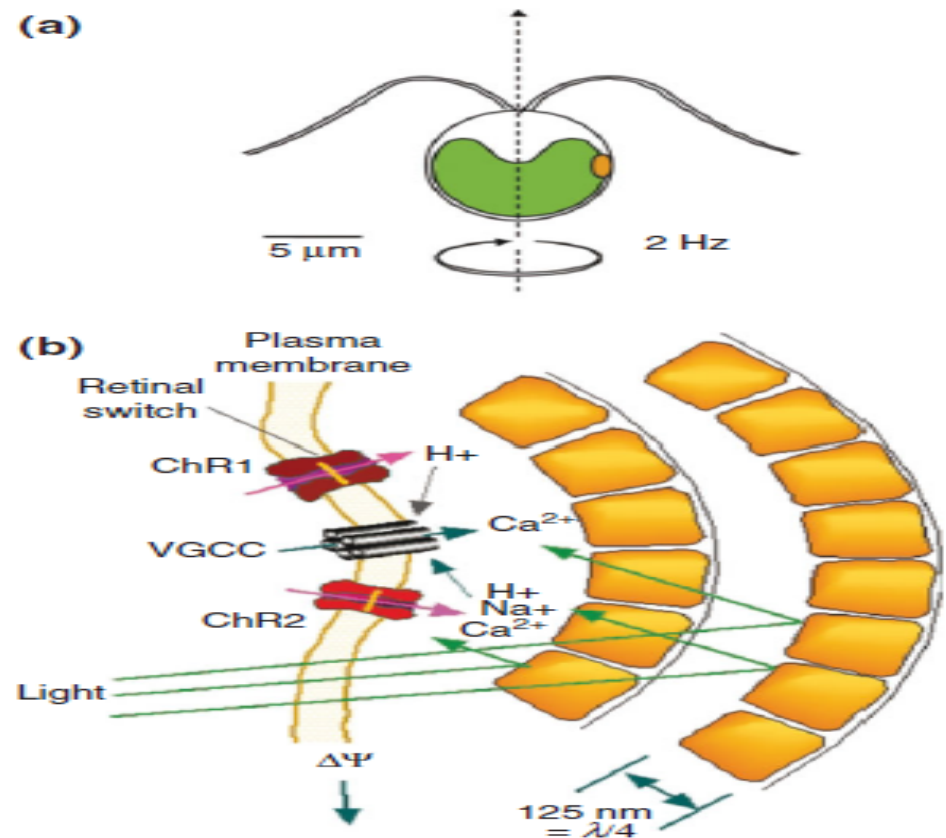


O eyespot (olho primitivo) localiza-se no cloroplasto da alga verde



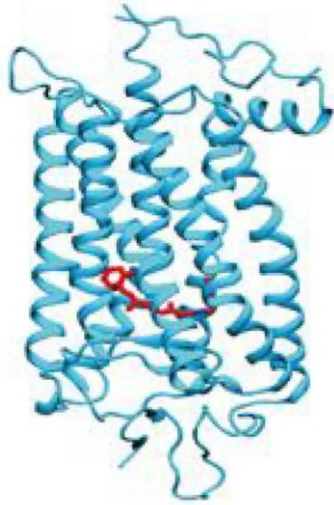
# Eyespot de *Chlamydomonas*

Os **fótons** de luz entram no **eyespot** e se difundem lateralmente refletidos pelos **carotenóides**, ativando ChR1 e ChR2 e provocando um **influxo de cálcio** que induz mudanças no **batimento do flagelo**, o que leva ao movimento da alga em direção à luz (**fototaxia**).

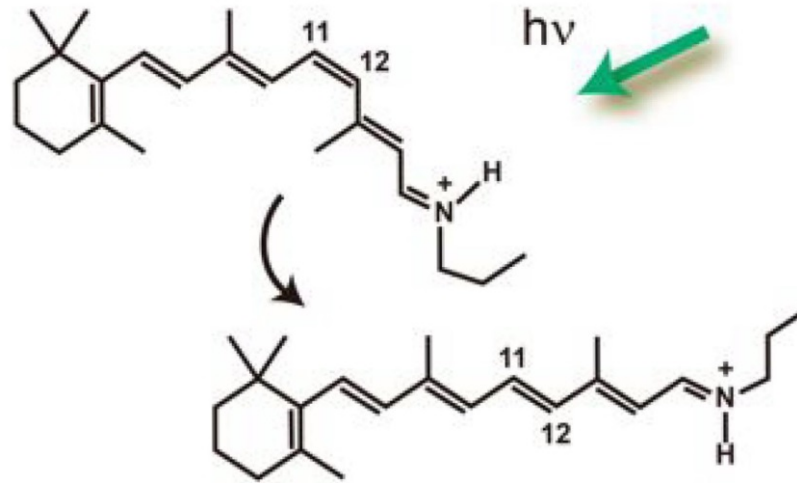


**FIGURE 2 |** The eyespot of *Chlamydomonas*. (a) A *Chlamydomonas* cell with two flagella, a large green chloroplast and a yellow-orange eyespot (eye organelle). (b) Function of the eyespot, Channelrhodopsin 1 (ChR1) is a light-gated proton channel located in the plasma membrane above the pigment spot. The entering protons diffuse laterally and activate a voltage or proton-gated  $\text{Ca}^{++}$  channel (NGCC). Channelrhodopsin 2 (ChR2) is conductive for  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{++}$ . The voltage change  $\Delta\Psi$  is transmitted along the membrane and sensed by the VGCC channels in the flagellar membrane. A sudden  $\text{Ca}$  influx induces a switch of flagellar motion. The carotene reflects the light to activate the ChRs.<sup>54</sup> (Reprinted with permission from Ref 54. Copyright 2004 American Physiological Society)





**Rodopsina**

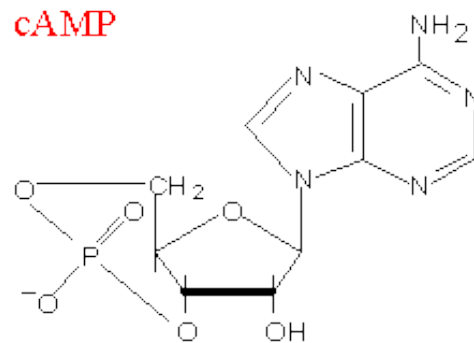


**Retinal**

No caso da **visão de vertebrados**, a **luz** dispara a **isomerização do retinal** (11-*cis* retinal a all-*trans* retinal) provocando **mudanças conformacionais** na **Rodopsina**, iniciando uma série de **interações proteína-proteína** que disparam uma **cascata de sinalização**, que envolve o segundo mensageiro **GMP cíclico (cGMP)**

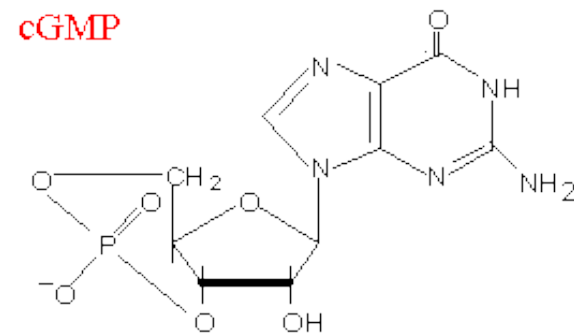
# Nucleotídeos cíclicos (segundos mensageiros)

Adenilato ciclase  
(ATP)



3'-5' monofosfato cíclico de adenosina

Guanilato ciclase  
(GTP)

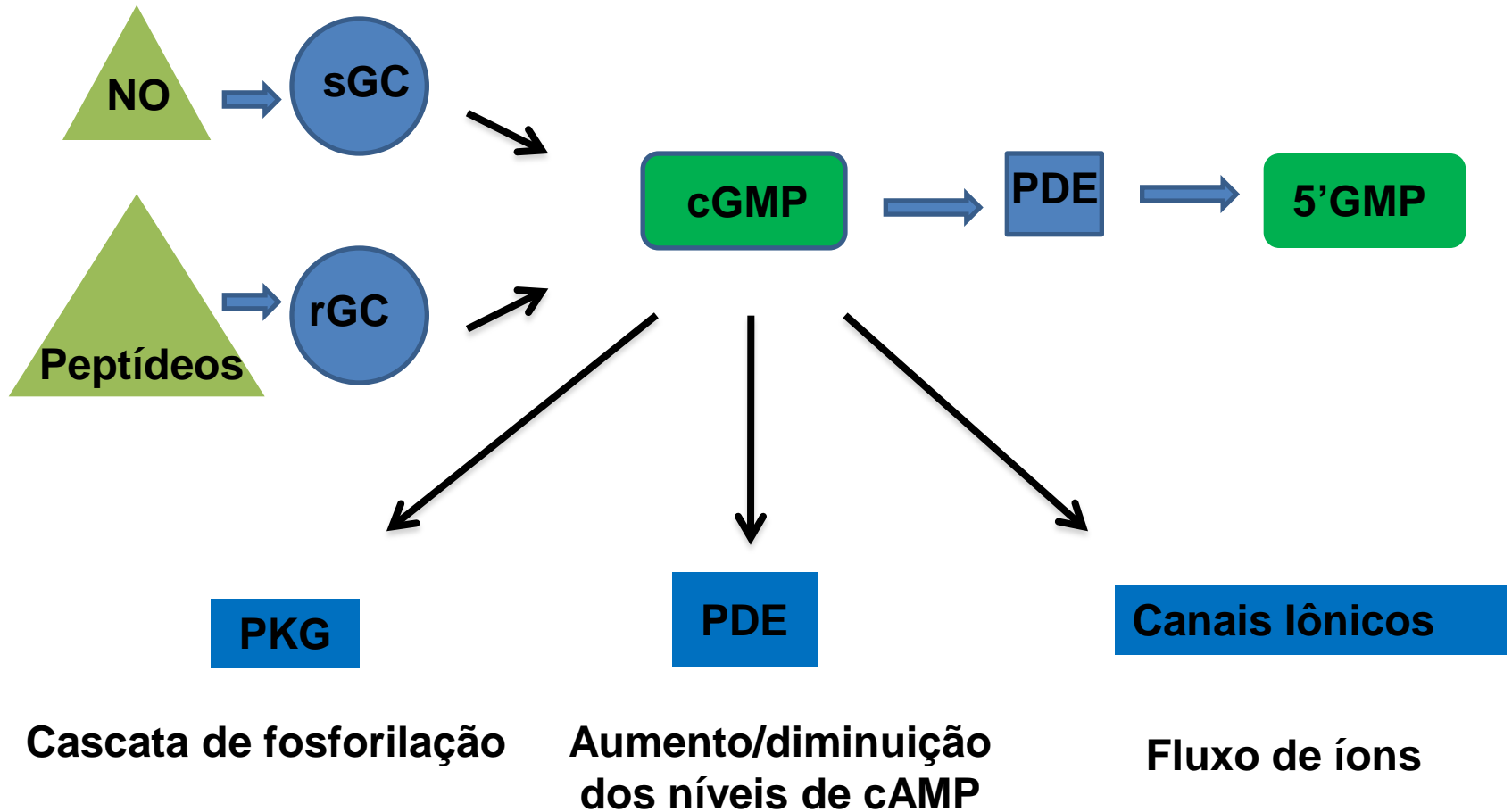


3'-5' monofosfato cíclico de guanosina

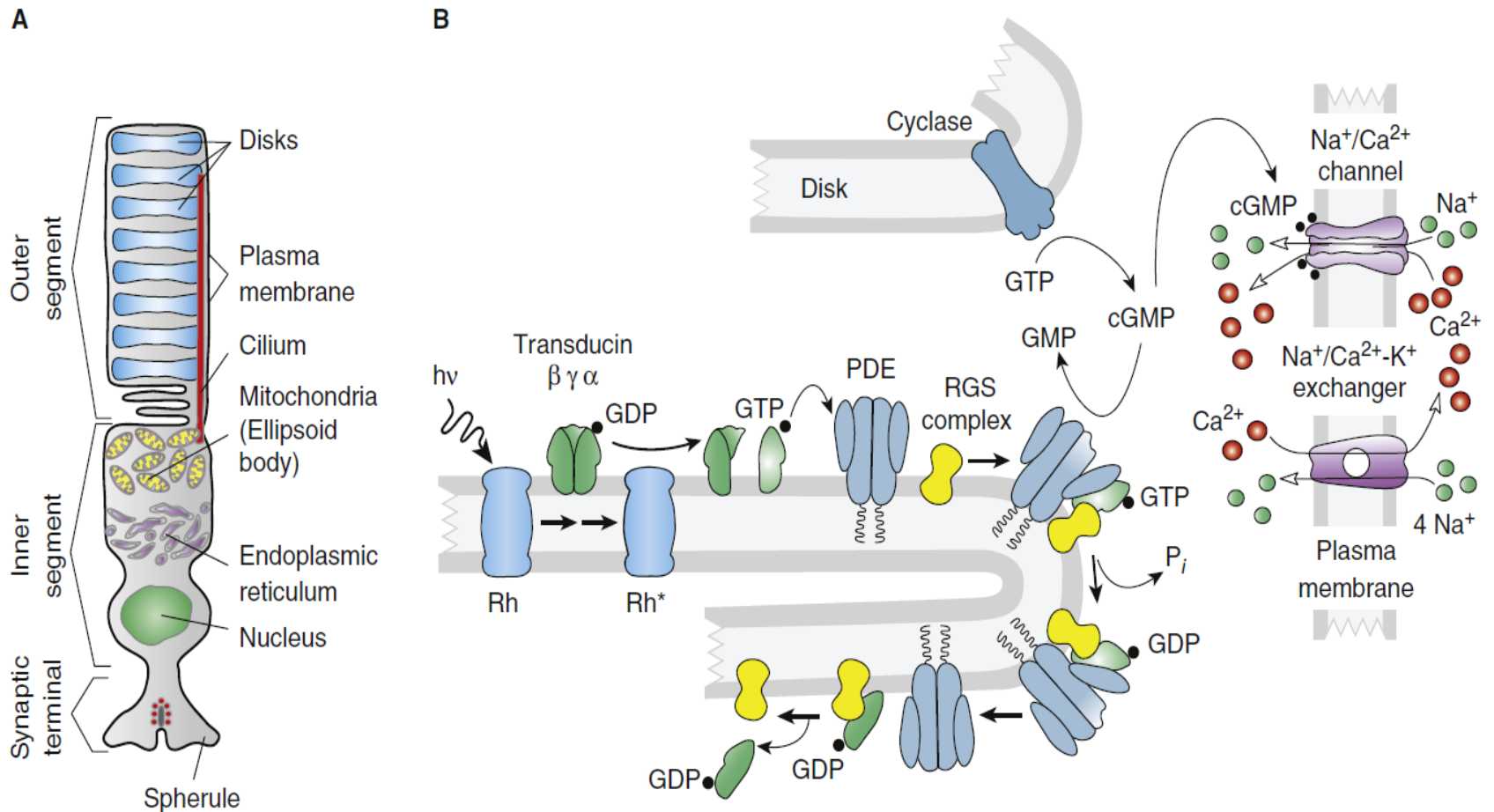
2º. mensageiro dos hormônios glucagon e adrenalina: age no metabolismo de glicogênio e lipídeos ativando a proteína quinase dependente de cAMP (PKA)

# Sinalização por cGMP em vertebrados

Visão, Olfato, Contração muscular, Homeostase de eletrólitos, Função cardiovascular e neuronal



# Via de foto-transdução em bastonetes da retina de vertebrados durante o processo de visão

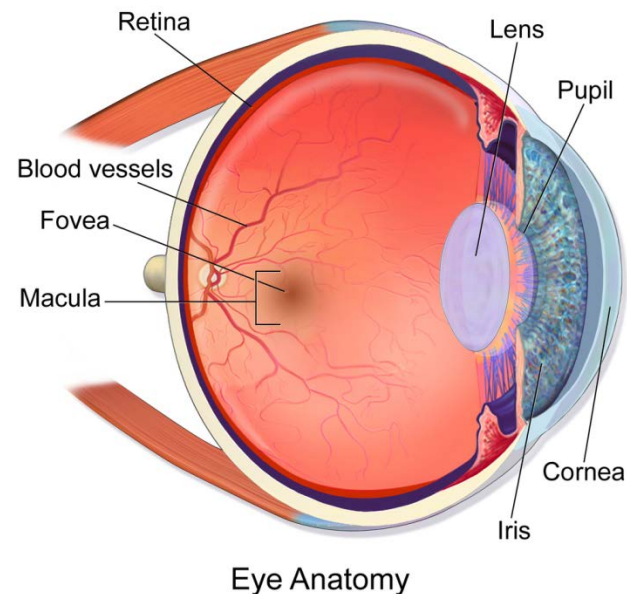


Current Biology

Figure 4. The vertebrate rod.

(A) Schematic anatomy of representative vertebrate rod. (B) Major proteins and mechanisms in vertebrate rod transduction. Abbreviations:  $h\nu$ , light; Rh\*, activated form of the photopigment rhodopsin; GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; cGMP, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate; GMP, guanosine monophosphate; PDE, guanosine nucleotide phosphodiesterase; RK, rhodopsin kinase; RGS complex, group of three proteins including RGS9 which accelerate the hydrolysis of GTP by the alpha subunit of transducin; and  $P_i$ , inorganic phosphate.

No processo de **visão** do **olho humano**: os **bastonetes** da **retina** recebem o **feixe de luz** que a **córnea** focaliza através das **lentes internas do olho**. A **ativação da Rodopsina** pela **luz** provoca a **queda** nos **níveis de cGMP**, inativando os **canais iônicos** e causando **hiperpolarização** da membrana o que gera **impulsos elétricos** que são carregados pelo **nervo ótico** ao **cérebro** gerando a **imagem**.

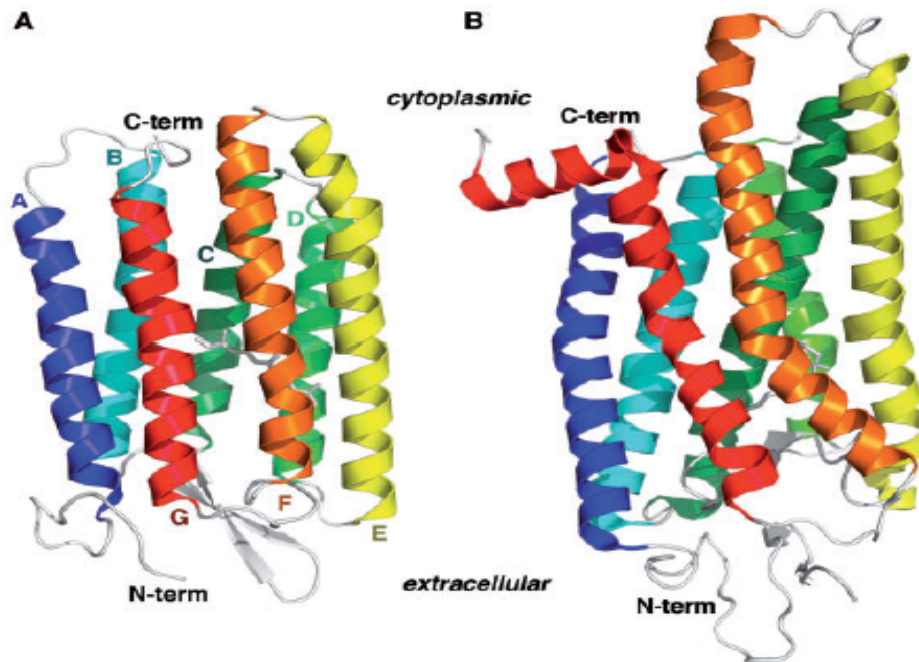


# O processo da visão dos animais pode ter sua origem na fototaxia dos microrganismos?

- Rodopsinas Tipo I e Tipo II têm uma origem comum ou tiveram uma evolução convergente?
- A estrutura de 7 hélices transmembrana e a ligação do cromóforo retinal pode ter ocorrido na natureza duas vezes (Tipo I e Tipo II) de forma independente?
- Tanto a hipótese de uma origem comum como da evolução convergente tem seus defensores!

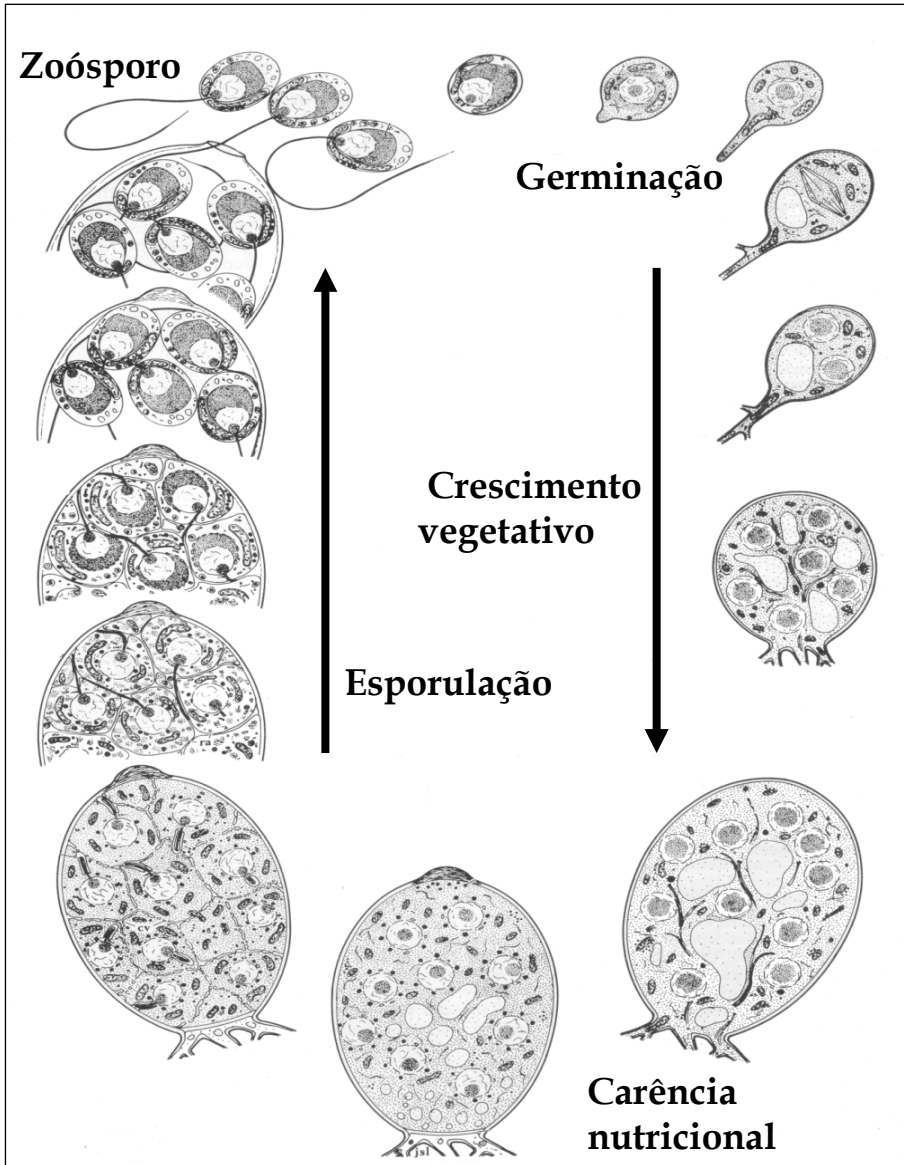


A alta conservação da estrutura de 7 alfa-helices e a ligação do retinal numa lisina da hélice 7 nas rodopsinas Tipo I e Tipo II, contrasta com a baixa conservação da sequencia de aminoácidos. A conservação da estrutura 3-D seria essencial para a capacidade de responder à luz? Uma estrutura tão complexa poderia ter surgido de forma independente 2 vezes na natureza (Tipo I e Tipo II)?

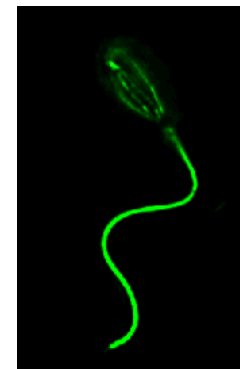


**FIG. 1.** Type I and type II rhodopsin fold architecture. The protein chains are colored blue to red proceeding from the N-terminus to the C-terminus. The seven transmembrane helices are labeled alphabetically from A to G. The covalently bound retinal chromophore is depicted as white sticks in the center of each protein. (A) *Halobacterium salinarum* bacteriorhodopsin (PDBID: 1UAZ). (B) Bovine rhodopsin (PDBID: 3C9L). See also supplementary table S1, Supplementary Material online.

# Ciclo de vida do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*

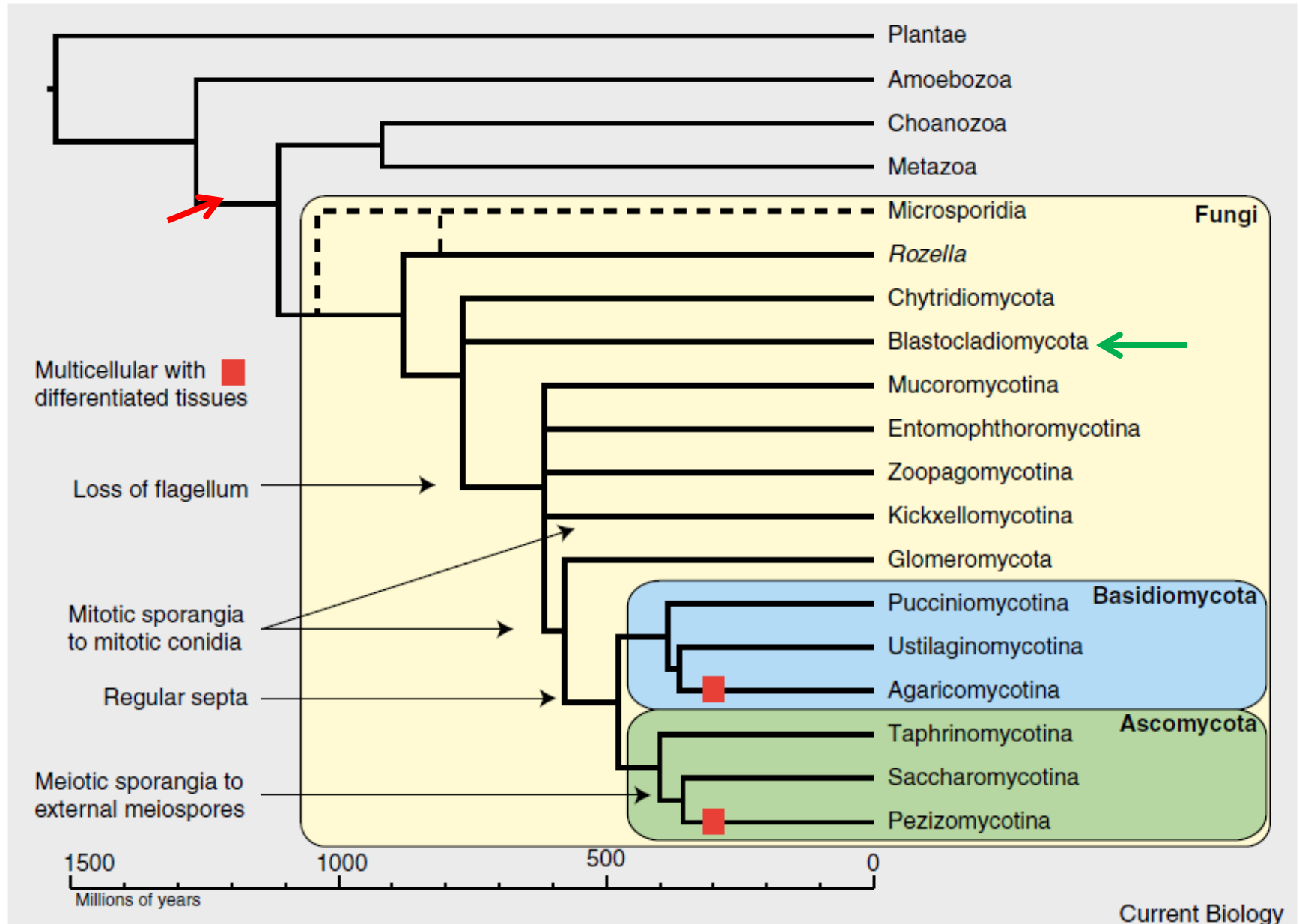


Zoosporangios liberando zoósporos



Microscopia de fluorescência de um Zoósporo marcado com anticorpo anti-tubulina

# Árvore filogenética mostrando a posição do filo Blastocladiomycota

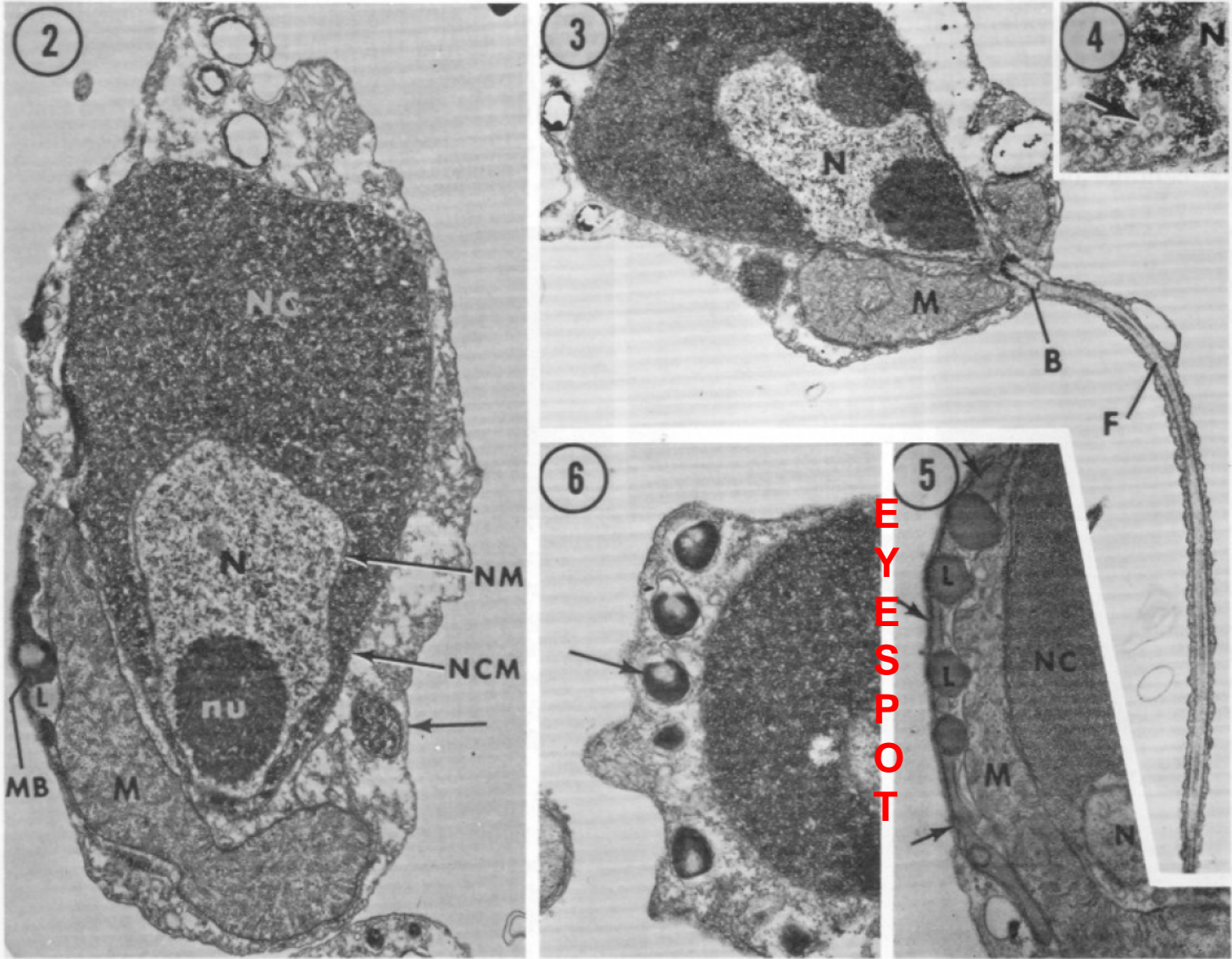


Na base da árvore dos fungos, próximo à separação entre fungos, plantas e animais

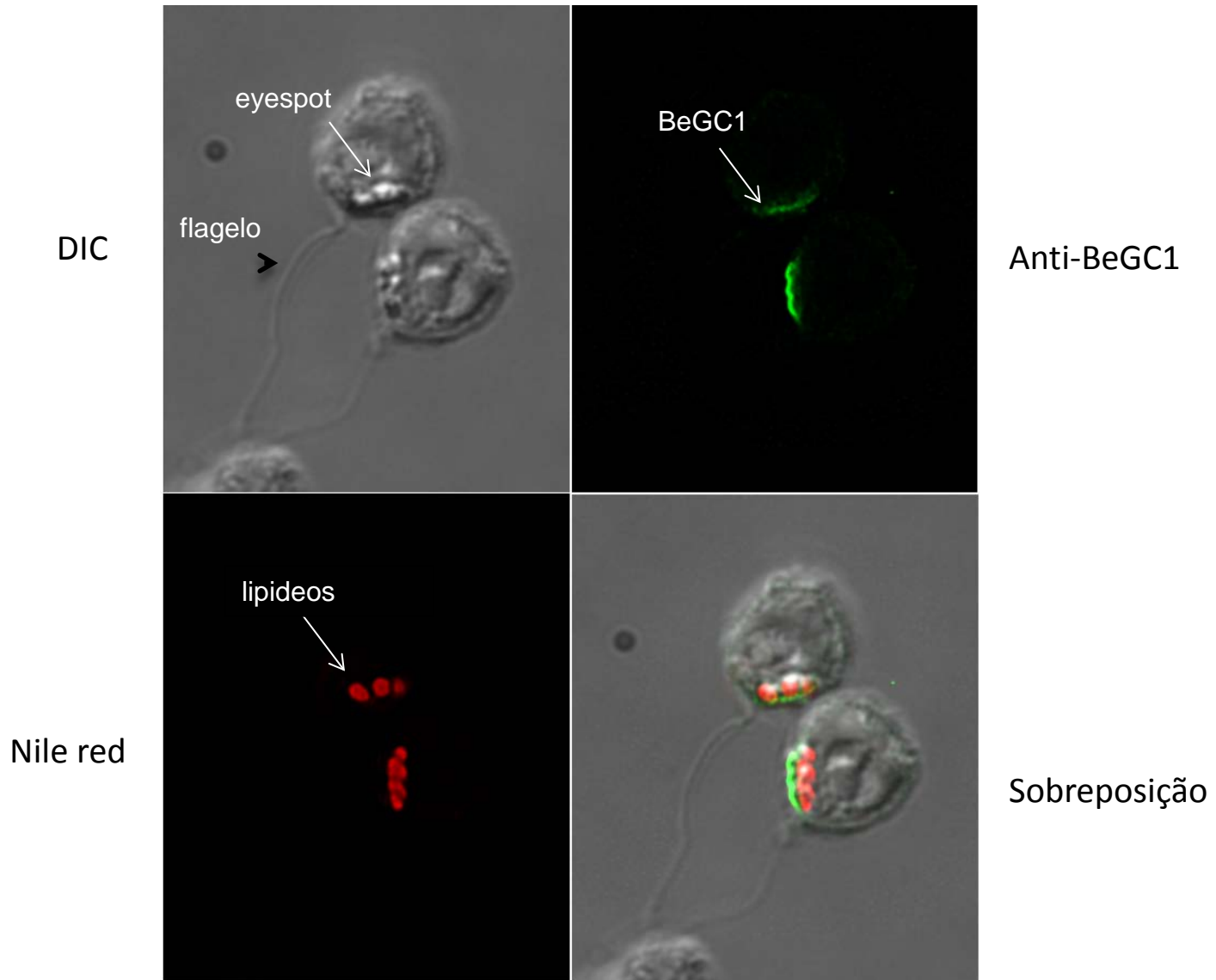




**Ultraestrutura do Zoósporo de *B. emersonii* mostra a presença do 'eyespot'**

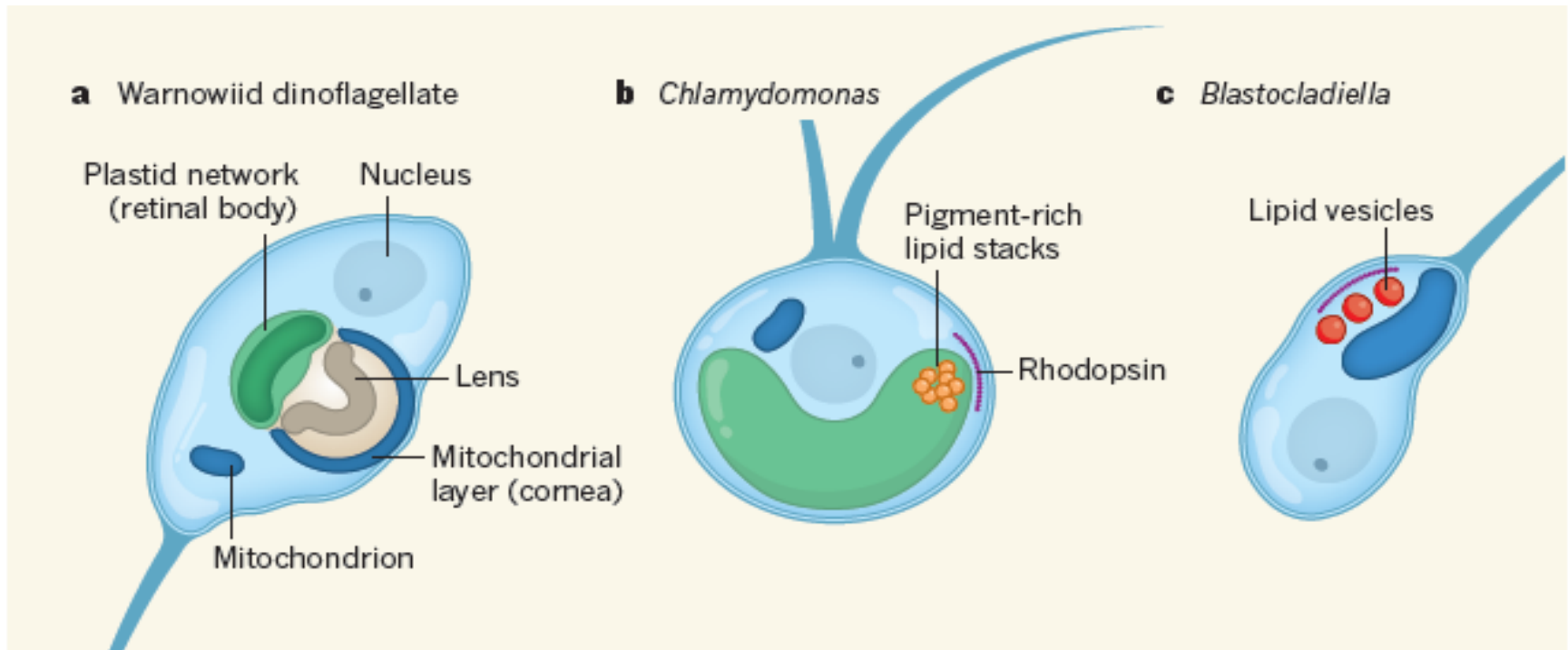


# BeGC1 (Rodopsina-Guanilato ciclase) foi imunolocalizada no “eyespot” do zoósporo de *Blastocladiella*





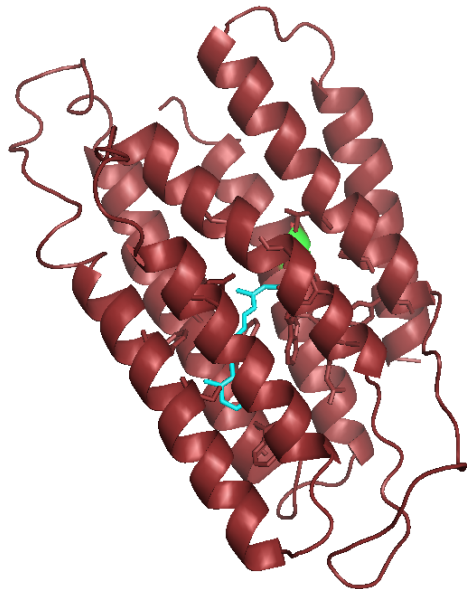
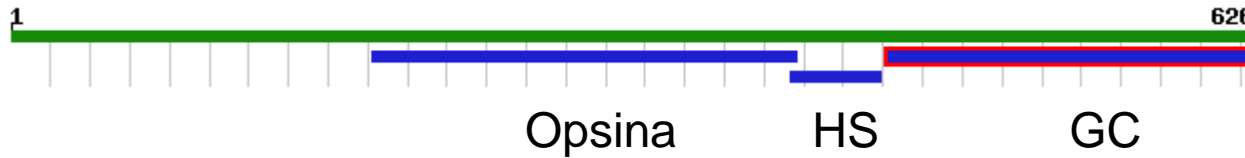
# How to build a microbial eye



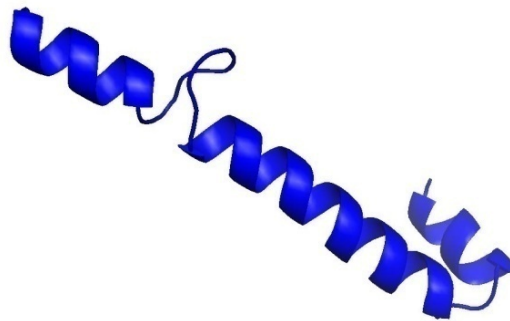
**Figure 1 | Eyes across the tree of life.** **a**, The eye-like ocelloids found in unicellular organisms known as warnowiid dinoflagellates have a 'camera-like' complexity that resembles that of animal eyes. Gavelis *et al.*<sup>4</sup> show that two of these components in warnowiids have arisen through the reconfiguration of membrane-bound organelles that are usually used for cellular energy transformation: the cornea is formed from a layer of mitochondria and the retinal body is derived from a network of plastids. **b, c**, Microorganisms from other branches of the tree of life also contain eye-like structures, although these are anatomically simpler. **b**, The eyespots of *Chlamydomonas* algae comprise stacks of pigment-rich lipid molecules, located inside the cell's plastid, which shades light from one side of light-sensitive rhodopsin proteins. **c**, The eyespots of *Blastocладиella* fungi are lipid-filled vesicles close to the cell's main mitochondrion that are overlaid with rhodopsin proteins.

# Modelagem tridimensional da BeGC1

## Modelagem por homologia (SWISS-MODEL)



Rodopsina  
(214 aa)

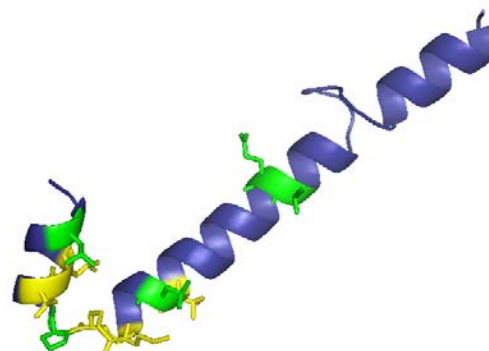
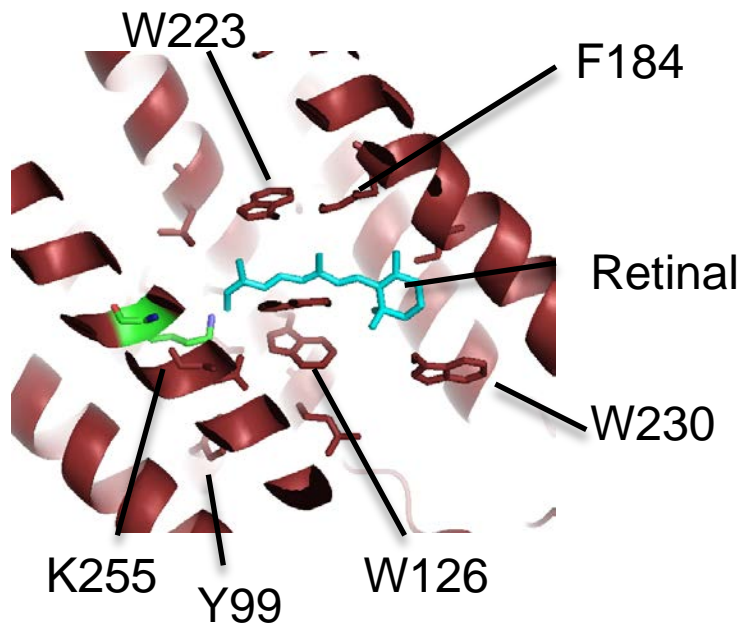


Hélice de sinalização  
ou S-helix  
(72 aa)



Guanilato ciclase  
(183 aa)

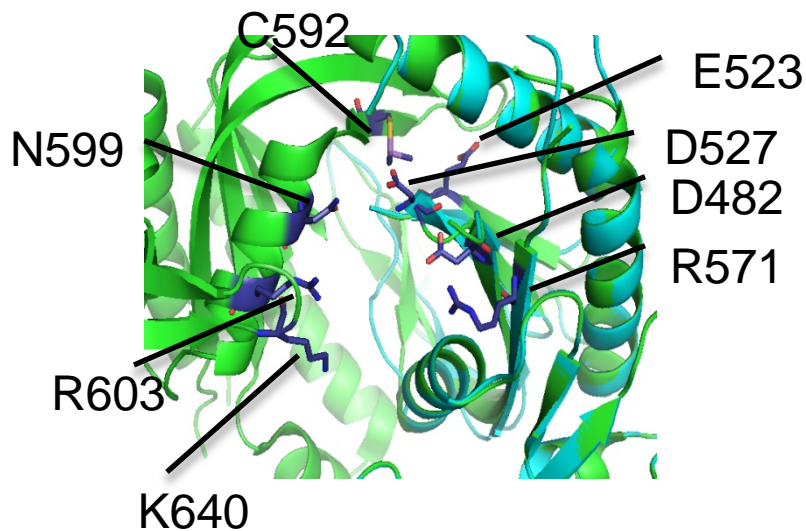
# Alinhamento da estrutura dos domínios de BeGC1



Modelada a partir da hélice de sinalização da subunidade beta1 da guanilato ciclase solúvel *Rattus norvegicus* (PDB ID: 3hslA)

Sequence Identity [%]: 23.64  
Evalue: 3.50e-40

Modelada a partir da bacteriorodopsina de *Halobacterium salinarum* (PDB ID: 1cwqB)

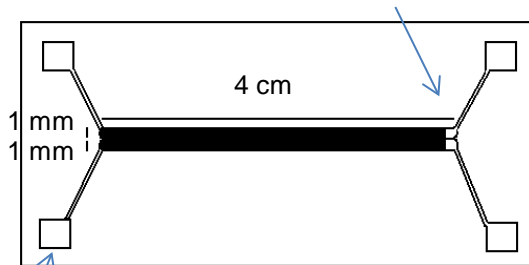


Modelada a partir do domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB ID: 3ET6)

Sequence Identity [%]: 41.08  
Evalue: 2.60e-39

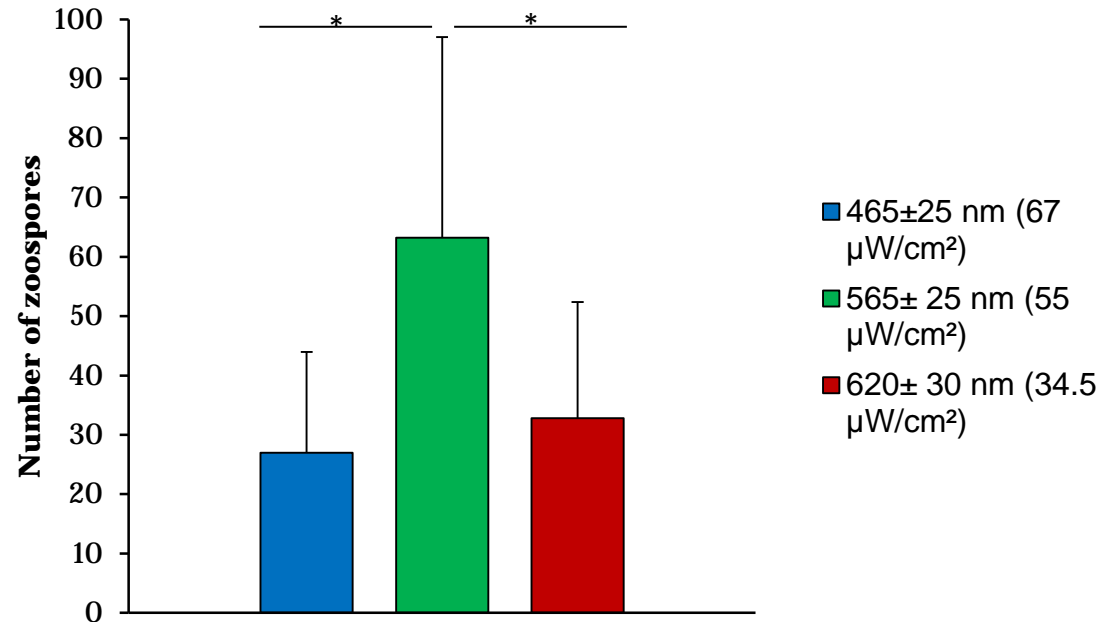
# Fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* é máxima na região da luz verde

Luz é incidida e os zoósporos são contados.

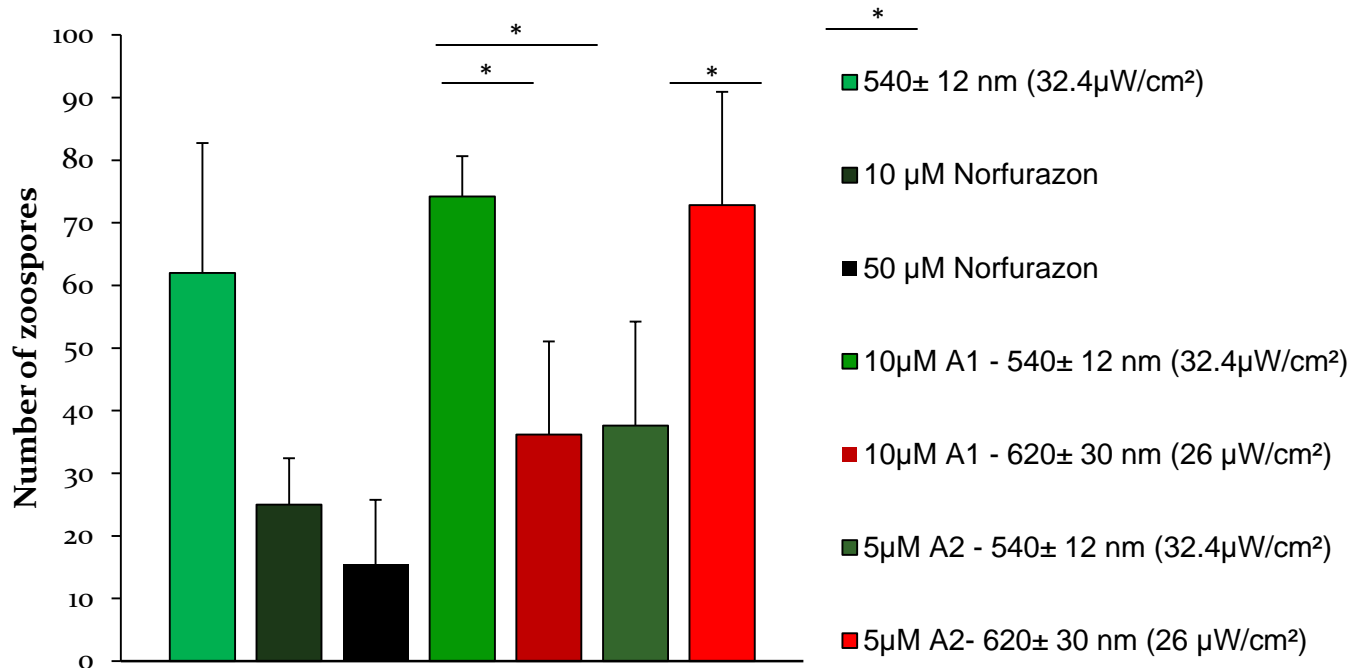


Local onde os zoósporos são inoculados.

Câmara de microfluídica



# Fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* é dependente de retinal (rodopsina)

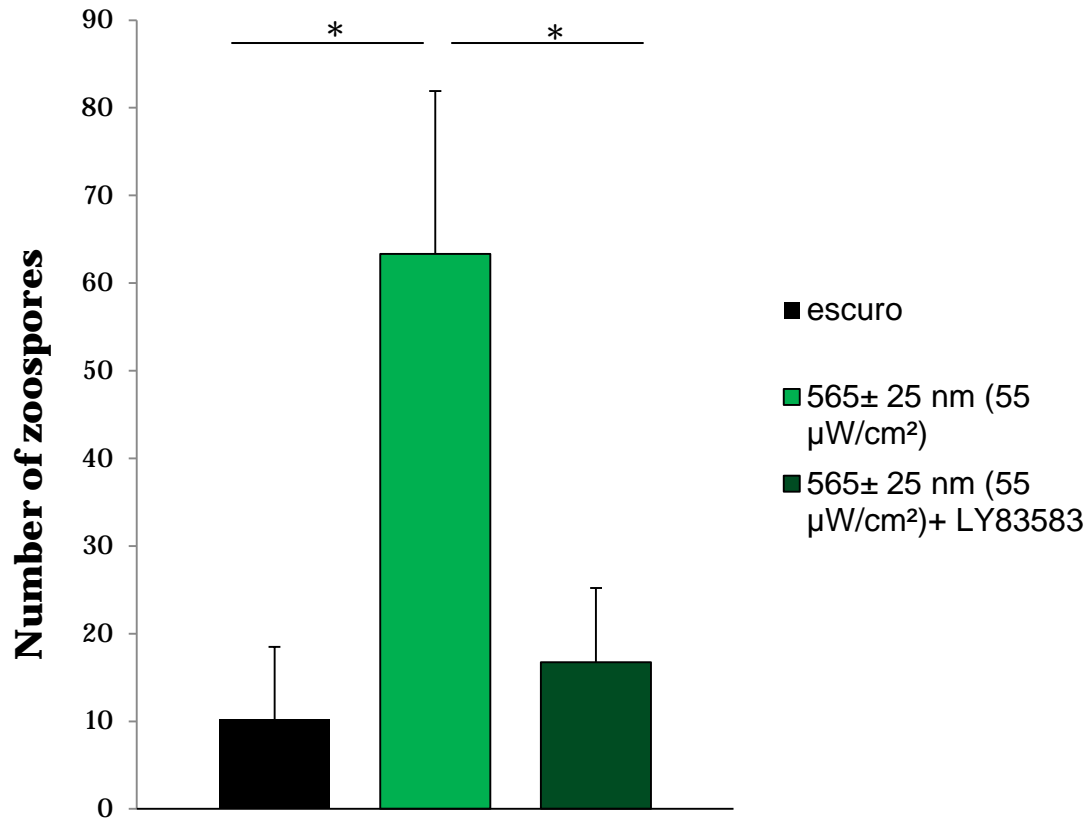


Nfz - Norflurazon: inibidor da síntese de carotenoides (precursores do retinal)

A1: retinal A1 (máximo de absorção no verde)

A2: retinal A2 (máximo de absorção no vermelho)

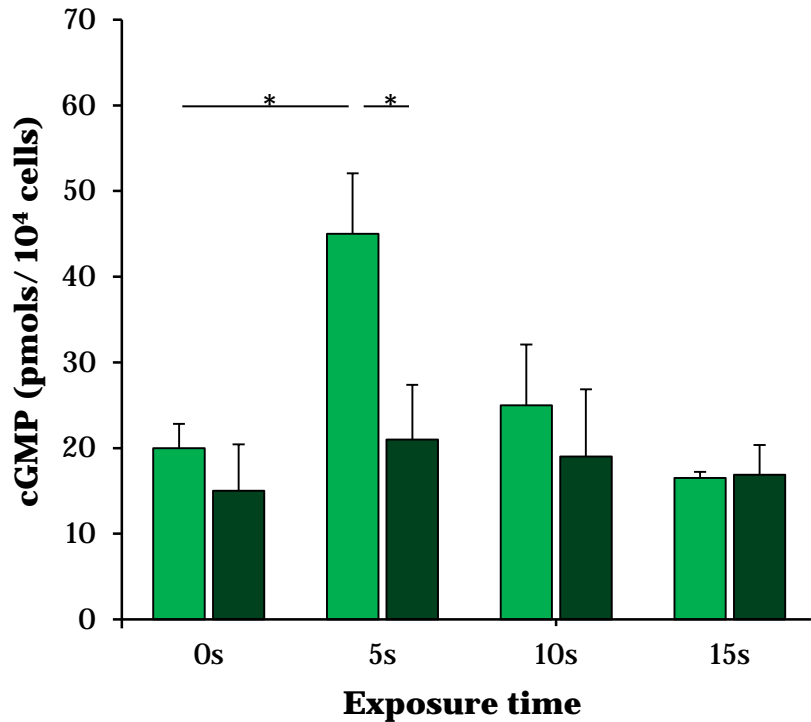
# Fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* é dependente da atividade de guanilato ciclase



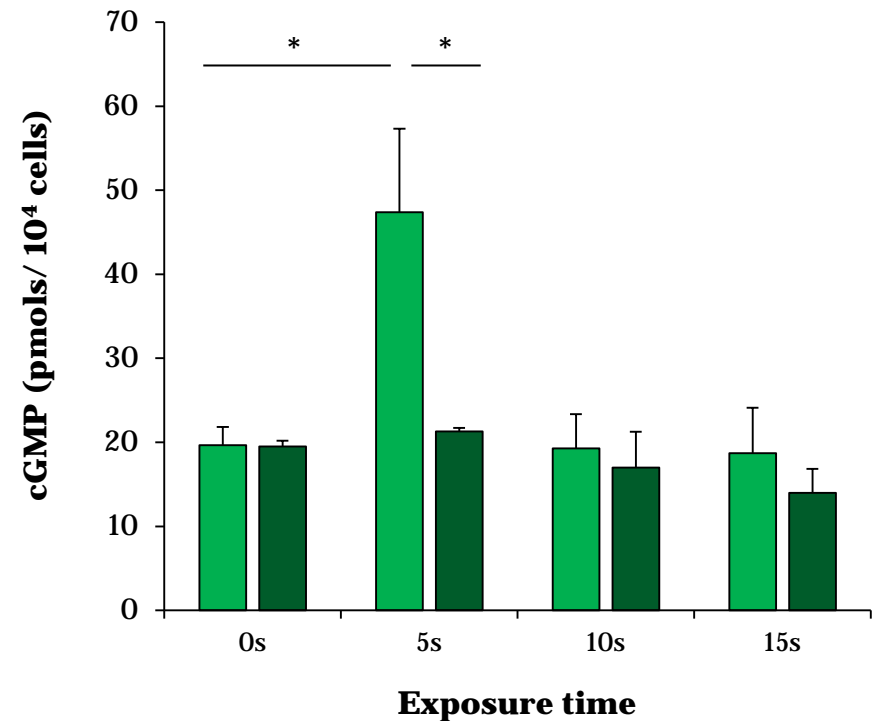
LY83583: inibidor de GC



# Ativação da guanilato ciclase durante a exposição à luz é dependente de rodopsina

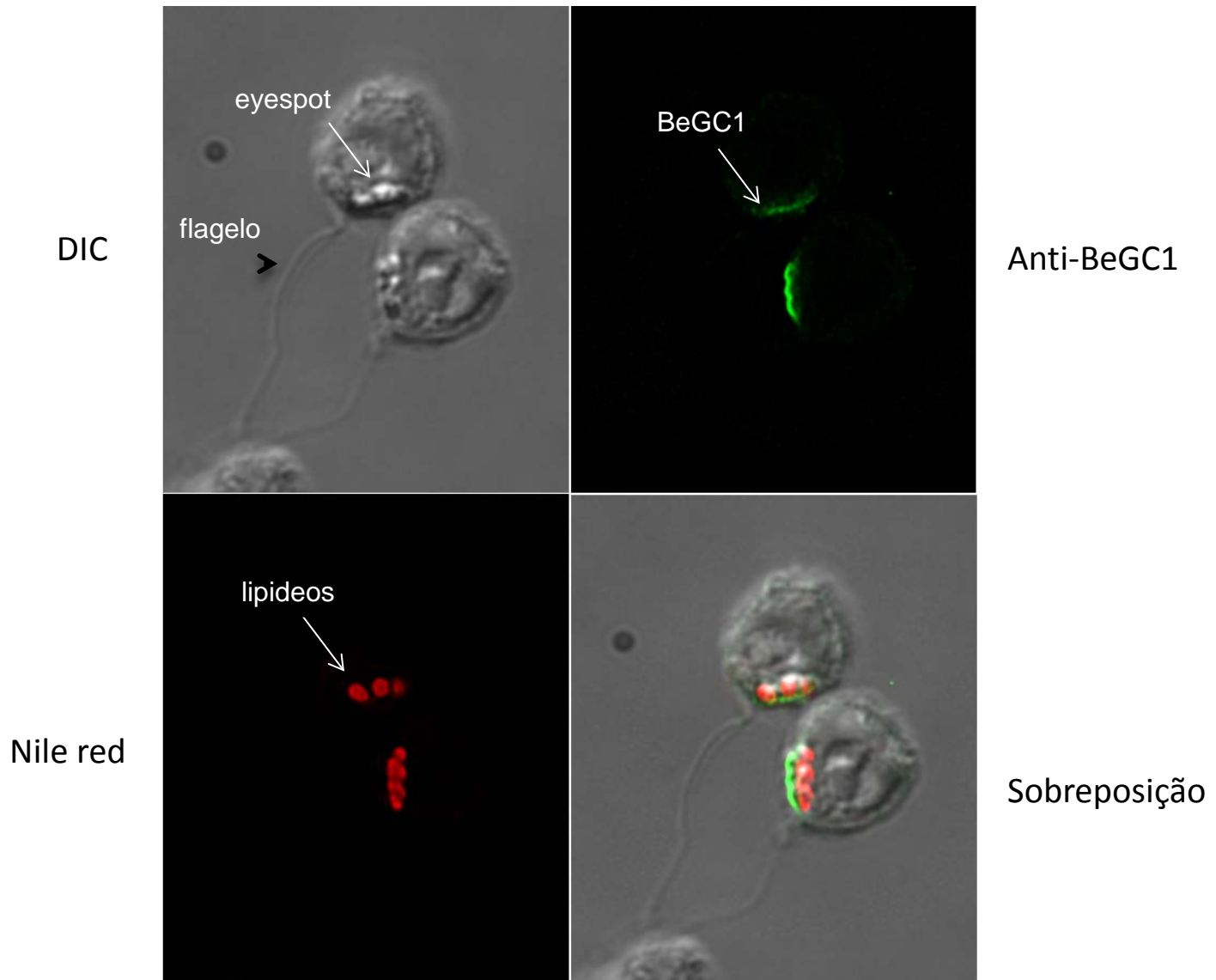


- Controle
- Adição de hidroxilamina (inibidor de rodopsina)



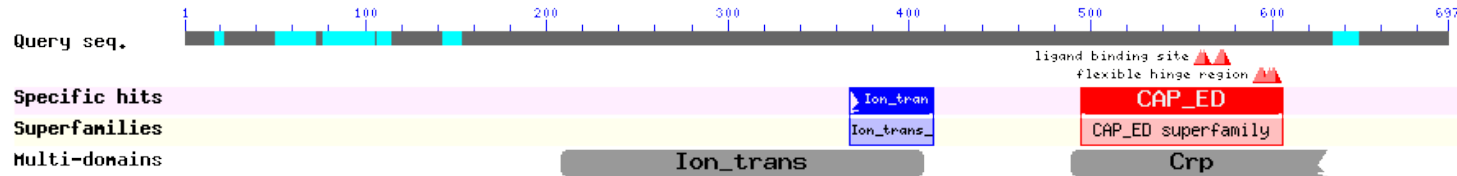
- Na presença de 50 μM de norflurazon (inibidor da síntese de carotenoides)
- Na presença de 50 μM de norflurazon com adição de 10μM de retinal A1

## BeGC1 foi imunolocalizada no 'eyespot' do zoósporo

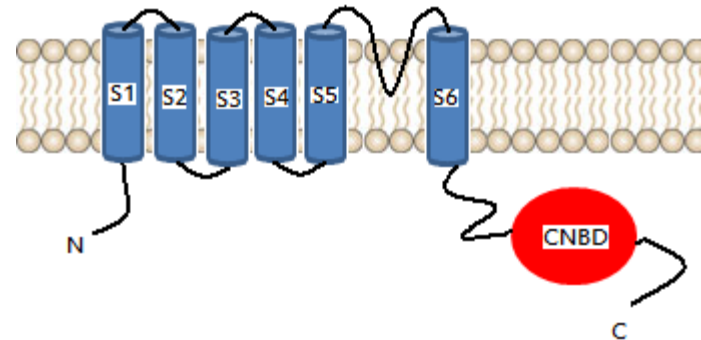


Consistente com a participação de BeGC1 na fototaxia do zoósporo

# Canal iônico ativado por cGMP (BeCNG1): um possível componente da via de sinalização da fototaxia do zoósporo



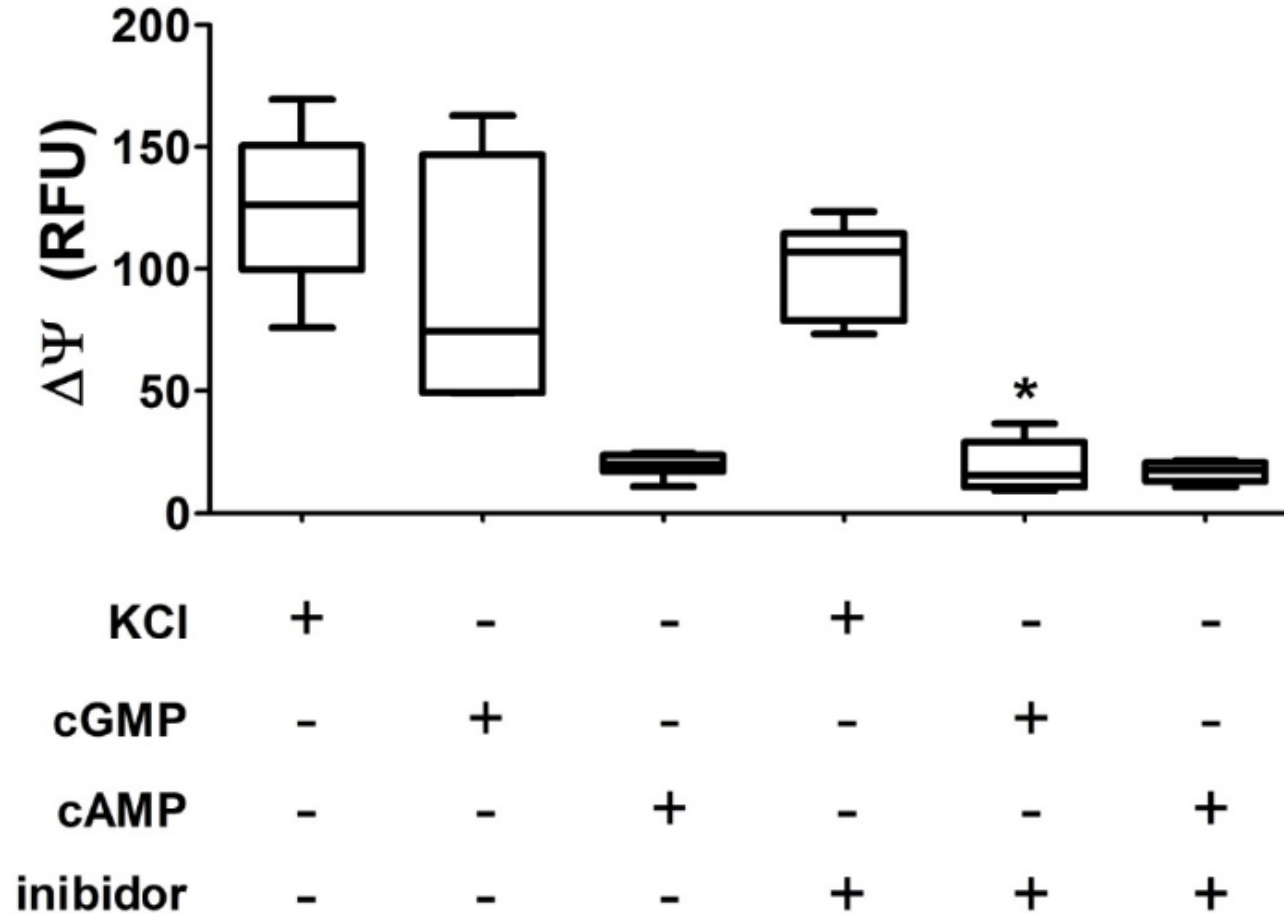
MIQPQLHLDRLLETTSAAAAAAYSRTPLLSETVHFFSETGRRLGFFTRDGDDSDSPDDDDDFDDPDDDPAPAL  
 GPTAAGRGRGDRDDADLLAGAARPMADARALARMGSSGSGSTQSTRKRNGAGGRSSRLADGPDNDLFIAGNQG  
 GGGFLGGGLTWQDLWQKLLKLYLIPGEPFLTWWDYFMVLVAVINGITIPFIAAFRGYLFTSFIVQYALDVIYLI  
 DIFIKFHVSYLDRGFYVIFPKEMAMHYMRSWEFSDLFTNLPFDLIALSWSNSAVPGEVLYFLSIVRLHKLMR  
 TFKLLWVWFHKEEKRLNAQAVFQMYKFIIYITLIHWCICIWYVLACPDQCVTPSWAIDPNQNPDFS DRLSMYV  
 YALYWTVMITTTGYGDVHATNDRER IWSIICMITGVFLYGYVSGTIIAS SLSNLD SRRVA YRQKVEAIKQYML  
 DQNMDDKMQKRVTWGWEYTWERNKGI DVINVFNDLPSNFRAEVALSVNEDIIEKAPIFRNTSLGFRRLSIAM  
 RINFFTIADTYIVHRGEIGKEMFFVQGRVDVNLHDES KPISSMVEGSYFGEYMLILGNVCEASAIAVCNCDVY  
 VLSKDDYDQACANY PEDANKVLAATKDAYQKQLEKQQRQRKSTDDFDLGTTSGLLVGGATNLTAMP SVIM  
 EEMGSTMGMASPPQSGVQTRRASGDDARKSRPFLTLVPEED



→ Região da seletividade por K<sup>+</sup>

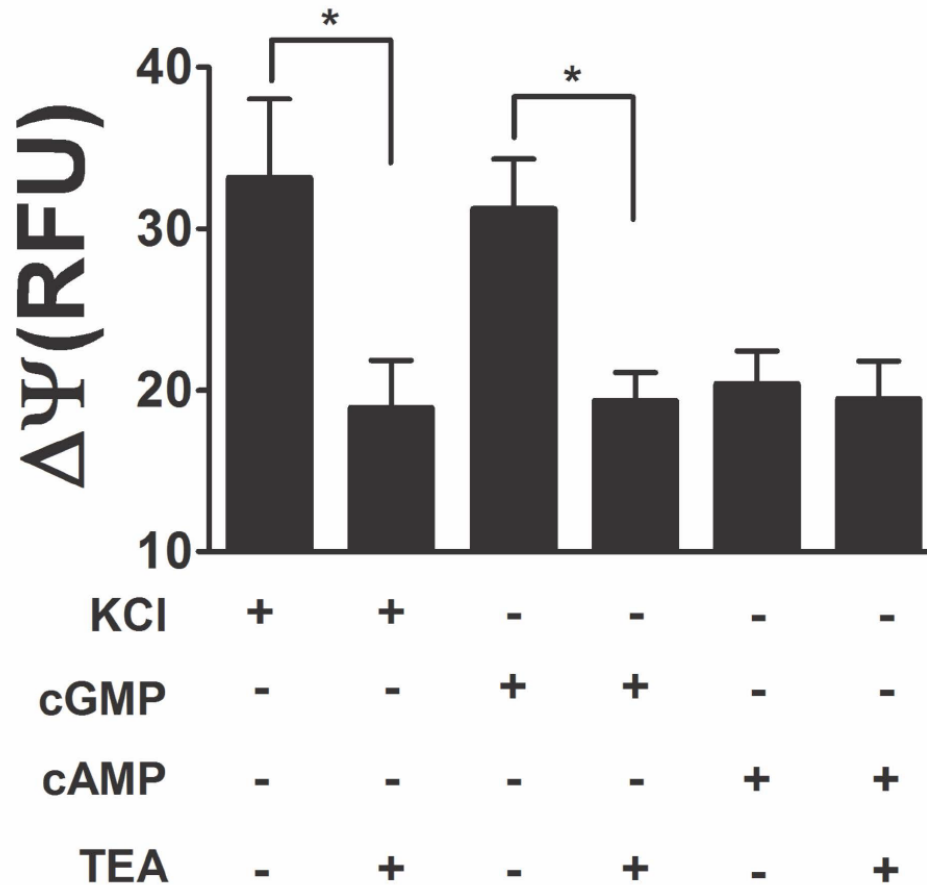
CNGA1 (bastonetes, *Homo sapiens*): 22,5% identidade;  
33,3% similaridade

## Aumento no potencial de membrana do zoósporo dependente de um canal ativado por cGMP



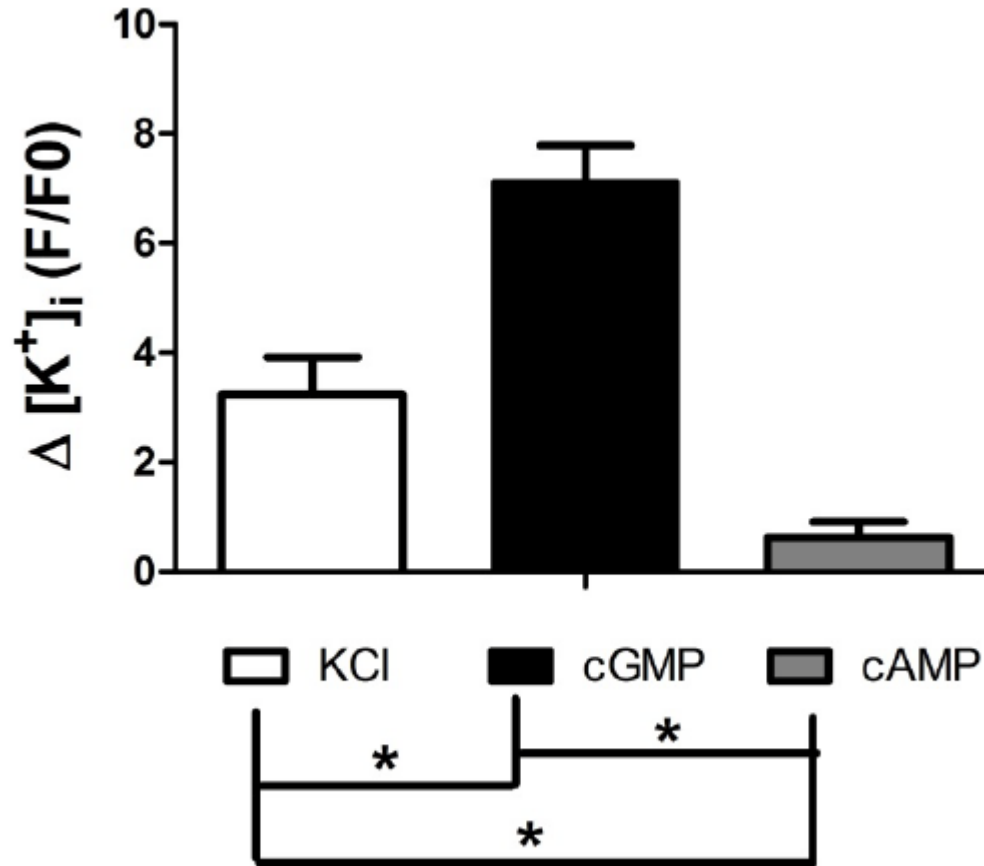
Inibidor de canal CNG = cis-diltiazem

# Despolarização da membrana do zoósporo dependente de cGMP é devida à ativação de um canal de K<sup>+</sup>



TEA= tetra-etil-amônio

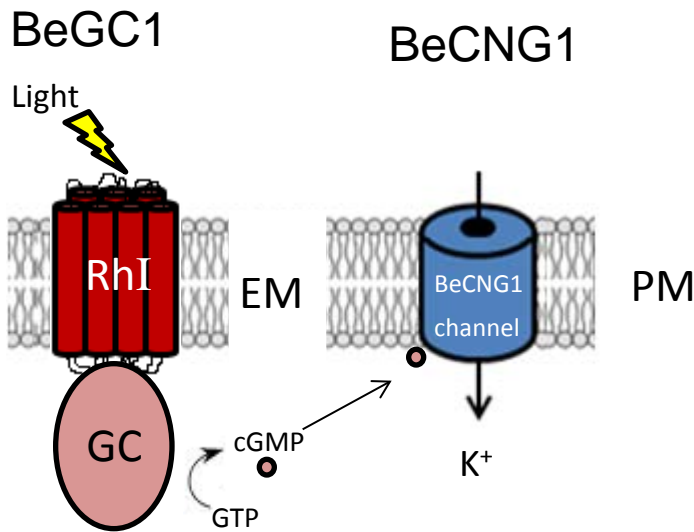
# cGMP (mas não cAMP) induz o influxo de $K^+$ em Zoósporos de *Blastocladiella*



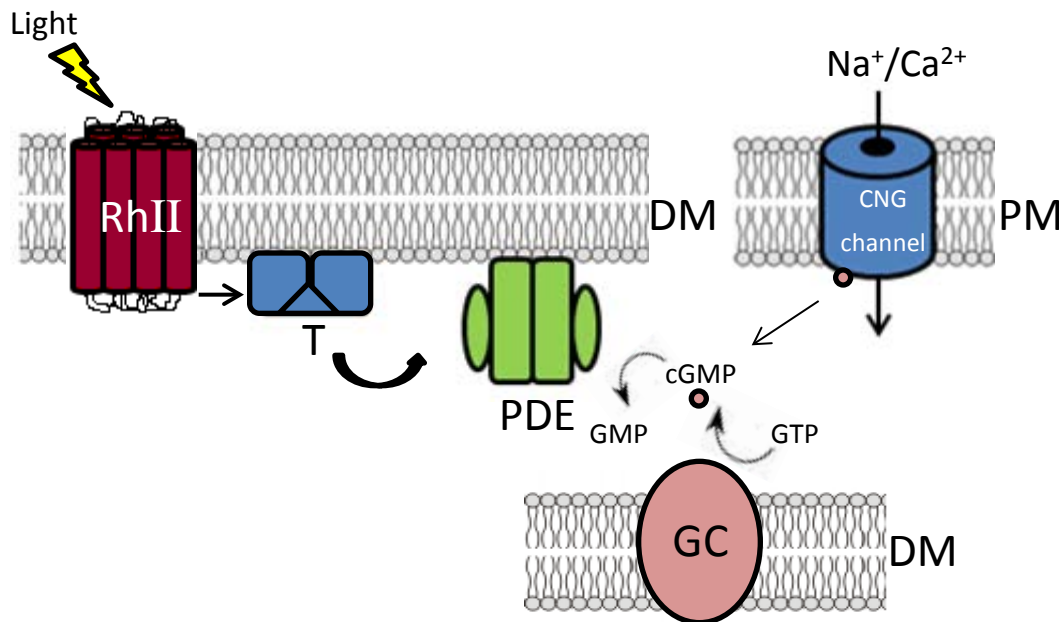




# Modelo proposto



**Sinalização na fototaxia em *Blastocladiella***



**Sinalização nos fotorreceptores na retina de vertebrados**

# Conclusões

- Rodopsinas de microrganismos e de animais possivelmente têm uma origem comum.
- Olhos de animais podem ter evoluído de proto-olhos (eyespots) de organismos unicelulares.
- O segundo mensageiro cGMP participa da fototaxia de fungos como *Blastocladiella* assim como na visão de vertebrados.
- Canais iônicos ativados por cGMP (CNG channels) participam da fototaxia de *Blastocladiella* assim como da visão do olho humano.

# Perspectivas para BeGC1: Ferramenta Optogenética

- A Optogenética é uma modalidade de pesquisa científica que se dedica ao desenvolvimento de ferramentas genéticas que usam a luz para modular processos fisiológicos em células ou animais.
- O uso de BeGC1 como ferramenta optogenética permitiria a modulação por luz dos níveis de cGMP em sistemas biológicos.
- Dois grupos de pesquisadores da área de Optogenética publicaram recentemente o uso de BeGC1 como ferramenta optogenética em oócitos de ouriço do mar, em músculo do verme *C. elegans* e em neurônios de mamíferos.
- Os resultados apresentados por esses pesquisadores mostraram que BeGC1 é uma ferramenta versátil capaz de modular através da exposição à luz processos biológicos dependentes de cGMP em biologia celular e neurociências.

## *Science Signaling, vol 8, 2015*

A light-responsive fungal guanylyl cyclase provides a tool with which to study cGMP signaling in mammalian systems.

### RESEARCH RESOURCE

---

#### OPTOGENETICS

## The rhodopsin–guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling

Ulrike Scheib,<sup>1\*</sup> Katja Stehfest,<sup>1\*</sup> Christine E. Gee,<sup>2\*</sup> Heinz G. Körschen,<sup>3</sup> Roman Fudim,<sup>1</sup> Thomas G. Oertner,<sup>2†</sup> Peter Hegemann<sup>1†</sup>

**Blastocladiomycota fungi form motile zoospores that are guided by sensory photoreceptors to areas of optimal light conditions. We showed that the microbial rhodopsin of *Blastocladiella emersonii* is a rhodopsin–guanylyl cyclase (RhGC), a member of a previously uncharacterized rhodopsin class of light-activated enzymes that generate the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Upon application of a short light flash, recombinant RhGC converted within 8 ms into a signaling state with blue-shifted absorption from which the dark state recovered within 100 ms. When expressed in *Xenopus* oocytes, Chinese hamster ovary cells, or mammalian neurons, RhGC generated cGMP in response to green light in a light dose–dependent manner on a subsecond time scale. Thus, we propose RhGC as a versatile tool for the optogenetic analysis of cGMP-dependent signaling processes in cell biology and the neurosciences.**

# Nature Communications, Gao et al., 2015

## ARTICLE

Received 1 Feb 2015 | Accepted 11 Jul 2015 | Published 8 Sep 2015

DOI: 10.1038/ncomms9046

OPEN

## Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin CyclOp

Shiqiang Gao<sup>1,\*</sup>, Jatin Nagpal<sup>2,3,\*</sup>, Martin W. Schneider<sup>2,3</sup>, Vera Kozjak-Pavlovic<sup>4</sup>, Georg Nagel<sup>1</sup> & Alexander Gottschalk<sup>2,3,5</sup>

Cyclic GMP (cGMP) signalling regulates multiple biological functions through activation of protein kinase G and cyclic nucleotide-gated (CNG) channels. In sensory neurons, cGMP permits signal modulation, amplification and encoding, before depolarization. Here we implement a guanylyl cyclase rhodopsin from *Blastocladiella emersonii* as a new optogenetic tool (BeCyclOp), enabling rapid light-triggered cGMP increase in heterologous cells (*Xenopus* oocytes, HEK293T cells) and in *Caenorhabditis elegans*. Among five different fungal CyclOps, exhibiting unusual eight transmembrane topologies and cytosolic N-termini, BeCyclOp is the superior optogenetic tool (light/dark activity ratio: 5,000; no cAMP production; turnover (20 °C)  $\sim 17$  cGMP s<sup>-1</sup>). Via co-expressed CNG channels (OLF in oocytes, TAX-2/4 in *C. elegans* muscle), BeCyclOp photoactivation induces a rapid conductance increase and depolarization at very low light intensities. In O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sensory neurons of *C. elegans*, BeCyclOp activation evokes behavioural responses consistent with their normal sensory function. BeCyclOp therefore enables precise and rapid optogenetic manipulation of cGMP levels in cells and animals.





## Agradecimentos

Dra. Gabriela Mól Avelar Tamaki

•Prêmio Tese Destaque USP 2015,  
área de Ciências Biológicas

Prof. Dr. André Luiz Gomes Vieira  
(UFRRJ)

Prof. Dr. R. Ivan Schumacker

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Prof. Dr. Henning Ulrich

Dr. Paulo A. Zaini

Dra. Talita Glaser

**University of Exeter (UK)**

Dr. Thomas Richards

Dr. Guy Leonard

•**FAPESP, CAPES e CNPq**



Muito obrigada!