

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNITAT DE BIOFÍSICA

Caracterització de l'estructura i funció del transportador de melibiosa *d'Escherichia coli* per espectroscòpia d'infraroig

Memòria presentada per Natàlia Dave i Coll per
optar al grau de Doctor en Ciències.

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de
Biofísica, de la Universitat Autònoma de Barcelona,
sota la direcció del Dr. Esteve Padrós i Morell

Bellaterra, maig del 2003

1. Introducció	1
1. 1. El transport de substàncies a través de la membrana	1
1. 1. 1. El transport de carbohidrats a través de la bicapa lipídica	3
1. 1. 2. La subfamília GPH (galactosides-pentoses-hexuronides)	6
1. 2. El transportador de melibiosa (MelB)	11
1. 2. 1. Funció de la MelB	13
1. 2. 2. Lloc d'unió dels cations de la MelB	16
1. 2. 3. Lloc d'unió del sucre de la MelB	18
1. 2. 4. Estructura secundària de la MelB	20
1. 2. 5. El mutant R141C	29
1. 3. L'espectroscòpia vibracional per a l'estudi de proteïnes	30
1. 3. 1. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)	30
1. 3. 2. Introducció al tractament matemàtic per a l'obtenció de les dades	32
1. 3. 3. El mètode ATR-FTIR per a l'estudi de proteïnes de membrana	34
1. 3. 3. 1. Cinètica de bescanvi hidrogen/deuteri per ATR-FTIR ...	36
1. 3. 3. 2. Estudi de l'orientació de proteïnes per ATR-FTIR polaritzat	38
1. 4. La MelB com a model estructural i funcional d'altres transportadors de sucre	39
 2. Objectius	 41
 3. Mètodes experimentals	 43
3. 1. Materials utilitzats	43
3. 2. Obtenció de la MelB o el R141C purificats i reconstituïts	43
3. 2. 1. Obtenció de vesícules invertides de membrana (IMV's) amb MelB o R141C recombinants	43
3. 2. 2. Purificació de la MelB o el R141C	46
3. 2. 3. Reconstitució de la MelB o el R141C	46

3. 3. Mesura de la concentració i de l'activitat de la MelB i el R141C	47
3. 3. 1. Comprovació de l'estat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència	48
3. 4. Estructura secundària per espectroscòpia FTIR de transmissió	49
3. 4. 1. Preparació de la mostra	49
3. 4. 2. Adquisició dels espectres de FTIR de transmissió	50
3. 4. 3. Anàlisi dels espectres de FTIR de transmissió	50
3. 5. Bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR.....	52
3. 5. 1. Preparació de la mostra de MelB o R141C i adquisició dels espectres	55
3. 5. 1. 1. Neteja del cristall de Ge	56
3. 5. 2. Anàlisi dels espectres d'ATR-FTIR	57
3. 5. 2. 1. Anàlisi de l'amida II dels espectres d'infraroig	59
3. 5. 2. 2. Anàlisi de l'amida I dels espectres d'infraroig	59
3. 6. Estudi de l'orientació per espectroscòpia d'ATR-FTIR	61
3. 6. 1. Obtenció dels espectres de polarització de la MelB o el R141C per espectroscòpia d'ATR-FTIR	61
3. 6. 2. Anàlisi de l'orientació de la MelB per ATR-FTIR	61
3. 6. 2. 1. Càlcul del paràmetre d'ordre i de la raó dicroica d'una banda	62
3. 6. 2. 1. 1. Hipòtesi del film gruixut	63
3. 6. 2. 2. Obtenció de l'orientació dels eixos moleculars	64
3. 6. 2. 3. Determinació experimental de la raó dicroica (R^{ATR})	67
3. 6. 2. 4. Obtenció dels espectres dicroics	67
3. 6. 2. 4. 1. Anàlisi dels espectres dicroics	68
 4. Resultats i discussió	 69
4. 1. Obtenció de la MelB salvatge i el mutant R141C purificats i reconstituïts	69
4. 2. Comprovació de l'activitat de la mostra per espectroscòpia de fluorescència	70
4. 3. Estudi de l'estructura secundària de la MelB salvatge per	

espectroscòpia de FTIR	71
4. 3. 1. Obtenció dels espectre d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de MelB	72
4. 3. 2. Obtenció dels espectres d'absorció de la MelB salvatge en D ₂ O	74
4. 3. 3. Quantificació de l'estructura secundària	76
4. 3. 4. Estudi de l'estructura de la MelB salvatge solubilitzada	79
4. 3. 5. Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats	81
4. 4. Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia ATR-FTIR	83
4. 4. 1. La banda amida II i la cinètica de bescanvi H/D global de la MelB salvatge	84
4. 4. 2. La banda d'amida I i la cinètica de bescanvi H/D a nivell d'estructura secundària	91
4. 5. Estudi del bescanvi H/D del mutant R141C per ATR-FTIR	96
4. 5. 1. La banda d'amida II i la cinètica de bescanvi H/D global del mutant R141C	97
4. 5. 2. La banda amida I i el bescanvi H/D a nivell d'estructura secundària del mutant R141C	104
4. 6. Estudi de l'orientació de la MelB salvatge i el mutant R141C per ATR-FTIR	109
4. 6. 1. Determinació de l'orientació de la membrana	110
4. 6. 2. Espectres de dicroïsm de la MelB salvatge	112
4. 6. 2. 1. Anàlisi dels espectres de dicroïsm de la MelB salvatge en H ₂ O	112
4. 6. 2. 2. Anàlisi dels espectres de dicroïsm de la MelB salvatge en D ₂ O	115
4. 6. 3. Efecte dels substrats en l'orientació de les estructures de la MelB salvatge	117
4. 6. 4. Efecte dels substrats en l'estructura secundària de la MelB, en el bescanvi H/D i en l'angle de les components estructurals	

orientades	122
4. 6. 5. Espectres de dicroïsme del mutant R141C	127
4. 6. 5. 1. Comparació dels espectres de dicroïsme del mutant R141C i la MelB salvatge	128
 5. Discussió general	 130
5. 1. Equivalències estructurals i funcionals de la MelB en relació amb altres transportadors	130
5. 2. Característiques de l'estructura terciària de la MelB	134
5. 2. 1. Ubicació de l'estructura secundària que intervé en els canvis conformacionals	136
5. 3. Canvis produïts en l'estructura terciària de la proteïna deguts a una mutació puntual	139
5. 4. Orientació de l'estructura de la MelB salvatge	142
5. 4. 1. Consideracions sobre la preparació dels films de proteïna	142
5. 4. 2. Orientació dels segments transmembrana de la MelB	146
 6. Conclusions	 151
 7. Bibliografia	 154

1. Introducció

1. 1. El transport de substàncies a través de la membrana

Les cèl·lules eucariotes i procariotes, estan protegides per una membrana lipídica que les aïlla del medi extern, cosa que les permet establir un control rigorós del seu medi intern. Aquest control es duu a terme gràcies a l'existència de proteïnes de membrana que compleixen funcions de transport de substàncies, reconeixement de senyals i de comunicació amb el medi extern. També existeixen membranes lipídiques a dins la cèl·lula que serveixen per compartimentar metabòlits en els diferents orgànuls cel·lulars. El pas de substàncies a través de la membrana s'assoleix de diverses maneres. Una d'elles és la difusió passiva, on la molècula passa a través de la membrana a favor de gradient de concentració. La força termodinàmica d'aquest fenomen de difusió ve donat per l'augment d'entropia que té lloc quan un solut passa a través de la bicapa lipídica fins que arriba a un estat d'equilibri (estat en què la concentració de solut a dins i fora de la cèl·lula és la mateixa) on hi ha un estat de màxima entropia. Només les molècules de petites dimensions poden difondre ràpidament a través de la membrana i per tant utilitzar aquest tipus de transport, ja que molècules més grans com la glucosa que té un coeficient de difusió molt petit, no podrien difondre en quantitats suficients per la supervivència de la cèl·lula si aquest fos l'únic mitjà de transport. Existeixen per tant, uns altres dos tipus de transport a través de membrana que necessiten de l'acció de proteïnes, que són la difusió facilitada (passiva a través de canals i a través de proteïnes transportadores) sense despesa d'energia i el transport actiu amb despesa d'energia. La figura 1.1 ens mostra un esquema de la classificació actual de transportadors transmembrana de soluts (Saier et al., 2000). La difusió facilitada també té lloc a favor de gradient però depèn de proteïnes integrals de membrana que s'encarreguen del transport de molècules a través de la membrana. Cada proteïna transportadora és específica d'una molècula o grup de molècules relacionades, o de dues molècules diferents. Aquest últim tipus de proteïnes transportadores poden transportar els dos substrats diferents en el mateix sentit, de forma *simport*, o en sentit contrari de forma *antiport*.

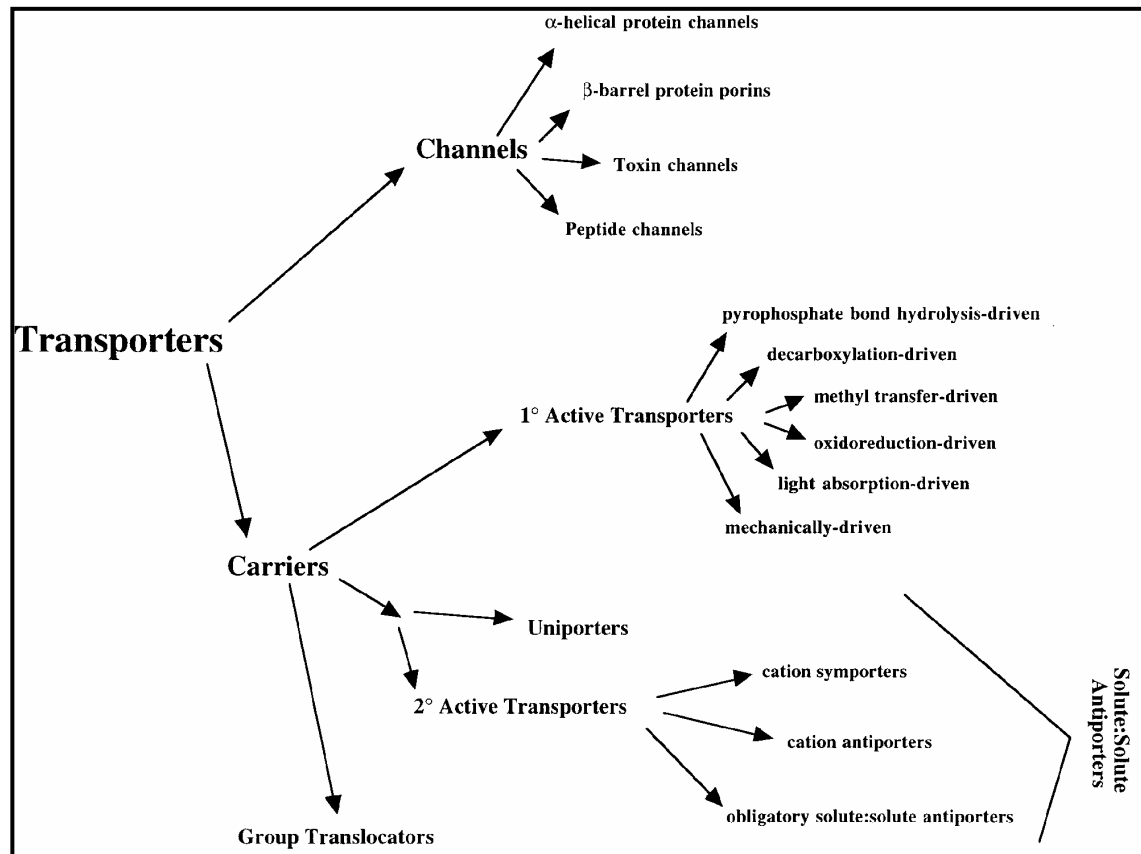


Figura 1.1. Classificació actuals dels diferents tipus de transportadors de membrana de cèl·lules eucariotes i procariotes (Saier et al., 2000).

Per altra banda, el transport actiu amb despesa d'energia es subdivideix en tres tipus (figura 1.2): el transport actiu primari, el transport actiu secundari i el transport per translocació de grup. El transport actiu primari depèn d'energies provinents de la hidròlisi d'ATP (com el transport d'ions Na^+ i K^+ per l'ATPasa de Na^+-K^+), del transport d'electrons (el transport de Ca^{2+} per l'ATPasa de Ca^{2+}) o de la llum (el transport de H^+ per la bacteriorodopsina). El transport actiu secundari depèn dels gradients iònics i de les diferències de potencial de la membrana. Les molècules són arrossegades en contra de gradient a l'interior cel·lular, gràcies a l'energia produïda pel co-transport d'ions a favor d'un gradient de concentració més pronunciat ($\Delta\Psi$). Gran part d'aquests tipus de transport en cèl·lules animals depèn del Na^+ , en contrast amb la majoria de cèl·lules bacterianes que és mitjançant el H^+ (Poolman et al., 1996). El transport actiu de translocació de grup, comporta la modificació química de la molècula transportada per un procés de catàlisi enzimàtica que fosforila un

sucre en el mateix temps que és transportat. Un exemple d'aquest últim tipus de transport és el sistema fosfotransferasa (PTS) d'*Escherichia coli*.

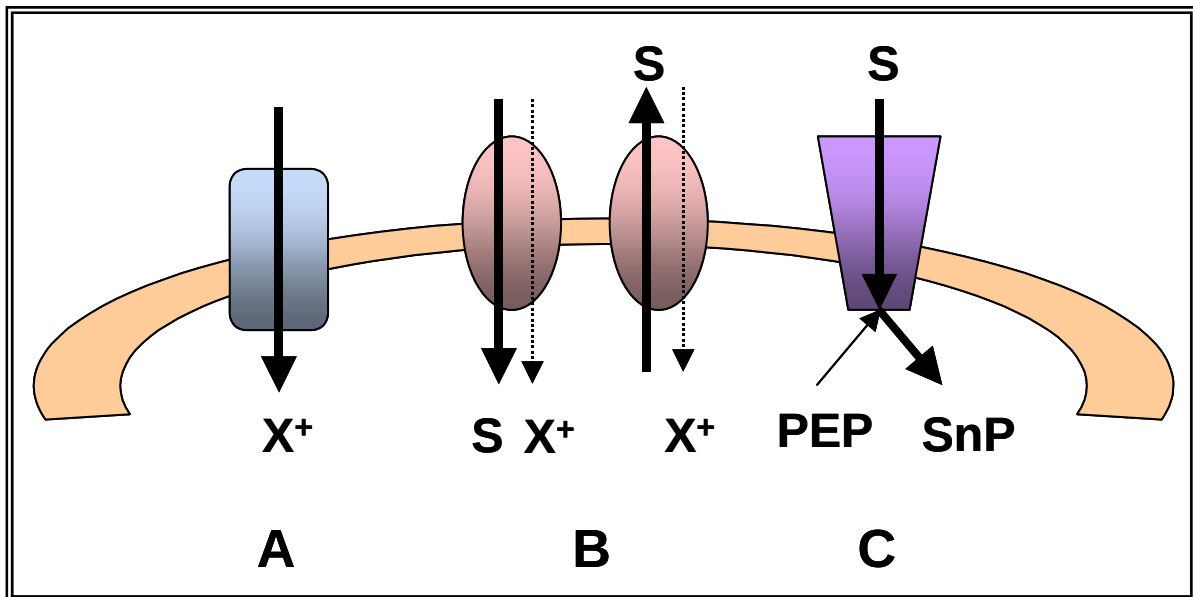


Figura 1.2. Esquema dels tipus de transport actiu. A. Transport actiu primari. B. Transport actiu secundari. C. Transport actiu per translocació de grup. X^+ , ió; S, solut; P, grup fosfat; n, número; PEP, fosfoenolpiruvat.

1. 1. 1. El transport de carbohidrats a través de la bicapa lipídica

Els carbohidrats complexos constitueixen un dels quatre grans grups moleculars que formen els organismes vius. També serveixen com a font de carboni i síntesi d'energia de la majoria de cèl·lules vives. Dins els carbohidrats complexos, tenim la glucosa que representa ser el monosacàrid més estable i prevalent a la natura, ja que forma part de carbohidrats estructurals com la cel·lulosa i de font de carboni com el glicogen. Ambdós tipus signifiquen una fracció molt important de la biomassa de la terra. Tot i la seva importància perquè estan involucrats en diversos processos essencials per la supervivència d'organismes, no ha sigut fins fa poc que existeix un interès creixent en el coneixement d'aquests carbohidrats i més concretament en llurs transportadors de membrana (Reizer et al., 1994; Poolman et al., 1996; Saier, 2000). Per aquest motiu, la gran varietat de mecanismes que comprèn el transport de carbohidrats a dins les cèl·lules han estat descrits en gran mesura durant aquesta última dècada. Conceptualment, el transport de carbohidrats

involucra bàsicament dos tipus de transport, la translocació del solut per mitjà de canals aquosos o el transport del solut per mitjà d'un transportador. Saier (1992) sosté que el primer mecanisme de transport per mitjà aquós implica cap, un, dos o més llocs d'unió amb el solut, mentre que el mecanisme mitjançant un transportador de membrana, normalment implica un únic lloc d'unió que mitjançant canvis conformacionals és capaç d'exposar-lo a ambdós costats de la membrana.

El transport de carbohidrats exògens cap a l'interior de la cèl·lula eucariota i procariota és el primer pas essencial per al seu catabolisme. Aquest primer pas de transport de solut però, dins les bacteries gram negatives, és el de travessar la paret cel·lular. Aquest procés es produeix normalment per difusió passiva a través de la membrana o per proteïnes canals. En canvi, el mecanisme de transport de carbohidrats a través de la membrana plasmàtica es produeix bàsicament per proteïnes transportadores altament específiques del substrat a transportar. Existeixen gran diversitat de proteïnes transportadores específiques de cada tipus de carbohidrats, en cèl·lules eucariotes i procariotes, la gran majoria de les quals realitzen el transport mitjançant l'energia proporcionada pels co-substrats sodi o protó (Reizer et al., 1994). Degut a aquest fet, alguns estudis anteriors sostenien la hipòtesi que aquests dos tipus de transportadors eren essencialment iguals i que només petites modificacions en un sol aminoàcid podien convertir un transportador de sodi/solut a protó/solut i viceversa. Aquesta hipòtesi només s'ha verificat en pocs casos (Botfield et al., 1990; Brooker, 1990), ja que proporcionalment al nombre de transportadors que s'anaven coneixent aquests es podien anar separant en dues grans famílies, les de sodi/solut i les protó/solut, i cada una era exclusiva per a cada tipus de funcionament. Tots dos tipus d'ions, Na^+ i H^+ , poden existir en els medis extracel·lulars i per tant poden produir el gradient electroquímic suficient per fer funcionar el procés de transport actiu secundari. Tot i així, cada organisme fa servir el seu ió co-transportador i això ve donat majoritàriament per quin tipus d'ió resideix o s'expulsa al medi extracel·lular. Així doncs, els sodi *simport* solen ser organismes i cèl·lules on existeix una alta concentració de Na^+ en el medi extern, normalment cèl·lules animals i d'alguns bacteris. Per altra banda, la majoria de bacteris tenen transportadors de tipus *antiport* K^+/H^+ (el protó surt fora la cèl·lula), de manera que es crea un gradient d' H^+ a l'exterior cel·lular i per tant la majoria de transportadors

secundaris de membrana bacteriana utilitzen l' H^+ com a co-transportador *simport* (Reizer et al., 1994). Més evidències d'aquest tipus de selecció de l'ió co-transportador *simport* són els bacteris alcalòfils, els quals no tenen prou H^+ en el medi extracel·lular i per tant fan servir el Na^+ com a co-transportador *simport*. Encara més especial resulta el transportador de melibiosa, que és capaç de fer servir ambdós cations i fins i tot el Li^+ : Aquest fet el situa en una posició intermèdia dins la filogènia de la superfamília dels transportadors de sodi/solut (Reizer et al., 1994).

En l'actualitat dins la superfamília de transportadors sodi/solut (SSF), existeixen unes 11 famílies de co-transportadors (Saier et al., 2000) i no totes tenen el mateix nombre de segments hèlixs α transmembrana ni la mateixa longitud dels llaços que connecten aquests segments entre les diferents famílies. Tot i així, molts transportadors de les diferents famílies tenen gran similitud topològica i de funció tot i que la seva seqüència genètica no sigui suficientment similar. Aquesta última observació, es reflexa molt bé en la gran majoria de transportadors de carbohidrats, com el de xilosa, el d'arabinosa, el de lactosa, el transportador de citrat i d'altres que comparteixen predicció en l'estructura topològica de 12 hèlix transmembrana, però en canvi no tenen un grau d'homologia significatiu en la seva seqüència primària (Henderson and Maiden, 1990). La figura 1.3 ens mostra una selecció de sistemes de transport existents en la membrana d'*Escherichia coli*.

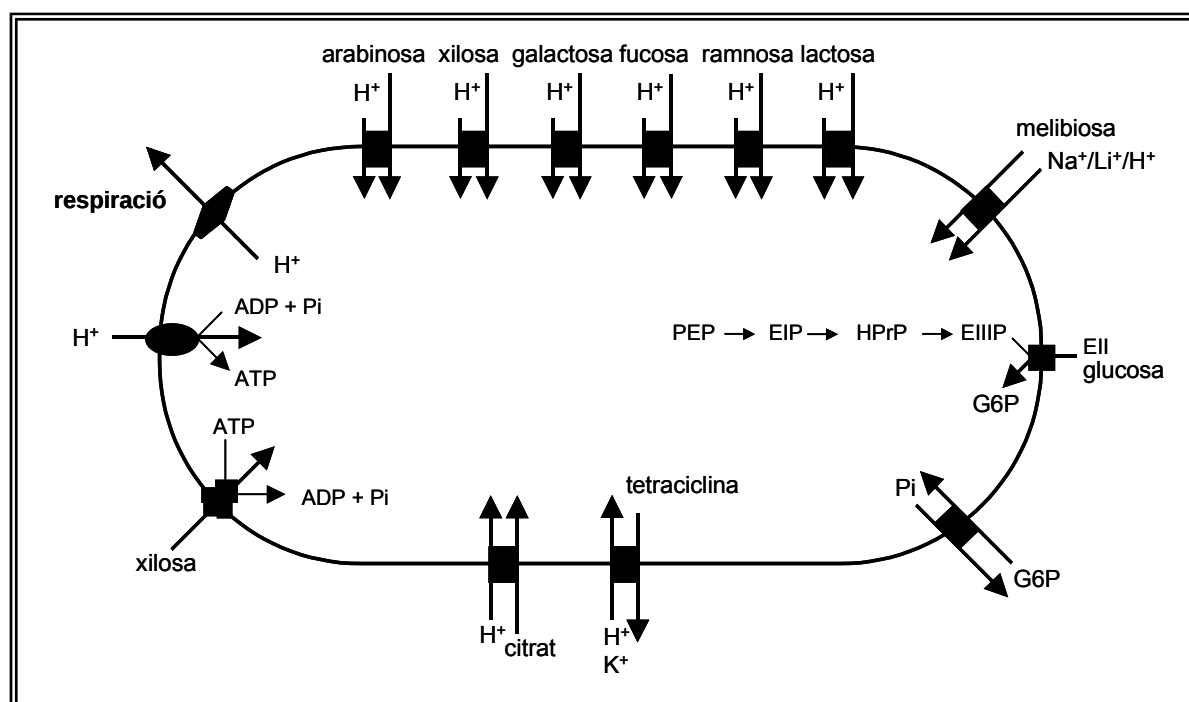


Figura 1.3. Tipus de transportadors de membrana d'una cèl·lula bacteriana d'*Escherichia coli* (Henderson et al., 1990).

1. 1. 2. La subfamília GPH (galactosides-pentoses-hexuronides)

La superfamília SSF consta d'onze famílies tal com ja s'ha esmentat abans. Reizer et al., 1994 ens expliquen que dins d'aquesta superfamília existeixen famílies que consten de transportadors procariotes exclusivament com la família SGF (galactoside superfamily), la família SNF (neurotransmitter superfamily) que conté només transportadors de cèl·lules eucariotes i finalment la resta de famílies que consten de transportadors de cèl·lules eucariotes i procariotes (Taula 1.1).

Tot i així, Poolman et al. (1996) ens descriu una nova forma de classificació dels transportadors transmembrana. Partint de la superfamília de facilitadors majors (MFS) es deriva una subfamília anomenada GPH que transporta específicament galactòsids, pentoses i hexurònids, (figura 1.4) mitjançant diversos cations. Transportadors com la permeasa de lactosa (LacS) d'*Streptococcus thermophilus*, i la permeasa de melibiosa (MelB) d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium* en formen part. Conforme s'han anat obtenint seqüències

primàries, s'ha pogut observar que transportadors *uniport*, *simport* i *antiport* poden formar part d'una mateixa família homòloga, tot i que aquests transportadors *simport* i *antiport* lliguin diferents substrats i les reaccions d'estequiometria siguin diferents.

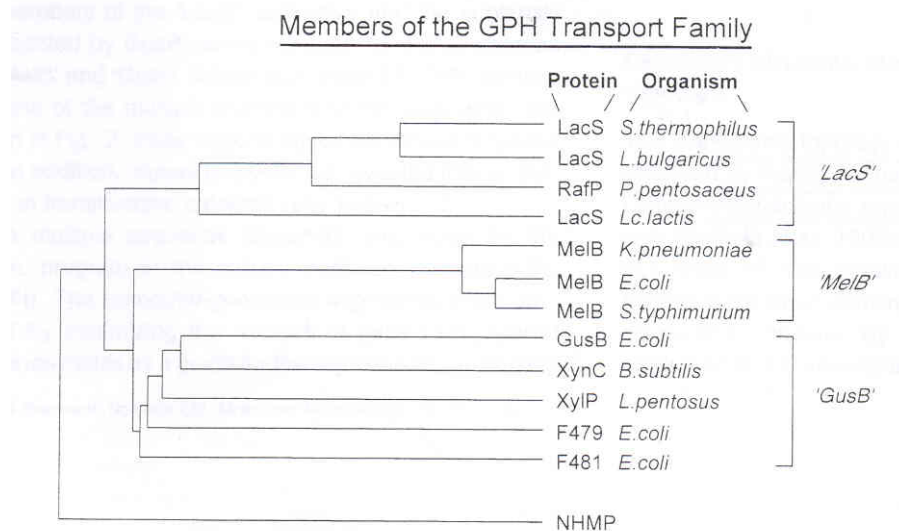


Figura 1.4. Classificació filogenètica de transportadors de membrana membres de la família GPH (Saier et al., 2000). La permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (MelB); permeasa de lactosa de *Lactobacillus bulgaris*, de *Leuconostoc lactis* i *Streptococcus thermophilus* (LacS); transportador de xylosa de *Lactobacillus pentosus* (XylP) i de *Bacillus subtilis* (XynC); transportador de glucurònid d'*E.coli* (GusB) permeasa de rafinosa de *Pediococcus pentosaceus* (RafP), F479 d'*E. coli* (F479) i F481 d'*E.coli* (F481).

Taula 1.1. Classificació de la superfamília dels transportadors simport de sodi/solut (SSF)

Membres	Substrats	Organismes
SSF (simport sodi/solut)	Sucres, aminoàcids, vitamines, nucleòsids i ciclitols	Bacteris i mamífers obligatoris de transport simport Na^+ /solut
SNF (simport de neurotransmissors)	Neurotransmissors, hormones, osmòlits, aminoàcids, creatina i d'altres soluts	Específic d'eucariotes. També poden utilitzar Cl^- com ió co-transportador
SDF (simport de dicarboxilats)	Dicarboxilats orgànics, aminoàcids acídics (aspartat i glutamat) i dicarboxilats dels cicle de Krebs (succinat, fumarat i malat)	Mamífers, bacteris i espècies rizobials
SPF (simport de fosfats)	Fosfats inorgànics, drogues i d'altres soluts desconeguts	Mamífers i bacteris
SGF (simport de galactòsids)	Lactosa per bacteries gram-positives i melibiosa per bacteries gram-negatives.	Específic de procariotes
SCF (simport de citrats)	Tricarboxilats del cicle de Krebs	Específic de procariotes
SAF (simport d'alanines)	Alanines	Bacteris
SLIVF (simport d'aminoàcids de cadenes ramificades)		Bacteris
SEF (simport de glutamats)	Glutamats	Bacteris
SBF (simport d'àcids biliars)	Àcids biliars i d'altres substrats desconeguts	Exclusiu de mamífers
SNF (simport de NaCl)	NaCl	Procariotes i eucariotes

En general però, i basat en prediccions d'estructura topològica i d'estructura secundària, tots els membres de la GPH consten de 12 hèlix transmembrana (Henderson et al., 1993). L'estudi comparatiu de les seqüències primàries de cada transportador ens donen un grau de similitud suficientment alt per concloure que parteixen d'un origen comú (Poolman et al., 1996) (figura 1.4). Tot i així, cada un d'aquests transportadors de la família GPH mostren selectivitat d'unió a diferents cations (Taula 1.II), cosa que facilita l'estudi d'identificació dels diferents llocs d'unió de cada proteïna pel catió.

Taula 1.II. Classificació dels diferents cations utilitzats per la subfamília GPH

Substrat	MelB_{EC}	MelB_{SY}	MelB_{KP}	LacS_{ST}	GusB_{EC}
α -galactòsids <i>melibiosa</i>	H ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺	Na ⁺ , Li ⁺	H ⁺	H ⁺	NT
β -galactòsids <i>TMG</i>	Na ⁺ , Li ⁺ , (H ⁺)	Na ⁺ , Li ⁺	H ⁺ , Li ⁺	H ⁺	NT
<i>Lactosa</i>	Na ⁺ , Li ⁺	nd	Li ⁺	H ⁺	NT
Monosacàrids <i>D-galactosa</i>	H ⁺ , Na ⁺ , (Li ⁺)	nd	nd	H ⁺	NT
α/β -glucurònids	H ⁺ , Na ⁺	nd	nd	nd	H ⁺

Melibiosa, 6-O- α -galactopiranosil-D-glucosa; TMG, metil- β -D-thiogalactopiranosid; Lactosa, 4-O- β -galactopiranosil-D-glucosa; nd, no determinat; NT, No transportat. Els cations entre parèntesi volen dir que l'activació per ells és molt pobre. Les dades de la taula es troben descrites a Poolman et al. (1996).

Poolman et al. (1996), comparen l'homologia de seqüència de l'hèlix II i del llaç 10-11 entre els diversos organismes de la GPH, ja que molts mutants realitzats fins aleshores indicaven aquest residus com a possibles llocs d'unió als substrats. Ams aquesta comparació, comproven que molts aminoàcids acídics (aspàrtics i glutàmics) es conserven en tota la família de transportadors catió/solut i d'altres que es conserven entre la mateixa subfamília dins la mateixa família GPH. Les substitucions d'aquests aminoàcids en aquestes regions dels transportadors de MelB

d'*Escherichia coli* i de LacS d'*Streptococcus thermophilus* per aminoàcids neutres resulten en una inhibició total o quasi total del transport. Aquests resultats suggereixen que els residus acídics com a mínim contribueixen a la coordinació del catió lligant. La prova més concloent realitzada fins aleshores, és la del paper del residu Asn-58 de la MelB_{EC} (*Escherichia coli*) i la presència d'aquest mateix residu en posicions equivalents en d'altres microorganismes de la família GPH que co-transporten amb el catió Na⁺.

En resum, les diferències en el sentit del transport (*simport versus antiport*) i d'especificitat d'unió al substrats d'aquests co-transportadors catió/sucre responen en general a petites diferències en la seqüència primària d'aquests transportadors dins la família GPH i fins i tot en d'altres famílies co-transportadores catió/substrat. De vegades, tot i que no en la majoria dels casos, són tant subtils que la substitució d'un sol aminoàcid canvia qualsevol dels processos esmentats abans. Tot i que el transportador de lactosa LacY d'*Escherichia coli* (LacY_{EC}), no és un membre de la família GPH i per tant no presenta un grau d'homologia de seqüència significatiu (pertany a la família dels transportadors MFS i més concretament a la família de transportadors *simport* d'oligosacàrid/H⁺ (OHS)), presenta una gran similitud funcional i estructural amb membres de la família GPH (Saier, 2000), especialment amb la MelB. Més concretament, tenen una estructura secundària molt similar, amb un model topològic de 12 hèlix transmembrana amb el costat N- i C-terminal a la cara citoplasmàtica, i a més comparteixen molts substrats (lactosa, melibiosa, thiomethyl galactoside, α -NPG). De fet, els membres de la família GPH mostren una gran similitud amb la resta de transportadors de la superfamília MFS, però la LacY d'*Escherichia coli* està molt més estudiada i per tant resulta ser un model molt útil per fer estudis comparatius amb diferents transportadors de la GPH.

El gran avanç en el coneixement de la funció i estructura del transportador LacY d'*Escherichia coli* es va produir després del clonatge i seqüenciació del seu gen, *lacY* (Teather et al., 1978). A partir d'aleshores, s'han pogut fer estudis de mutagènesi dirigida, que possibilitaven la ubicació dels llocs d'unió del sucre i el catió. La posterior purificació i reconstitució en lípids purs de la proteïna que imitaven força bé les condicions salvatges (proteïna en la membrana cel·lular) han permès realitzar estudis espectroscòpics de FTIR (le Coutre et al., 1997), de fluorescència

(Menezes et al., 1990) i de cinètica de transport i reaccions d'estequiometria (Poolman and Konings, 1993) que han contribuït en l'aprofundiment del coneixement de la seva estructura i funció. Els avenços aconseguits amb aquesta línia d'investigació de la LacY d'*Escherichia coli*, determinaren una directriu important en la línia d'investigació que es durà a terme pel transportador MelB (Pourcher et al., 1990) a més de utilitzar-se com a referència comparativa. A més de compartir substrats i tenir un model topològic d'estructura secundària molt similars, la MelB_{EC} i la LacY_{EC}, també activen quasi el mateix nombre de llocs d'unió de la proteïna quan s'addiciona el sucre α -NPG en absència d'energia, és a dir, en estat d'equilibri (Damiano-Forano et al., 1986). A més el model de transport de substrats es descriu per un model de 6 estats i en el mateix ordre d'unió i desunió en ambdós casos (Bassilana et al., 1987).

1. 2. El transportador de melibiosa (MelB)

La MelB d'*Escherichia coli* catalitza l'acumulació d' α - o β -galactòsids a l'interior de la cèl·lula, gràcies a l'energia obtinguda dels cations Na^+ , H^+ o Li^+ que co-transporta de forma *simport*. És una proteïna integral de membrana de 473 aminoàcids, 70% dels quals són apolars i està codificada pel gen *melB* (Yazu et al., 1984). Tot i que la majoria de bacteris utilitzen transportadors H^+ /solut, la MelB constitueix una excepció, ja que té l'habilitat d'utilitzar qualsevol dels tres cations depenent del substrat que transporta. Cada catió competeix pel mateix lloc d'unió essent el Na^+ i el Li^+ millors activadors (Damiano-Forano et al., 1986; Bassilana et al., 1988). Aquests llocs d'unió de la MelB als cations han estat subjecte d'un ampli estudi per mutagènesi dirigida (Pourcher et al., 1993; Wilson & Wilson, 1992, Zani et al., 1993; Zani et al., 1994), per construcció de quimeres de MelB amb d'altres proteïnes de MelB homòlogues, com la quimera MelB_{EC}-MelB_{KP} (MelB de *Klebsiella pneumoniae*) (Hama & Wilson, 1993) i amb altres proteïnes de la superfamília, com la fosfatasa alcalina codificada pel gen *phoA* (Pourcher et al., 1996). Els resultats d'aquests estudis indiquen que el costat N-terminal és essencial per la unió del catió, tot i que també es necessita de la col·laboració d'alguns residus del costat C-terminal per tal d'estabilitzar la unió (Hama & Wilson, 1993). Fins i tot, la unió del sucre al costat C-terminal del transportador també influencia la unió del catió (Cordat et al.,

2000). El model topològic acceptat actualment (figura 1.5) consta de 12 hèlix transmembrana, amb el costat N- i C-terminal a la cara citoplasmàtica de la membrana, i està recolzat per important estudis immunològics (Botfield & Wilson, 1989; Pourcher et al., 1996), estudis extensius de fusió de gens *melB-phoA* (Botfield et al., 1992; Pourcher et al., 1996) i mapatge mitjançant digestió proteolítica (Gwizdek et al., 1997). Estudis de fotomarcatge (Ambroise et al., 2000) i mutagènesi combinada amb anàlisi per fluorescència (Cordat et al., 2000) confirmen la importància del domini hèlix IV-llaç 4-5 per la funció de transport de la MelB. A més, estudis d'espectroscòpia de fluorescència intrínseca (Mus-Veteau et al., 1995) i de FRET (Cordat et al., 1998; Maehrel et al., 1998) han demostrat que la unió del catí i el sucre a la MelB reconstituïda en liposomes d'*Escherichia coli* indueix canvis conformationals selectius i cooperatius entre substrats.

Periplasma

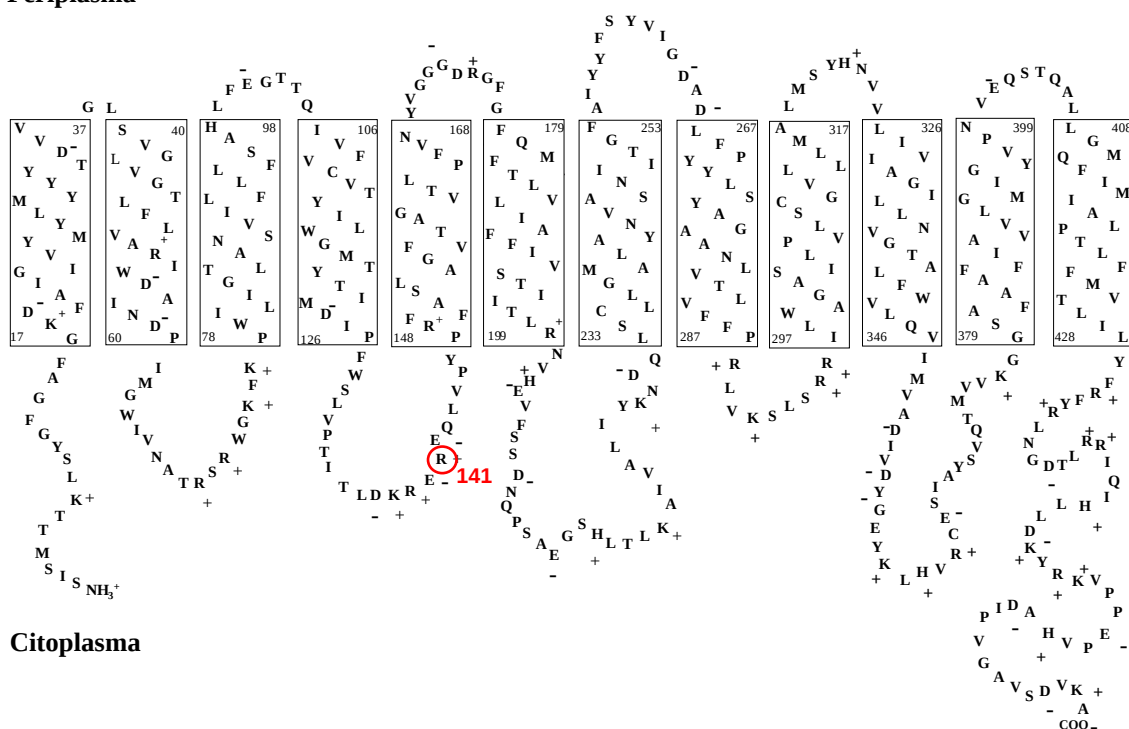


Figura 1.5. Model topològic d'estructura secundària de la MelB proposat per Pourcher et al. (1996). Les hèlixs transmembrana es representen amb rectangles. Cercle vermell, localització de l'Arg 141 en el llaç 4-5, mutada a cisteïna en el mutant R141C.

La funció de la MelB és la d'acumular activament α - o β -galactòsids en cèl·lules d'*Escherichia coli*. Ja cap als anys 80, es sabia que la MelB transportava α - i β -

galactòsids juntament amb el catió H^+ o el catió Na^+ (Van Thienen et al., 1978; Cohn and Kaback, 1980). Una mica més endavant, es va poder demostrar gràcies a la construcció de mutants que presentaven la unió als cations Na^+ i H^+ alterada, que el Li^+ també formava part d'aquest grup de cations co-transportadors de la MelB (Niiya et al., 1982). La MelB aprofita l'energia a favor de gradient del catió co-transportador (augmenta l'afinitat del transportador pel sucre) i electroquímica $\Delta\Psi$ (augmenta la taxa de transport del sucre), de manera que pot acumular melibiosa a dins la cèl·lula en contra de gradient del sucre (Cohn and Kaback, 1980). Més concretament, el catió controla l'estabilitat del complex ternari catió/sucre/MelB a la cara interna de la cèl·lula, de manera que regula la taxa de transport d'aquest (Leblanc et al., 1989; Pourcher et al., 1990). Depenent de si el sucre que transporta és un α -galactòsid, pot fer servir qualsevol dels tres cations i si és un β -galactòsid fa servir Na^+ o Li^+ , però no el H^+ (Wilson and Wilson, 1987).

Els passos moleculars que succeeixen durant el reconeixement dels substrats i el seu posterior transport, és una de les recerques claus alhora de conèixer amb profunditat el funcionament d'aquestes proteïnes transportadores de membrana. Per aquest motiu i pel fet que la investigació estructural necessita de la proteïna purificada i reconstituïda, el primer pas és l'estudi del seu transport (Cohn and Kaback, 1980). La mesura de l'activitat de la proteïna va poder ésser calculada per la tècnica de diàlisi de flux amb el sucre α -NPG (p-nitrophenyl- α -galactoside) anàleg de la melibiosa (Cohn and Kaback 1980), la qual permet obtenir el nombre de llocs d'unió actius de la proteïna quan s'afegeix el sucre. L'experiment es basa en la mesura de la competència entre l' α -NPG (anàleg de la melibiosa) i la melibiosa (Damiano-Forano et al., 1986). Mitjançant aquesta mateixa tècnica, en un altre treball (Bassilana et al., 1985), també es va poder calcular l'estequiometria de transport dels substrats de la proteïna, que és de 1 a 1. Més endavant, es va descobrir que la MelB també podia transportar una gran varietat de β -galactòsids com la lactosa (4-O- β -galactopiranosil-D-glucosa), l'arabinosa (L-arabinose- β -D-galactoside), la fructosa (D-fructose- β -D-galactoside) i el TMG (o- i p-nitrophenyl- β -D-galactoside) juntament amb el catió Na^+ o el Li^+ . Per altra banda els α -galactòsids com la melibiosa (6-O- α -galactopiranosil-D-glucosa), raffinosa (O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid) i el α -NPG fa servir

qualsevol dels tres cations, H^+ , Na^+ o Li^+ (Wilson and Wilson, 1987). Tot i la possibilitat d'utilització de qualsevol dels tres cations quan la MelB transporta α -galactòsids, la K_D ($0.7 \mu M$ quan $NaCl$ és $10 mM$) d'unió d' α -galactòsids és més baixa pel Na^+ que pel H^+ (Bassilana et al., 1985), cosa que suggereix un mecanisme *simport* de la MelB variable segons el catió co-transportador. Cal remarcar, que el H^+ exerceix un paper inhibitor en la unió de la MelB amb α -NPG a concentracions de Na^+ inferiors a $10 mM$, cosa que indica que els dos cations competeixen pel mateix lloc d'unió (Damiano-Forano et al., 1986).

En un treball sobre el transport, Bassilana et al. (1987) estudiaven el transport en vesícules RSO (right side out membranes) sense energia en tres condicions diferents: **Influx** (de fora a dins), quan la concentració de melibiosa és més gran a fora les vesícules que a dins; l'**efflux** (de dins cap a fora), quan la concentració a dins és més gran que a fora; i **exchange** (intercanvi), quan estem en situació d'equilibri, és a dir hi ha la mateixa concentració de melibiosa a dins i a fora de les vesícules. Els resultats van indicar que la MelB transporta la melibiosa i qualsevol dels tres cations Na^+ , Li^+ , o H^+ de forma asimètrica, ja que l'**efflux** és de 10 a 40 vegades més gran que l'**influx**. La representació de les cinètiques d'**efflux** i **exchange** en presència de melibiosa i els cations H^+ , Na^+ o Li^+ (figura 1.6), indica que la V_{max} és més alta en condicions d'**efflux** i **exchange** quan el catió co-transportador és el H^+ , en comparació amb el catió Na^+ . L'**efflux** i **exchange** són molt iguals quan la MelB està incubada amb melibiosa i el catió co-transportador és el Na^+ . Per altra banda, el catió co-transportador Li^+ presenta un **efflux** una mica per sota del nivell assolit pel Na^+ i en canvi, el nivell d'**exchange** és quasi negligible. A més, hi ha indicis que sostenen la idea anterior que la unió i desunió del sucre i el catió és seqüencial, cosa que es va confirmar en un estudi posterior (Bassilana et al., 1988).

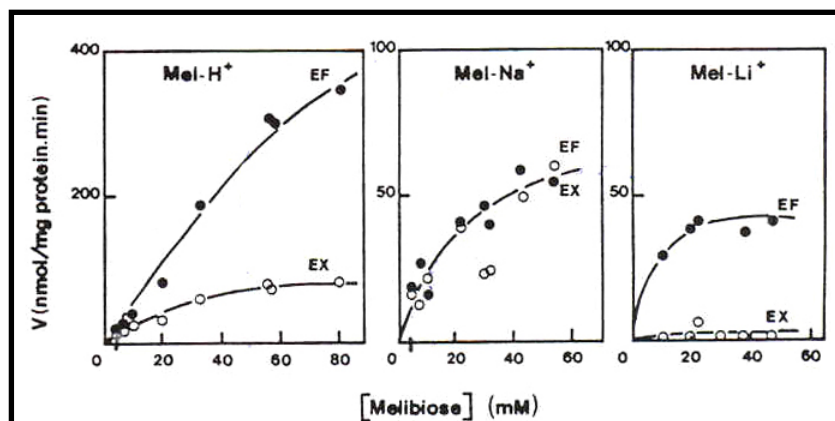


Figura 1.6. Representació gràfica de l'efflux (EF) i de l'exchange (EX) de la MelB incubada amb melibiosa i els cations: H⁺ (Mel-H⁺), Na⁺ (Mel-Na⁺) o Li⁺ (Mel-Li⁺). Resultats publicats per Bassilana et al. (1987).

Aquest últim estudi va aprofundir més en la seqüenciació de la unió i desunió dels substrats durant el transport de manera que primer s'uneix el Na⁺ (disposant-se d'una forma que afavoreixi la posterior unió del sucre) i en últim lloc el sucre, seguidament es produeix la translocació dels substrats a la cara interna de la membrana i s'allibera el sucre primer i finalment el Na⁺ (figura 1.7). Aquest pas d'alliberament del Na⁺ a la cara interna de la cèl·lula és molt lent en comparació amb l'alliberament a la cara externa de la membrana que és molt ràpid, cosa que referma la observació del treball anterior, on diu que la MelB funciona de manera asimètrica. En un estudi recent, Ganea et al. (2001) van mesurar directament l'activitat electrogènica durant el transport de la MelB mitjançant la tècnica SSM (solid supported membrane). Van observar que en condicions de dos substrats i quan el catió co-transportador és el Na⁺ o el Li⁺, s'obtenen dues respostes transitòries elèctriques, una de ràpida ($\tau \approx 15$ ms) que reflecteix la transferència de càrregues a la MelB durant la unió als substrats i una de lenta ($\tau \approx 350$ ms) que correspon a la transferència de càrregues a través de la membrana durant la translocació dels substrats.

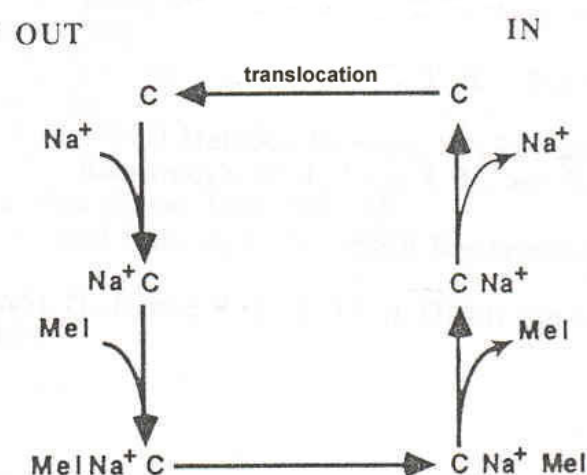


Figura 1.7. Model dels estats de transport de substrats de la MelB (Bassilana et al., 1988).

1. 2. 2. Lloc d'unió dels cations de la MelB

Un cop establert quins són els co-substrats transportats per la MelB i de quina manera es transporten, el següent pas d'investigació a realitzar, és trobar quines són les parts estructurals de la proteïna involucrades en la unió i translocació dels substrats. Tot i que la informació estructural de que disposem avui en dia, diu que la unió del sucre i catió és cooperativa entre sí, els estudis realitzats començaren per la identificació dels llocs d'unió al sucre per una banda i per l'altra, els llocs d'unió al catió. La mutagènesi dirigida amb combinació d'altres mètodes d'anàlisi, un cop el gen està clonat i seqüenciat resulta ser la eina més potent per tal de descobrir cada un dels aminoàcids implicats en el mecanisme de reconeixement, unió i transport. La MelB ha estat i és subjecte de mutacions per tal de descobrir els aminoàcids implicats en la unió i transport del catió i el sucre. Així doncs, és important saber quins són els aminoàcids que poden estar implicats en el reconeixement del sucre i del catió.

Els primers estudis que es feren sobre la unió dels cations a la MelB, ja indicaven el paper clau del costat N-terminal en el reconeixement i unió al catió (Hama and Wilson, 1994). Un estudi previ amb mutants d'*Escherichia coli* (Kawakami et al., 1988) va resultar en una diferenciació dels llocs d'unió per cada catió, de manera que el Li^+ i el H^+ comparteixen una mateix domini d'unió i el Na^+

s'uneix a un altre domini. Existeixen més treballs realitzats en aquesta direcció com el de Pourcher et al. (1993) on es van substituir varis aminoàcids àcids per aminoàcids neutres, D19C (Hèlix I), D55C i D59C (Hèlix II) i D124C (Hèlix IV) resultant en una pèrdua del transport degut a la falta d'unió del Na^+ com a co-transportador; fet que avala la hipòtesi que aquests aminoàcids àcids formen part d'una xarxa que coordina els cations Na^+ , H^+ i Li^+ (figura 1.8). Una altra observació que referma aquesta hipòtesi (Poolman et al., 1996) és la relació existent entre el radi iònic del Na^+ i el Li^+ (0.95 pel Na^+ Glusker, 1991) i la longitud de l'enllaç O-H del H_3O^+ (0.90 Å; Behr et al., 1982), que seria coherent amb el fet que el Na^+ , el H_3O^+ i el Li^+ s'uneixen en el mateix lloc d'unió. El nombre de coordinació per un catió, és el nombre d'àtoms o grups que l'envolten donant-li un parell d'electrons per compartir. Malgrat que en el cas del Na^+ , el H_3O^+ i el Li^+ aquest nombre és variable, igualment poden unir-se a una mateixa regió si disposen dels lligands necessaris.

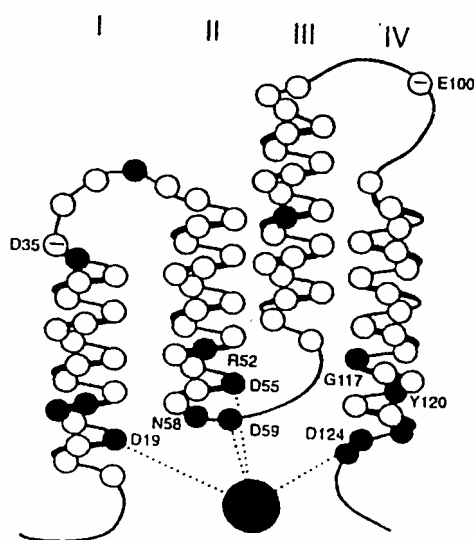


Figura 1.8. Model d'estructura terciària de la MelB, dels llocs d'unió dels cations, segons Poolman et al. (1996)

Altres mutants de residus polars de la MelB molt conservats situats molt pròxims als residus D19, D55, D59 i D124, només van donar lloc a una petita disminució en el co-transport amb sodi (Zani et al., 1994). La construcció de quimeres de MelB representa ser una altra eina important per estudiar la localització dels llocs d'unió de substrats, com és el cas de la construcció de quimeres de MelB amb aminoàcids provinents d'*Escherichia coli* i de *Klebsiella pneumoniae* (Hama and Wilson, 1993). Els resultats concloïen que 5 aminoàcids de la hèlix I i de la hèlix II de la MelB eren essencials per al reconeixement del Na⁺ i que la part C-terminal també hi juga un paper molt important en el reconeixement i transport.

1. 2. 3. Lloc d'unió del sucre de la MelB

Pourcher et al. (1990), van realitzar un primer treball de mutagènesi dirigida, que consistia en mutar cada una de les 7 histidines de la MelB per arginines. Les histidines han resultat ser molt importants per a les funcions de moltes proteïnes (Blow et al., 1969). El resultat d'aquest estudi indicava que, només la His94 era important per a la unió i el transport de la melibiosa. Aquest resultat portava conseqüències molt interessants ja que semblava haver-hi un paral·lelisme entre la LacY_{EC} que també tenia una sola His322 indispensable per a la seva funció de transport i la His94 de la MelB. Més endavant, un treball del mateix grup (Pourcher et al., 1992) va permetre descobrir que la mutació H94A transportava i unia melibiosa a 30°C de temperatura però no a 37°C. Aquest fet i estudis de marcatge del transport demostraren que la inserció i estabilitat de la MelB a la membrana depenia de la presència del grup imidazol. És a dir, la His94 és més important per a la inserció i estabilitat de la MelB en membrana que per a la funció en sí. Cal destacar, que els dos treballs mencionats es realitzaven sobre les mateixes cèl·lules o en RSO, ja que la MelB activa encara no s'havia pogut purificar i reconstituir en liposomes.

Una altra forma d'estudiar la relació estructura-funció en proteïnes, i més concretament la unió del sucre a la MelB és l'espectroscòpia de fluorescència. Els fluoròfors més utilitzats són els residus de triptòfan i de tirosina de la proteïna. Aquests últims però, són cinc vegades menys sensibles que els triptòfans, i per tant menys emprats a la pràctica experimental. La MelB conté 8 triptòfans, 6 en el costat N-terminal i 2 en el costat C-terminal i per tant la fa una proteïna candidata per

aquest tipus de tècnica (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996; Cordat et al., 1998). Concretament, Mus-Veteau et al. (1995) van investigar els efectes de l'addició del sucres amb els cations Na^+ , Li^+ o H^+ sobre la MelB, arribant a la conclusió que la MelB sofreix canvis conformationals per l'addició de substrats degut a la formació de complexes ternaris sucre/catió/permeasa. Per tal d'estudiar quins dels dominis de la proteïna, el N- i el C-terminal, estan implicats en la unió dels substrats que donen llocs als canvis conformationals, si més no en l'entorn dels triptòfans, es construïren mutants dels triptòfans del costat C-terminal de la MelB, el W299 i el W342 i es substituïren per fenilalanines (Mus-Veteau and Leblanc, 1996). Els resultats d'aquest treball demostraren la implicació directa del costat C-terminal amb la unió del sucre i una petita contribució del costat N-terminal, cosa que indicava una possible cooperació dels dos costats en la unió del sucre.

Posteriorment a la fluorescència intrínseca, es varen realitzar mesures de transferències d'energia (FRET) amb la MelB salvatge i amb cada un dels mutants de triptòfan de la MelB (Maehrel et al., 1998; Cordat et al., 1998). El treball de FRET amb la MelB salvatge demostrava l'existència de transferència d'energia dels triptòfans de la MelB al sucre fluorescent que s'hi unia, el 2'-(N-5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl)-aminoethyl-1-tio- β -D-galactopiranoside (Dns^2 -S-Gal) (Maehrel et al., 1998). Pel que fa al FRET dels mutants (Cordat et al., 1998), es troba que els dos triptòfans Trp64 (situat al llaç 2-3) i Trp299 (situat a l'hèlix IX) són responsables del 80% del senyal de FRET. Concretament, els càlculs indiquen que el residu W64 està a 20 Å i que el W299 està a 14 Å del lloc d'unió al sucre, Dns^2 -S-Gal, donant suport a la idea anterior que suggeria que la unió del sucre es produeix al costat C-terminal, probablement a prop de les hèlix IX i X i que el lloc d'unió al sucre també està pròxim al llaç 2-3 del costat N-terminal. Un treball recent (Cordat et al., 2000) combina les tècniques de mutagènesi dirigida i fluorescència intrínseca, per estudiar 6 mutants de triptòfan del costat N-terminal. Es va concloure que només el W64 (situat a l'hèlix II), el W116 (hèlix IV) i el W128 (llaç 4-5, molt a prop de l'hèlix IV) són responsables de les variacions del senyal de fluorescència induïdes per catió. Aquestes variacions de senyal induïdes pels substrats catió o sucre són maneres de mesurar l'activitat de la MelB (Mus-Veteau et al., 1995), de manera que si es produeix un canvi en el patró del senyal de fluorescència per

l'addició de substrats podem deduir que hi ha un canvi en el funcionament de la proteïna. A més, el W116 i el W128 també són responsables de la variació de senyal de fluorescència induïda per β -galactòsids (Cordat et al., 2000). Aquests resultats juntament amb els ja publicats anteriorment, suggereixen amb força un paper fonamental de l'hèlix IV com a connector dels llocs d'unió del sucre i del catió, ja que afecten al transport *simport* catió/sucre directament.

Existeix un últim estudi sobre la unió del sucre a la proteïna mitjançant la tècnica de fotomarcatge (Ambroise et al., 2000) amb un sucre anàleg de la melibiosa, per tal d'identificar el lloc d'unió d'aquesta. Després del fotomarcatge es procedeix a la digestió de la MelB amb proteases, de manera que només els fragments fotomarcats no sofriran una digestió. La digestió amb proteases va donar dos fragments, el CN1 (Asp124 - Met181) corresponent al llaç 4-5 - hèlix V - llaç 5-6 i el CN2 que consta de Met310 - Ile347 (hèlix X) i Met374 - Gly393 (hèlix XI). El paper d'aquest últim fragment en la unió amb el sucre ja el va trobar el treball anterior de Mus-Veteau and Leblanc (1996). Del fragment CN1 implicat també en el reconeixement del sucre, l'únic residu marcat del llaç 4-5 és l'Arg141. Aquest últim resultat, és molt important a tenir en compte ja que part del treball d'aquesta tesi s'ha realitzat sobre aquest mutant que recentment s'ha pogut construir i purificar en estat funcional (Abdel Dayem et al., 2003).

1. 2. 4. Estructura secundària de la MelB

Per entendre de forma detallada els mecanismes moleculars de la funció d'un enzim, es necessita del coneixement de la seva estructura. En el cas de les proteïnes de membrana, la mínima informació necessària per tal d'establir un model mecanicista de la funció és la seva estructura topològica. Els primers estudis encaminats en aquesta direcció es feren a finals dels anys 80 (Botfield and Wilson, 1988; Botfield and Wilson, 1989; Botfield and Wilson; 1992), tot i que la proteïna encara no s'havia pogut purificar i reconstituir en liposomes. Un primer treball en aquest sentit (Botfield and Wilson, 1988) va trobar mutants d'un sol aminoàcid de la MelB, que tenien el reconeixement al TMG i al Li^+ alterats a la vegada. Aquestes mutacions, que donen alteració d'unió al sucre i al catió, formen part d'un grup important situades en diferents regions de la membrana les quals es suposen

properes a nivell d'estructura terciària. Un altre treball que va estudiar més a fons aquestes mateixes mutacions d'aminoàcids i d'altres mutacions al costat C-terminal (Botfield and Wilson, 1989), indica que les hèlix III, IV, VI, IX i X formen part de la regió de reconeixement del sucre i el catió. S'ha de tenir en compte però, que en l'època que es va fer aquest estudi, l'estructura predita en aquells moments per anàlisi d'hidrofobicitat era de 11 hèlix transmembrana, amb els costat N-terminal al citoplasma i el C-terminal en el periplasma de la cèl·lula. Els resultats sobre les mutacions al costat C-terminal indicaven que aquesta regió és més important per a la inserció i estabilitat de la MelB en la membrana que no pas pel reconeixement dels substrats. Aquests dos primers treballs, resulten en observacions no del tot certes, ja que a més de no tenir en compte el model topològic predit fins avui dia, tampoc es podien fer els estudis sobre la proteïna purificada i reconstituïa en membrana artificial, lliure d'artefactes de la pròpia membrana cel·lular. Tot i així un treball realitzat molt poc després, amb un anticòs específic pel costat C-terminal de la MelB, trobava que aquest es localitza a la cara citoplasmàtica i que per tant la proteïna ha de tenir 10 o 12 segments transmembrana, i no pas 11 com es creia fins aleshores (Botfield and Wilson, 1989).

El primer model topològic de la MelB més semblant a l'actual és el predit per Botfield and Wilson (1992), que a resultes dels experiments realitzats amb fosfatasa alcalina complementat amb els resultats de la predicció per anàlisi d'hidrofobicitat de Goldman-Engelman-Steitz", obtenen un model topològic d'estructura secundària de 12 segments transmembrana d'uns 20 residus, cadascun format per 2 grups de 6 segments transmembrana i un llaç central (llaç 6-7) molt llarg que els uneix i amb el costat C-terminal i N-terminal al citoplasma cel·lular. A diferència dels altres models predits fins aleshores, aquest s'assembla molt als models predits per altres transportadors bacterians com el de lactosa (LacY), el d'arabinosa, el de xilosa, el transportador de citrat, el transportador de glucosa de cervell de rata, la família de transportadors de glucosa de teixits humans i els transportadors resistents a multi-drogues dels humans, ratolins i hámsters (Henderson et al., 1990).

L'any 1995, es publicà el primer protocol de purificació de la MelB de forma activa (Pourcher et al., 1995) de manera que l'opció d'estudiar la seva estructura es feu possible. A més, en aquest mateix treball es trobaven que el costat N-terminal

constava de 4 residus més, per tant la proteïna constava de 473 aminoàcids. Així doncs, a partir de la purificació de la MelB en estat actiu, es va fer possible l'estudi estructural de la MelB (Pourcher et al., 1996; Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996; Cordat et al., 2000), indispensable per a la comprensió del mecanisme d'acció de la proteïna. D'aquesta manera, Pourcher et al. (1996) mitjançant la mateixa tècnica emprada en el treball de Botfield and Wilson (1992) sobre quimeres de la MelB (amb fosfatasa alcalina), van proposar un model topològic d'estructura secundària de 12 hèlix transmembrana, amb el costat C- i N-terminal a la cara citoplasmàtica, però amb el llaç central (llaç 6-7) molt més curt i per tant com a conseqüència molts aminoàcids localitzats en dominis hidrofílics es veuen desplaçats cap a dominis hidrofòbics (vegeu figura 1.5).

Per altra banda, també es començaren a fer estudis espectroscòpics de fluorescència de la MelB purificada i reconstituïda en liposomes, en funció de l'addició de substrats (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996). El primer estudi (Mus-Veteau et al., 1995), observà que la MelB sofria canvis conformacionals selectius i cooperatius si més no en l'entorn dels triptòfans per l'addició de substrats seguint un mateix patró, independentment de l'ordre d'addició d'aquests substrats. L'addició del catió Na^+ (10 mM) resultava en una disminució del 2% del senyal total de fluorescència i per contra, l'addició de melibiosa (10 mM) augmentava el senyal total fins a un 15%. Per tal de trobar quins dels 8 triptòfans de la MelB del costat C-terminal i el N-terminal estaven implicats en els canvis de senyal de fluorescència per l'addició de substrats, es feren mutants dels 2 triptòfans del costat C-terminal substituïts per fenilalanines, W299F i el W342F (Mus-Veteau and Leblanc, 1996). Cap dels mutants individuals, W299 i W342, ni el doble mutant W299/W342, inhibiren significativament la funció de transport de la MelB. L'addició de Na^+ o Li^+ resultava en una disminució del 2% del senyal de fluorescència igual que a la MelB salvatge, cosa que s'explica si la variació de senyal del catió és dependent bàsicament del costat N-terminal. En canvi, la unió d' α - i β -galactòsids a qualsevol dels tres mutants incrementava el senyal de fluorescència, però es produïa un desplaçament de 10 nm cap al blau indicant una disminució de l'accessibilitat al solvent degut a la unió del sucre molt propera als residus W299 i W342. L'addició de TMG però, també incrementa la fluorescència dels triptòfans N-terminal cosa que

indica una proximitat entre alguna o algunes hèlixs del costat N-terminal al lloc d'unió del sucre. Aquesta observació indicaria que a nivell 3D les hèlix IX i X estan pròximes al costat N-terminal. Aquest últim treball ens dóna una idea més real de la relació estructura i funció del transportador, ja que observem els canvis produïts en les diferents regions durant l'addició de substrats.

Un treball posterior (Gwizdek et al., 1997), estudià el model topològic d'estructura secundària des d'una vessant també més fisiològica en la línia del treball anterior, és a dir, quines parts de l'estructura secundària estan exposades al periplasma i citoplasma durant el funcionament del transportador. El treball es centrà bàsicament en la proteòlisi limitada de les regions accessibles de la MelB per una fosfatasa alcalina en absència o amb un o ambdós substrats. Els resultats de la digestió de la MelB sense substrats, és a dir del complex binari H^+ /MelB, indicaven que els llaços 4-5, 6-7 i el 10-11 estan a la cara citoplasmàtica i els llaços periplàsmics són altament resistents a la digestió per proteases. Tot i així, quan s'addicionaven els cations Li^+ o Na^+ , el llaç 4-5 incrementava la seva resistència a ser digerit, cosa que indicaria que està a prop del lloc d'unió al catió. Encara més, quan es realitzava la digestió de la MelB en presència de qualsevol dels cations Li^+ o Na^+ més la melibiosa, encara incrementava molt més el grau de resistència a la digestió per proteases indicant que el llaç 4-5 està prop del lloc d'unió del sucre i el catió i que per tant interaccionen en un grau més o menys elevat com a conseqüència dels canvis conformacionals produïts. Per contra, el complex ternari H^+ /mel/MelB no conferia resistència a la digestió d'aquest llaç. Durant el mateix any, es publicà un altre estudi mitjançant la tècnica de mutagènesi dirigida encaminat a l'estudi de l'estructura de la MelB (Weissborn et al., 1997). En concret, es van realitzar mutants de cada una o totes quatre cisteïnes que té el transportador, substituïdes per serina o valina i posteriorment s'addicionava N-ethylmaleimide (reactiu específic per als grups sulfidril) que hi reacciona. Els resultats van indicar que només la Cys364 és diana del reactiu i que cap de les cisteïnes té un paper essencial per al funcionament de la MelB. Durant aquests últims cinc anys, la tècnica de mutagènesi dirigida es transforma en la eina més important per a la localització de residus importants en l'estructura i funció de la MelB (Wilson and Wilson, 1998; Franco et al., 2001; Ambroise et al., 2000; Abdel Dayem et al., 2003).

Dins del camp de la mutagènesi dirigida, l'obtenció de dobles mutants és una tècnica d'ús creixent durant aquests últims anys, per a moltes proteïnes i també per a la MelB (Wilson et al., 1995; Wilson and Wilson., 1998; Ding and Wilson, 2000). En el cas de la MelB, la tècnica consisteix en la incubació en plaques de fermentació amb melibiosa (d'agar Mc Conkey) de mutants de cèl·lules d'*E.coli* amb la funció de transport deficient o quasi deficient. Al cap d'uns dies comencen a créixer colònies fermentadores, les quals un cop s'ha analitzat el seu DNA, contenen dues mutacions que reverteixen l'efecte de la mutació inicial individual. La interpretació dels resultats es basa en el fet, que les dobles mutacions obtingudes han d'estar pròximes a nivell 3D, perquè s'originin i així poder revertir l'efecte de la primera mutació. Wilson and Wilson (1998), ens mostraren un treball que constava en l'obtenció de dobles mutants que revertien les primeres mutacions de l'Asp124 per Ser, Ile o Phe. Els resultats indicaven que només els mutants D124F i D124S donaven alteracions de la funció i només el D124S donava dobles mutants D124S/V375A i D124S/V375G, suggerint que l'hèlix IV on es situa l'Asp124 i l'hèlix XI on es situa la Val375 estan properes. El paper de l'Arg-52 també s'estudià amb més profunditat mutant-la i obtenint els seus dobles mutants, suggerint que la inserció de càrregues positives a les hèlix transmembrana neutralitzen l'efecte de la pèrdua d'aquesta arginina (Franco and Wilson, 1999). Més concretament, l'hèlix II està pròxima a les hèlixs I, IV, i VII per mitjà d'un pont salí entre l'Arg-52 i l'Arg-55 (hèlix II) i l'Asp-19 (hèlix I).

La combinació de la tècnica de mutagènesi dirigida substituint aminoàcids per cisteïnes i l'addició de reactius sulfídrics que reaccionen amb elles, també suposa una bona eina d'estudi per a la ubicació d'aminoàcids dins l'estructura topogràfica predita (Weissborn et al., 1997). Matsuzaki et al. (1999) van estudiar els mutants de cisteïna dels aminoàcids 39 al 66 gran part dels quals es situen a l'hèlix II, la qual juga un paper molt important en la unió del catió co-transportador (Pourcher et al., 1993; Zani et al., 1994). L'anàlisi consisteix en aplicar un reactiu sulfúric que reacciona amb les cisteïnes accessibles que no estiguin protegides per la unió de substrats o per una configuració estructural determinada. Els resultats van indicar que els aminoàcids A56, I53, A51, F48, G45, V44 estan situats en la part més hidrofílica de la hèlix i com a conseqüència els autors van suggerir que aquests aminoàcids formen part del camí de la melibiosa i del catió associat. En un treball

recent (Ding and Wilson, 2000), es va demostrar mitjançant l'anàlisi de dobles mutants que existeix interacció entre l'hèlix XI i les hèlixs I, II i V. De la mateixa manera, un altre treball que també estudià els dobles mutants obtinguts de la mutació Lys377-Val de l'hèlix XI, indicava que aquesta està propera a l'hèlix II (Franco et al., 2001), cosa que corroboraria els resultats mostrats en el treball anterior de Ding and Wilson (2000).

Tot i que l'obtenció de mutants que reverteixen mutacions és una bona eina per a l'obtenció d'informació estructural de la proteïna, l'estudi sobre mutants únics els quals presenten anormalitats en la unió i transport de substrats, també són capaços de donar informació valuosa (Ding et al., 2000). Aquest estudi va donar evidències de la proximitat entre l'hèlix II i les hèlixs I, IV, VII i X i per altra banda de l'hèlix IV amb la IX formant part del canal per on es transporta el catió/substrat. Un altre treball del mateix grup (Ding and Wilson, 2001), va combinar els dos mètodes de mutants de cisteïna i d'addició d'un agent sulfídric sobre l'hèlix I, resultant en l'observació que aquesta hèlix està completament rodejada d'un ambient aquós i l'anàlisi dels dobles mutants obtinguts de les mutacions originals K18C i Y31C indiquen que les hèlixs I, IV i VII estan properes en l'espai 3D. La Taula 1.III ens mostra les dades de les mutacions realitzades a la MelB i el seu efecte, fins a dia d'avui. S'ha de tenir en compte, que les mutacions s'han ubicat segons el model d'estructura topològica de la MelB més recent, proposat per Pourcher et al. (1996).

Totes aquestes dades complementades amb els experiments realitzats per espectroscòpia, representen un bon avenç en l'estudi de l'estructura i funció de la MelB (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996; Maehrel et al., 1998; Cordat et al., 1998; Cordat et al., 2000). Existeixen varies propostes de models d'organització de les hèlixs de la MelB molt similars entre sí, però el model proposat per Cordat et al. (2000) sembla ser el que engloba d'una més clara els resultats obtinguts fins ara (figura 1.9).

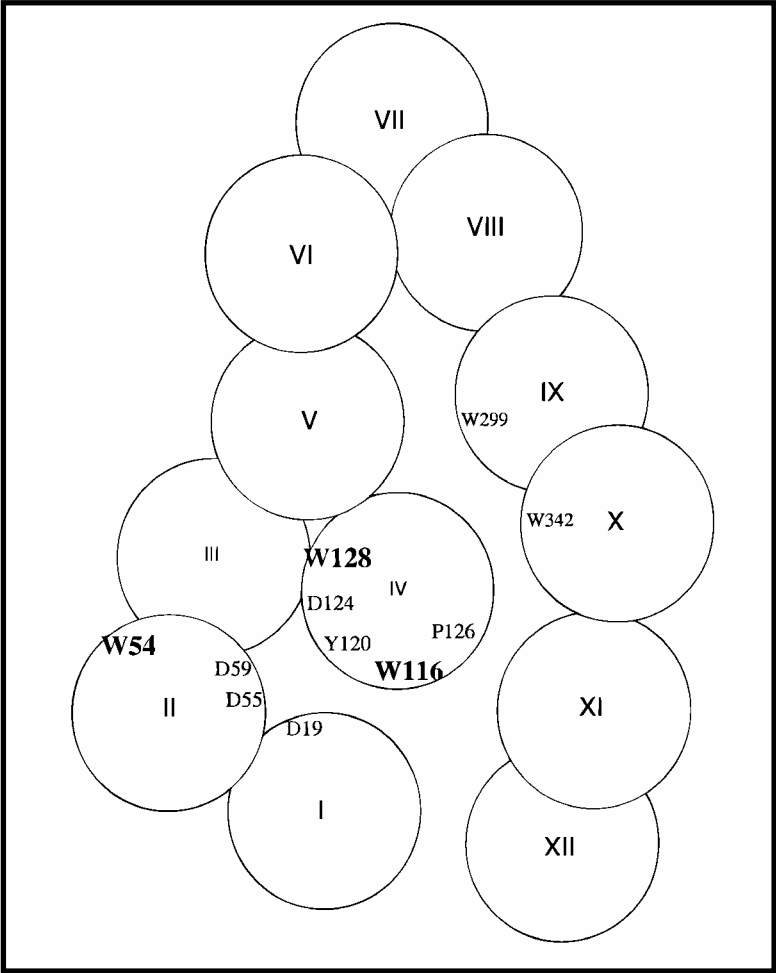


Figura 1.9. Model bidimensional de disposició de les hèlixs α de la MelB proposat per Cordat et al. (2000). L'hèlix IV fa de nexa d'unió entre el costat N- i C-terminal.

Per altra banda, s'han obtingut cristalls 2D de la MelB i han sigut analitzats per difracció d'electrons a 8 Å de resolució (Hacksell et al., 2002). Els resultats han reafirmat l'existència de 12 hèlixs α transmembrana disposades asimètricament en dos dominis, 4 de les hèlixs d'un domini, no toquen cap molècula de lípid, de manera que rodegen una esquadra curvilínia central. Encara més, aproximadament una tercera part de les hèlixs es situen perpendicularment a la superfície de la membrana i les dues terceres parts restants, presenten un angle determinat d'inclinació respecte la normal del pla de la membrana.

Tots aquest estudis són realitzats sobre la proteïna directament, però no sabem com afecta l'ambient que l'envolta en la seva estructura i funció. Un treball recent (Dumas et al., 2000), estudià l'activitat de la MelB en funció de la llargada de la cadena acílica dels lípids de PC (fosfatidilcolina) monoinsaturats de liposomes en fase líquida. Els resultats indiquen que la llargada de la cadena acílica dels lípids no tenen cap influència en la unió de la melibiosa però sí en el seu transport. Encara més, quan la llargada de la cadena acílica és igual a la de la MelB aquesta té una activitat màxima.

Taula 1.III. Classificació de l'efecte de les mutacions més importants

Mutacions i localització	Efecte funcional i/o estructural	Referències
N-terminal	Defecte de la unió al catió	Hama and Wilson, 1993
P146S (llaç 4-5 molt proper a hèlix V), L236F i A240V (hèlix VII)	Diferents regions pels cations. Una per Na ⁺ i una altra per H ⁺ i Li ⁺	Kawakami et al., 1988
H94	No inserció i estabilitat a la membrana	Pourcher et al; 1992
D19C (hèlix I), D55C i D59C (hèlix II) i D124C (hèlix IV)	Pèrdua capacitat de transport amb el catió Na ⁺ Altera les propietats de selecció catiònica	Pourcher et al., 1993 Zani et al., 1993
5 aminoàcids (hèlix I) i (hèlix II) Costat C-terminal	No reconeixement del catió Na ⁺ Essencial pel reconeixement i transport	Hama and Wislon, 1994
Mutacions als aminoàcids pròxims a D19, D55, D59 i D124	Disminució del transport amb el catió Na	Zani et al., 1994
W299, W342 i W299/W342	No unió al sucre	Mus-Veteau and Leblanc, 1996
C364 (llaç 10-11) Cys-less	Important pel funcionament No té cap efecte sobre el funcionament	Weissborn et al., 1997
A52 (Hèlix II)	No uneix H ⁺ i es redueix dràsticament el transport amb Na ⁺	Franco and Wilson, 1999
W116F (hèlix IV) i W128F (llaç 4-5)	Paper important en el transport d'ambdós substrats catió/solut	Cordat et al., 2000
G365C	Inhibició del transport de melibiosa	Ding and Wilson, 2000
G17C, K18C, D19C, Y32C, T34C i D35C (hèlix I)	Pèrdua de l'activitat de transport	Ding and Wilson, 2001
K377V (llaç10-11 molt proper a hèlix XI) D59K (hèlix II)	Deficient acumulació de melibiosa No acumula melibiosa	Franco et al., 2001
D55 (hèlix II) i D124 (Hèlix IV)	La configuració de les càrregues i l'estructura dels Aa són importants pel manteniment del transport	Ding and Wilson, 2001
R141C	Uneix substrats però no els transporta	Abdel Dayem et al., 2003
R149C	No uneix ni transporta substrats	

1. 2. 5. El mutant R141C

El mutant R141C de la MelB d'*Escherichia coli* també s'ha estudiat paral·lelament a l'estudi de la MelB salvatge, per tal de poder comparar diferències i similituds en l'estructura i funció. Quan es va poder purificar i reconstituir en lípids (Abdel Dayem et al., 2003) es va dur a terme el seu estudi a nivell de bescanvi hidrogen/deuteri i de polarització, en diferents condicions de substrats per espectroscòpia ATR-FTIR. Així doncs, al tractar-se d'una de les mostres estudiades en aquest treball, és interessant fer una descripció de les seves principals característiques.

Tal com s'ha explicat a l'apartat anterior, uns estudis realitzats anteriorment sobre el fotomarcatge i la proteòlisi limitada de la MelB, suggereixen que un dels quatre aminoàcids bàsics del llaç citoplasmàtic 4-5 (Arg141) (vegeu figura 1.5), té un paper molt important en la funció de transport simport (Gwizdek et al., 1997; Ambroise et al., 2000). Per aquest motiu, s'ha estudiat els aminoàcids bàsics del llaç 4-5, mutant-los per cisteïnes (Abdel Dayem et al., 2003) i els resultats indiquen que les Arg-141 i Arg-149 són essencials per l'activitat del transport de la MelB. El mutant R149C és totalment inactiu, perquè no uneix i no transporta. El mutant R141C en concret, té inhibits el transport i el flux de substrats no depenent d'energia però sí que uneix ambdós substrats. La K_D pel α -[3H]NPG del mutant R141C és de 2.5 (de 3 a 4 vegades menys afinitat que la MelB), però en canvi no van trobar canvis significatius en la K_D del sucre en presència de sodi. Si s'introdueix una càrrega positiva mitjançant un agent tiòlic es recupera parcialment el transport de substrats. Per altra banda, no es va aconseguir obtenir dobles mutants que revertien la mutació R141C i per tant no es pot assegurar que la càrrega positiva a la posició 141 s'uneixi a una càrrega negativa desconeguda. Tot i així, s'ha demostrat la importància del residu Arg141, el qual pot estar involucrat directament en la reacció de translocació del co-substrat o en el desenllaç del substrat a la cara interna de la membrana.

1. 3. L'espectroscòpia vibracional per a l'estudi de proteïnes

L'espectroscòpia vibracional, RAMAN, ressonància RAMAN i espectroscòpia d'infraroig (sobretot amb transformada de Fourier) han estat àmpliament utilitzades per l'estudi de proteïnes. L'espectre vibracional d'una molècula ve determinat per l'estructura tridimensional i pel camp de forces vibracionals i per tant, l'anàlisi d'aquest tipus d'espectres pot aportar informació de l'estructura molecular i de les interaccions inter- i intramoleculars. Essencialment, podem distingir dues grans àrees de recerca, la primera es centra en l'estudi de l'estructura secundària de macromolècules biològiques utilitzant bàsicament l'espectroscòpia d'infraroig FTIR i l'altre és l'estudi molecular de mecanismes enzimàtics, que involucra les espectroscòpies RAMAN, ressonància RAMAN i FTIR de diferència. L'espectroscòpia vibracional és altament sensible a qualsevol canvi de l'estructura i a les interaccions moleculars, i per tant, amb la col·laboració d'altres mètodes d'anàlisi d'estructura podem aprofundir molt en el coneixement del funcionament i l'estructura molecular de les molècules biològiques (Vogel and Siebert, 2000).

El present treball, s'ha dividit essencialment en dues parts que consten primerament en l'estudi de l'estructura secundària de la MelB mitjançant FTIR de transmissió i per últim l'estudi de l'estructura i funció d'aquesta mitjançant ATR-FTIR. Evidentment, per a l'estudi de l'estructura d'una proteïna, les eines més potents són la difracció de Raigs-X i l'espectroscòpia de NMR. Però fins a dia d'avui, la gran dificultat per cristal·litzar aquestes proteïnes de membrana i en general, la seva grandària fan de l'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier una gran candidata per a l'estudi de moltes proteïnes de membrana i per tant, de la MelB en el nostre cas concret. Cal afegir, que tot i que la cristal·lització és possible, segueix sent molt difícil conèixer la fisiologia dels sistemes proteics i per tant encara constitueix una eina complementària molt poderosa per a l'obtenció de la seva estructura 3D.

1. 3. 1. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)

L'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier, és una tècnica que es basa en l'absorció de la llum infraroja per part de les molècules o macromolècules a estudiar. La condició essencial perquè es produeixi absorció de la llum infraroja és que l'energia de la radiació incident es correspongui amb la diferència d'energia

entre nivells vibracionals d'una molècula. Les transicions només es poden donar entre nivells vibracionals adjacents, implicant un canvi en el moment dipolar de l'enllaç que absorbeix la radiació. D'aquesta manera obtenim una sèrie de bandes en un espectre d'absorció, que provenen d'aquestes vibracions moleculars. És un mètode molt apropiat per a l'estudi de proteïnes de membrana (Cabiaux et al., 1997; Lórenz et al., 2001; le Coutre et al., 2002), ja que degut a l'elevada longitud d'ona de l'infraroig els problemes de dispersió són quasi inexistents. A més, la sensibilitat és molt alta, i amb una relativa poca quantitat de proteïna és possible estudiar proteïnes en membranes biològiques intactes ja que les bandes d'absorció dels lípids i de les proteïnes estan poc sobreposades i per tant es poden estudiar individualment quasi sense interferència (Vigano et al., 2000).

Des del punt de vista pràctic, l'obtenció d'informació de les bandes més importants en les proteïnes, les bandes amida, presenta el problema de resolució de les bandes constituents, ja que són bandes amples superposades unes amb altres, de manera que no són gens senzilles de separar individualment per al seu estudi. Així doncs, fins que els mètodes matemàtics d'aprimament de bandes no es posaren a la pràctica i milloraren, no es va resoldre el problema. El mètode matemàtic d'autodesconvolució (aprimament de les bandes) de Fourier (FSD) proposat per Kaupinen et al. (1981), és el procediment més acceptat i utilitzat fins a dia d'avui. El mètode permet resoldre les bandes de manera que es pot quantificar l'estructura secundària de la proteïna, a més de millorar la informació qualitativa. Tot i així, a la pràctica segueix sent un repte l'obtenció d'espectres i un anàlisi acurat d'aquests, perquè els tractaments de desconvolució sempre produeixen una petita distorsió de l'espectre original. La millora en el procediment experimental i en l'anàlisi matemàtic són elements que s'han tingut en compte en aquest treball, a l'hora de la valoració dels resultats.

La descripció abreviada d'un aparell de FTIR de transmissió (figura 1.10) és la següent: consta d'una font de llum infraroja que mitjançant un "beamsplitter" (mirall divisor del feix de llum) divideix el feix de llum d'IR en dos, dirigint-los un a un mirall fix i un altre a un mirall mòbil (que recorre una distància determinada). Els dos feixos de llum es tornen a unir en el divisor de feix, on es produeix una interferència entre ells i es dirigeixen cap a la mostra. La llum que l'ha travessat és recollida per un

detector. El senyal recollit és l'interferograma que mitjançant l'aplicació d'una sèrie de funcions, es transforma en l'espectre d'absorció.

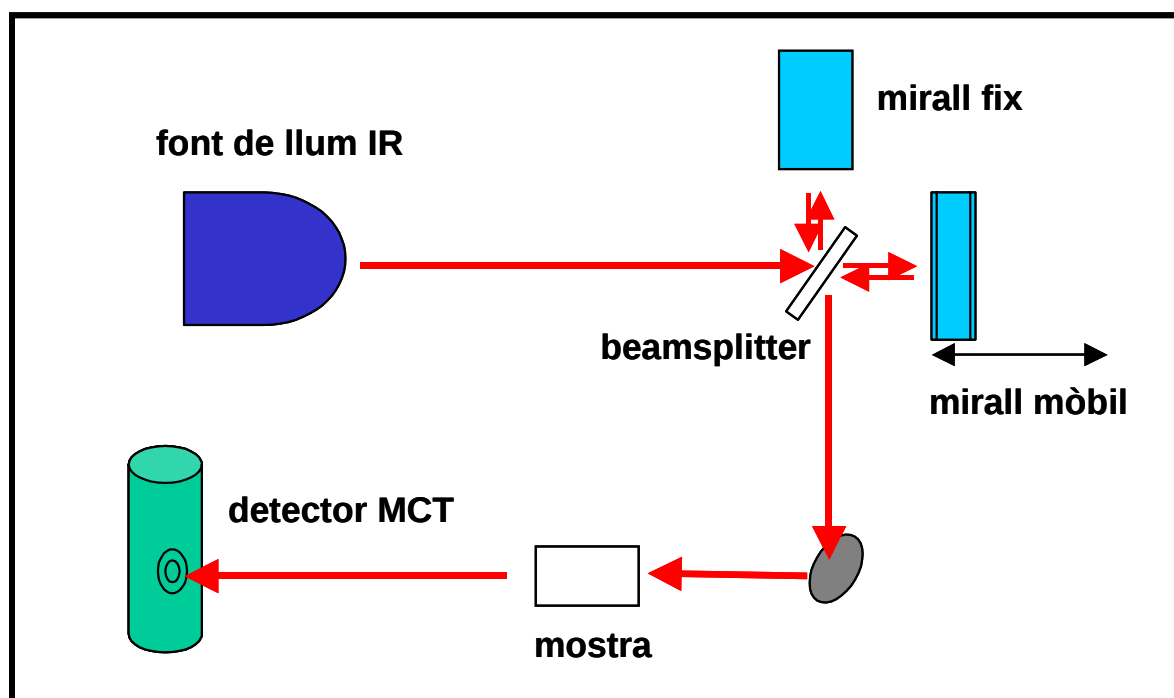


Figura 1.10. Esquema d'un aparell de FTIR

1. 3. 2. Introducció al tractament matemàtic per a l'obtenció de les dades

A grans trets, la senyal de l'interferograma ve donada per la recombinació dels feixos de llum provinents del mirall fix i del mòbil. La longitud del recorregut d'un dels feixos varia amb el moviment del mirall mòbil. Si les dues longituds del recorregut del mirall fix i del mirall mòbil són iguals, no existirà diferència de fase i per tant es recombinaran de forma constructiva per totes les freqüències presents en el feix de llum original. Si per contra, les longituds del recorregut són diferents, la recombinació de la senyal de llum dependrà de la freqüència i de la distància a la que estarà el mirall mòbil (el retard).

El primer tractament que pateix l'interferograma, és l'aplicació fictícia d'una funció anomenada "boxcar" degut a la seva forma (vegeu figura 2.4 de materials i mètodes) que és conseqüència del fet que el mirall mòbil no es pot desplaçar més

enllà d'una distància l . El resultat és igualar a zero la senyal que correspon a les distàncies per sobre del retard màxim del mirall mòbil. Val a dir, que la mida adequada del retard màxim del mirall (distància l) és un compromís entre la distància suficient per a una bona resolució i una disminució del soroll. El resultat és l'obtenció d'un interferograma amb una banda central molt intensa i una sèrie de lòbuls laterals. Per tal de disminuir aquestes oscil·lacions laterals i donar forma a la línia instrumental, s'aplica d'una funció d'apodització abans de procedir a la transformada de Fourier a l'interferograma. La funció d'apodització utilitzada en el nostre cas és la funció triangle que és la més utilitzada per l'espectroscòpia FTIR de mostres biològiques. La transformació de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat ens dona l'espectre d'absorció.

Una de les conseqüències de l'aplicació d'aquests tractaments matemàtics resulten en un millora relació senyal/soroll (SNR) de l'espectre (Griffiths and Haseth, 1986). L'apodització n'és un exemple ja que al disminuir els lòbuls laterals de l'interferograma ens evita l'aparició de bandes relativament amples per l'aplicació de la transformada de Fourier. De la mateixa manera, el truncament de l'interferograma realitzat per la funció **boxcar** de la zona que mesura a una resolució més baixa, també tindrà un efecte en l'increment de la SNR dels espectres amb bandes amples ja que les freqüències espacials altes no es mesuren.

Un cop ja tenim un espectre d'absorció, amb una SNR elevada que seria la situació més ideal, el primer procediment matemàtic a aplicar és la resta digital de la contribució de l'aigua (tampó). Si es substitueix l'aigua per deuteri, aquesta resta és molt més fàcil de realitzar, ja que el deuteri no absorbeix en les zones d'interès on sí absorbeix l'aigua. Seguidament procedim a l'obtenció de les bandes individuals que componen aquestes bandes amples de què parlàvem abans. En el cas d'una proteïna, obtenim les diferents bandes amida i les bandes lípid. Les bandes amida, que són del nostre interès, són bastant amples de manera que sense tractament addicional no podem obtenir cap informació sobre les bandes individuals que la componen. Avui en dia, existeixen diversos tipus de tractaments matemàtics per a l'aprimament de les bandes, un és el de FSD (Fourier self-deconvolution; la autodesconvolució de Fourier) (Kauppinen et al., 1981; Kauppinen et al., 1981; Kauppinen et al., 1981) i un altre és el MEM (maximum entropy method, el mètode

de màxima entropia) (Stephenson, 1988). En el present treball, s'ha utilitzat el FSD per al càlcul de l'estructura secundària de la proteïna i per a l'anàlisi comparatiu dels espectres de polarització del mutant R141C i la MelB salvatge s'ha utilitzat un sistema de desconvolució basat en el mètode de regularització no lineal MEM (vegeu tesis Lòrenz-Fonfría, 2003). Així doncs, sigui quin sigui el mètode l'aprimament de les bandes rep del nom de desconvolució de manera que obtenim cada una de les bandes individuals que componen les bandes amida de la proteïna. Per raons d'obtenció d'informació d'interès i facilitat en la seva interpretació, la banda amida I és l'escollida per a desconvolar, de manera que ens donarà informació sobre l'estructura secundària de la proteïna (Susi et al., 1967; Timascheff, 1967).

Un cop s'ha desconvulat la banda d'amida I, es sotmet l'espectre a la quantificació de cada una de les bandes individuals que componen l'amida I per un procés matemàtic d'ajust de les bandes, de manera que podem obtenir l'àrea de cada una de les bandes. L'assignació de les bandes a cada tipus d'estructura secundària és un procés àmpliament estudiat, i tot i les petites variacions existents degudes a la gran varietat de proteïnes i les dificultats generades per la superposició de zones corresponents a estructures secundàries diverses, s'han pogut caracteritzar bé les diferents regions (Byler and Susi, 1986; Goormaghtigh et al., 1994).

1. 3. 3. El mètode ATR-FTIR per a l'estudi de proteïnes de membrana

Durant aquests últims anys, l'espectroscòpia d'ATR-FTIR (attenuated total reflection-Fourier Transform Infrared) ha esdevingut un dels mètodes més potents per determinar l'estructura de components de membranes biològiques. L'aplicació de l'ATR-FTIR, presenta unes avantatges addicionals de les ja descrites per FTIR de transmissió (es necessita molt poca quantitat de proteïna (1-100 µg) i els espectres es mesuren en qüestió de minuts), i és que es pot modificar l'ambient de la mostra de manera que la conformació de la proteïna es pot estudiar en diferents condicions de pH, temperatura, pressió o en presència de substrats específics (Vigano et al., 2000). De la mateixa manera, també podem mesurar canvis en l'estructura terciària mitjançant l'obtenció d'una cinètica de bescanvi de protons per deuterons de la

proteïna i l'estudi de l'orientació d'algunes de les estructures secundàries (Goormaghtigh et al., 1999).

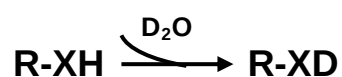
L'ATR- FTIR consta de l'aparell d'infraroig més un accessori d'ATR (figura 1.11) amb miralls, que determinen l'angle del feix de llum que ha de travessar la mostra i un element de reflexió interna (IRE) on es disposa la mostra. El feix de llum infraroja entra a dins l'IRE amb un angle determinat (45° en el nostre cas) i va travessant la mostra per cada una de les reflexions produïdes. El nombre de reflexions produïdes dependrà de la mida del IRE i com més reflexions tindrem més intensitat de senyal. La última reflexió és recollida per un dels miralls (el de sortida) i és dirigida cap al detector. Un cop arribada la senyal al detector, es processa tal com s'ha comentat anteriorment i obtenim l'espectre d'absorció d'ATR. Així doncs, tot i que es tracta de la mateixa espectroscòpia, els espectres d'ATR presenten una sèrie de característiques pròpies i lleugerament diferents dels espectres FTIR de transmissió. La forma de les bandes de l'espectre d'ATR depèn dels següents paràmetres: de la longitud d'ona de la radiació incident, dels índexs de refracció de l'IRE i de la mostra, de l'angle d'incidència de la llum IR i de l'eficiència del contacte entre la mostra i l'IRE (Goormaghtigh et al., 1999). Cap d'aquests paràmetres són bons o dolents intrínsecament parlant, sinó que s'han d'adequar a les condicions i objectius experimentals. Per tant, un bon coneixement de les seves característiques i efectes ens ajudaran a escollir els paràmetres adients per a l'elaboració dels experiments. En general però, només en condicions de coeficients d'absorció molt elevats per part de la mostra o d'angles d'incidència de la llum IR propers a l'angle crític obtenim espectres d'absorció molt distorsionats de la realitat.

Així doncs, tot i les petites diferències entre l'espectre d'ATR i el real, l'espectroscòpia ATR-FTIR és una eina molt adequada per a l'estudi de proteïnes de membrana a nivell de canvis conformationals produïts per modificacions del medi. Encara més, la utilització de l'espectroscòpia d'IR amb ATR té algunes avantatges més respecte la de transmissió, tot i que canviï la forma de l'espectre d'absorció adquirit per ATR-FTIR. Una d'elles és que els espectres d'absorció estan molt més definits que els de FTIR de transmissió (Goormaghtigh et al., 1999). Una altra avantatge i no menys important, és que en els experiments de transmissió no podem estar segurs del gruix de la mostra, ja que s'ha observat que petites bombolles d'aire

o variacions en el pas de la llum, canvien el gruix de la mostra. Quan les mostres estan en aigua, el pas de llum utilitzat és molt prim ($6\ \mu\text{m}$) i per tant és difícil de reproduir d'experiment a experiment, cosa que per ATR això no succeeix així ja que el pas de llum sempre és el mateix.

1. 3. 3. 1. Cinètica de bescanvi hidrogen/deuteri per ATR-FTIR

Existeixen moltes formes de pertorbació d'un sistema, una d'elles és el bescanvi H/D (hidrogen/deuteri), que provoca una reacció entre el dissolvent (carregat de deuterons) i el solut carregat de protons:



on X és l'element o grup químic al que es troba unit l'hidrogen (H), R representa la resta d'elements o grups químics units a X i D és el deuteri. Essencialment, el mecanisme d'aquesta reacció depèn del pH i de la naturalesa química del grup X.

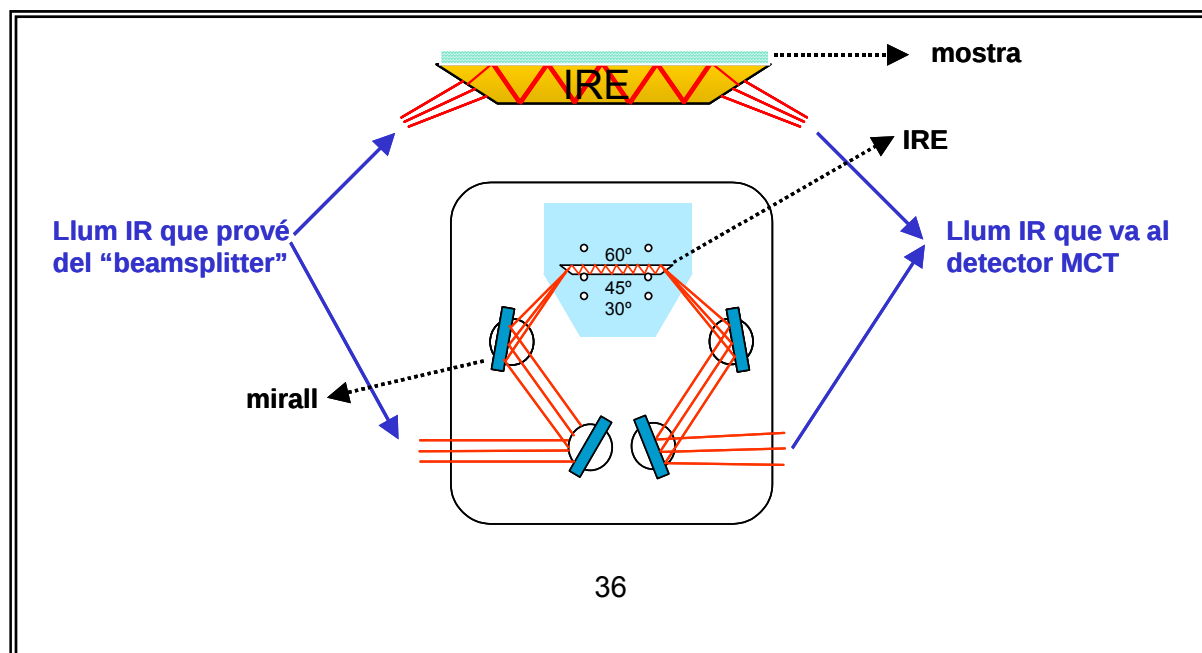


Figura 1.11. Esquema d'un accessori d'ATR. *Part inferior*, disposició dels miralls reflectors i el IRE (element de reflexió interna) amb un angle d'incidència del feix de llum de 45° . *Part superior*, vista ampliada de l'IRE, on es diposita el film de la mostra a analitzar.

El protó de l'enllaç amida ($R_1\text{-COO-NH-R}_2$) que forma la cadena polipeptídica de les proteïnes, pot bescanviar-se per un deuteró del medi, sempre que el protó de l'enllaç amida sigui mínimament accessible al medi aquós. És a dir, els protons que siguin inaccessibles degut a l'estructura on estan situats o perquè estan formant un pont d'hidrogen fort, no es bescanviaran per deuterons del medi. Així doncs, els estudis d'accessibilitat es realitzen mitjançant la utilització de deuterons; en el moment en què una proteïna es posi en presència d'aigua pesada, hi haurà una sèrie de protons que es bescanviaran per deuterons. Els canvis d'intensitat de la banda amida II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) de la proteïna, deguda principalment a la vibració –NH, es poden quantificar per espectroscòpia d'IR ja que la vibració –ND es desplaça uns 100 cm^{-1} cap a freqüències menors. D'aquesta manera podem obtenir informació del grau d'accessibilitat a l'ambient aquós i de l'estabilitat de la proteïna en diferents condicions de substrats (de Jongh et al., 1997). Encara més, la deuteració dels enllaços polipeptídics provoca un corriments d'uns $5\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ de la banda de l'amida I (Goormaghtigh et al., 1994). Degut al fet que la banda de l'amida I ens dóna informació sobre l'estructura secundària de la proteïna, un anàlisi acurat de la seva cinètica de bescanvi ens pot donar idea del grau d'accessibilitat de les diferents estructures secundàries (de Jongh et al., 1997; de Jongh et al., 1997).

El bescanvi H/D també es produeix a les cadenes laterals, però en aquest cas els protons són molt més làbils i per tant la gran majoria es bescanvien molt més ràpidament que els dels grups amida. La raó d'aquest fet ve donada per la relació de pK_a s dels grups que han d'acceptar o donar protons o deuterons (Englander et al., 1996). Per altra banda el bescanvi és de l'ordre de mil vegades més lent en

presència d'estructura secundària, perquè el bescanvi H/D necessita que l'enllaç no es trobi formant un pont d'hidrogen fort (Gregory and Rosenberg, 1986). Cal tenir en compte, que l'estructura terciària i les interaccions amb la membrana també afecten al bescanvi H/D. Així doncs, trobem que les zones que interaccionen amb la membrana tot i formar part de la mateixa estructura secundària, sofreixen un intercanvi menor (Dempsey and Butler, 1992) i que les zones de les hèlix interiors de la proteïna presenten un bescanvi H/D de 10-50 vegades menys que les que estan de cara al dissolvent (Clarke et al., 1997).

El bescanvi H/D és una tècnica àmpliament utilitzada per a l'anàlisi de l'estructura i dinàmica de les proteïnes i per identificar dominis submoleculars (Knox and Rosenberg, 1980; Gregory and Lumry, 1985; Clarke and Itzhaki, 1998). La cinètica de bescanvi H/D es pot mesurar per ATR-FTIR sobre films de proteoliposomes. Els canvis d'intensitat de les bandes amida II i amida I de la proteïna durant l'exposició a D₂O es poden seguir en temps real.

1. 3. 3. 2. Estudi de l'orientació de proteïnes per ATR-FTIR polaritzat

La possibilitat d'obtenir informació sobre l'orientació de fosfolípids i estructures secundàries de les proteïnes és una altra de les aplicacions importants de l'espectroscòpia ATR-FTIR (le Coutre et al., 1997; le Coutre et al., 1998; Grimard et al., 2001). El mètode es basa en el fet que la llum d'absorció d'IR és màxima quan el moment dipolar de transició és paral·lel al component del camp elèctric de la llum incident:

$$A \propto \left| \frac{\partial \mu}{\partial Q} \cdot \vec{E} \right|^2 = \left| \frac{\partial \mu}{\partial Q} \right|^2 \cdot |\vec{E}|^2 \cdot \cos^2 \Gamma$$

on Γ és l'angle entre $\frac{\partial \mu}{\partial Q}$ i $\vec{E}$. És a dir, si tenim una membrana ordenada damunt d'una superfície d'IRE (element de reflexió interna), totes les molècules i per tant, els moments de transició dipolars entre les molècules dins la membrana, tindran la mateixa orientació respecte a la normal de la superfície d'IRE.

Mesurant la intensitat de l'espectre canviant la polarització del feix de llum incident amb un polaritzador, podem obtenir informació sobre l'orientació dels dipols.

A la pràctica, el R^{ATR} que és la relació entre la integració de la banda d'absorció mesurada amb la llum incident polaritzada paral·lelament ($A_{\parallel}$) respecte la integració de la banda d'absorbància mesurada amb la llum incident polaritzada perpendicularment ($A_{\perp}$), ens dóna tota la informació sobre l'orientació de les molècules:

$$R^{ATR} = \frac{A_{\parallel}}{A_{\perp}}$$

L'estudi de l'orientació, mitjançant aquesta tècnica és una bona eina per a l'estudi de proteïnes de membrana i per tant de la MelB. Existeix un treball recent, esmentat anteriorment, que estudia cristalls bidimensionals de MelB per difracció de raigs-X (Hacksell et al., 2002) que indica que existeixen 7 hèlixs α transmembrana amb certa inclinació respecte a la normal de la bicapa lipídica. Encara més, els resultats suggereixen l'existència de 2 tipus d'angles d'inclinació d'hèlixs α definint un forat curvilini central. Tot i indicar l'existència d'inclinació d'algunes hèlixs, no ens dóna idea dels graus d'inclinació. L'aplicació d'aquesta tècnica de polarització de la llum mesurada per ATR-FTIR, ens proporcionarà aquesta dada. Existeixen altres treballs amb d'altres transportadors homòlegs a la MelB, com el cas del transportador de Nah (Williams, 2000) que indica que les hèlixs tenen de 10 a 27° d'inclinació respecte a la membrana. Resultaria molt interessant obtenir la mitjana dels graus de les hèlixs inclinades de la MelB, i establir posteriorment si existeix homologia amb d'altres transportadors de la superfamília dels transportadors de sodi.

1.4. La MelB com a model estructural i funcional d'altres transportadors de sucre

La caracterització de l'estructura i la funció de la MelB, és important perquè, pot servir com a guió per entendre l'estructura i funció d'altres co-transportadors amb Na^+ o H^+ de la mateixa família, que intervenen en diverses malalties o que són dianes de l'acció de fàrmacs i drogues. Un exemple d'aquests, són els transportadors de neurotransmissors pertanyents a la família dels SSF (Poolman and

Konings, 1993; Reizer et al., 1994) situats en les terminacions sinàptiques. A més de la funció de neurotransmissió, també juguen una paper molt important en la neuroregulació i el desenvolupament del cervell (Jursky and Nelson, 1999). Per aquestes raons, també estan implicats directament en l'acció de fàrmacs antidepressius i en processos de drogo-dependència (Pacholczyk et al., 1991; Tate et al., 1999). Tots aquests transportadors de neurotransmissors tenen característiques estructurals i funcionals homòlogues a la MelB, ja que consten de dotze o tretze hèlixs transmembrana i, a més, el transport és Na^+ -depenent (Uhl, 1992). També existeixen moltes malalties degudes a la mala absorció de glucosa, o bé degudes al transport deficient de glucosa al cervell, com la síndrome de la proteïna transportadora de glucosa (Klepper et al., 1999), o relacionades amb l'entrada de drogues que utilitzen el transportador de glucosa (Jolliet-Riant and Tillement, 1999). Cal indicar també que existeix un grau d'homologia funcional elevat entre el transportador de glucosa humà i la MelB; cosa que no passa amb la LacY d'*Escherichia coli*, el qual utilitza H^+ en comptes de Na^+ (Poolman and Konings, 1993; Reizer et al., 1994). De la mateixa manera, existeix una altra família de co-transportadors de membrana depenent de Na^+ , un membre de la qual és el transportador de sodi/iode de la tiroide, implicat en el hipotiroïdisme i el càncer de tiroide. Així, es plantegen teràpies d'acumulació de iode radioactiu per a tractar el càncer de mama (Tazebay et al., 2000), cosa que implica l'estudi en profunditat del transportador de iode, el qual té homologia funcional i estructural amb la MelB (Reizer et al., 1994). En definitiva, l'estudi en profunditat de la relació de l'estructura i funció de la MelB ens pot servir de model per d'altres transportadors homòlegs especialment eucariotes, els quals són difícils de purificar en estat actiu i en quantitats suficients pels estudis estructurals.

2. Objectius

Els transportadors de membrana són en general, proteïnes poc conegudes sobretot estructuralment parlant, degut en part a l'elevada dificultat d'obtenir cristalls d'aquestes proteïnes. Tot i que la MelB junt amb el transportador de lactosa d'*E.coli* (LacY) pertanyen al grup de transportadors de membrana sodi/solut més estudiats, la informació estructural és reduïda. El **primer objectiu** d'aquest treball és comprovar la predicció estructural de la MelB, que consisteix en un model topològic de dotze segments transmembrana, és a dir, trobar la composició d'estructura secundària de la MelB i la seva quantificació per espectroscòpia de FTIR. D'altra banda, estudis per espectroscòpia de fluorescència intrínseca trobaven canvis en la intensitat del senyal dels triptòfans de la proteïna, deguts a la unió de substrats. El **segon objectiu** doncs, és comprovar si aquests canvis són locals dels triptòfans de la proteïna o comprenen canvis conformationals a nivell d'estructura.

El **tercer objectiu** d'aquest treball és estudiar la cinètica de bescanvi H/D a nivell d'amida II i amida I de la MelB en diferents condicions de substrats, per tal d'identificar el tipus d'estructura implicada en els processos d'unió i transport de substrats. Per aquesta raó i pel fet de disposar d'un mutant de la MelB purificat i reconstituït en lípids, el R141C, el qual uneix substrats però no els transporta, el **quart objectiu** d'aquest treball va ser estudiar la cinètica de bescanvi H/D d'aquest mutant. El seu estudi ens pot donar informació sobre la dinàmica i accessibilitat de les estructures secundàries implicades solament el procés d'unió al substrats. El **cinquè objectiu** d'aquest treball és l'estudi de l'orientació de les estructures secundàries de la MelB salvatge i del mutant R141C en diferents condicions de substrats, mitjançant polarització per ATR-FTIR.

3. Mètodes experimentals

3. 1. Materials utilitzats

El p-Nitrophenyl α -D-(6- 3 H)galactopiranoside ($[^3\text{H}]\alpha$ -NPG es va sintetitzar al Laboratoire de Physiologie des Membranes Cellulaires, sota la direcció del Dr. B. Rosseau. La síntesi del LAPAO ((3-lauryl-amido)-N,N'-(dimethylamino) propylamine oxide) es va realitzar tal com està descrit per Brandolin et al. (1980). El dodecyl maltoside (DM) es va obtenir de Boehringer Mannheim i la resina Ni-NTA de Quiagen. Els SM-2 Bio-Beads es van obtenir de Bio-Rad. Els lípids totals d'*Escherichia coli* (precipitats amb acetona/éter) es van comprar a Avanti Polar Lipids. Per a preparar medis lliures de Na^+ (contenint menys de 20 mM de sals de sodi) es van utilitzar sals o elements químics altament purificats de Suprapur, Merk. La resta de materials utilitzats es van obtenir de fonts comercials.

3. 2. Obtenció de la MelB o el R141C purificats i reconstituïts

El procés de purificació i reconstitució de la MelB salvatge o el mutant R141C, comprèn diverses etapes que han de finalitzar en l'obtenció de la proteïna en estat pur, funcional i el més similar possible a l'estat natiu per a poder estudiar-la a nivell estructural real. L'estat més pròxim al natiu correspon a la proteïna reconstituïda en liposomes, però també s'ha obtingut i estudiat, la proteïna solubilitzada en detergent per a poder establir comparacions. La figura 3.1, ens mostra un esquema dels passos necessaris per a l'obtenció de la MelB salvatge o el mutant R141C llestos per a l'estudi estructural i funcional per espectroscòpia d'infraroig.

3. 2. 1. Obtenció de vesícules invertides de membrana (IMV's) amb MelB o R141C recombinants

La MelB salvatge es va obtenir a partir de cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades amb el plàsmid recombinant pK31 Δ AHB, tal com està descrit per Pourcher et al. (1995), que inclou un promotor tac dins el gen *melB*, acabat amb una successió de 6 triplets que es tradueixen per His a l'extrem 3'. Aquestes 6 histidines (6 His tag) confereixen a la MelB una alta afinitat pels ions níquel, de manera que permeten la seva purificació usant una columna de níquel Ni-NTA.

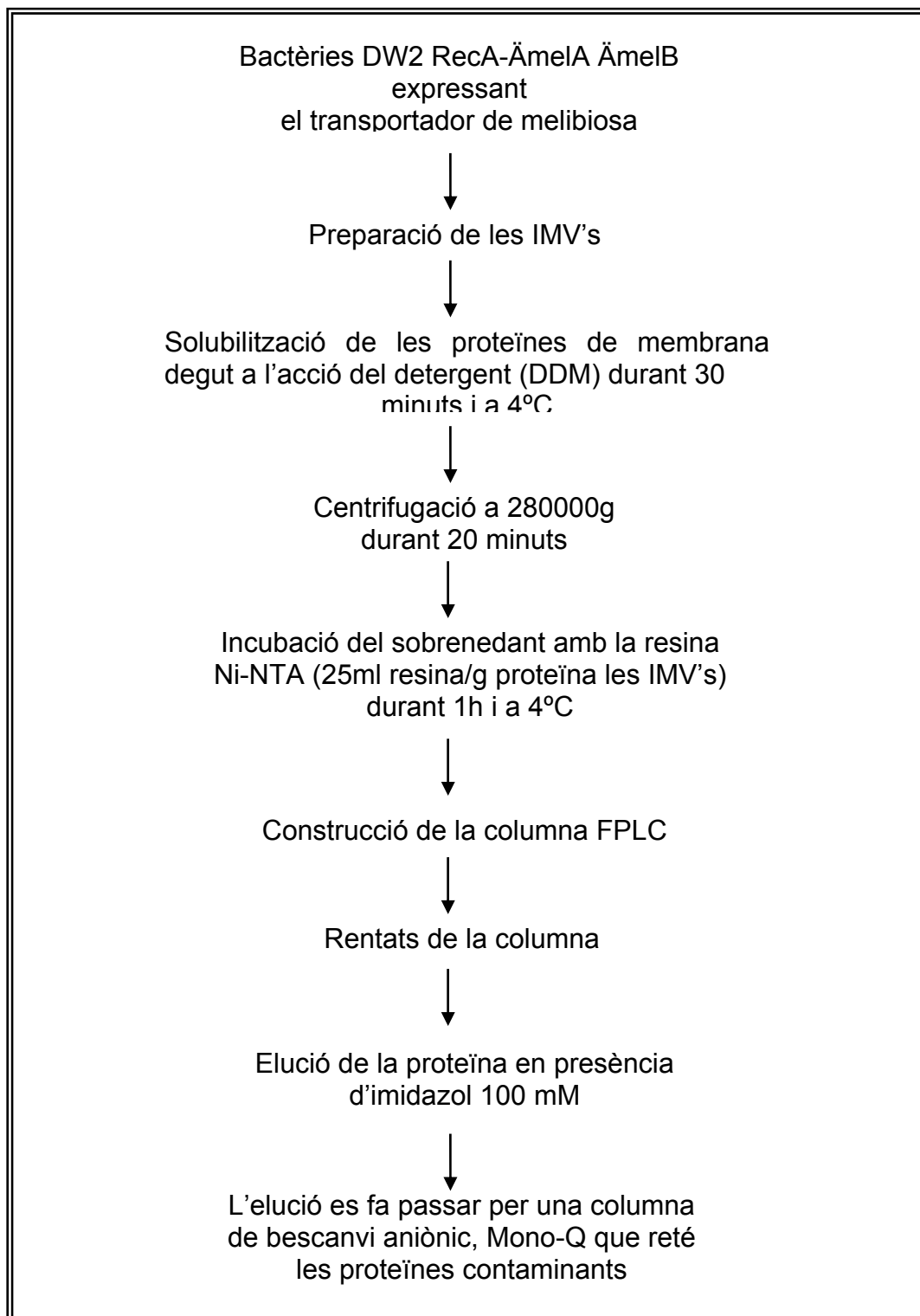


Figura 3.1. Esquema del protocol de purificació de la MelB.

El mutant R141C es va obtenir a partir de cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades amb el plàsmid recombinant pK95ΔAHB que contenia el gen *melB*, sense les seves cisteïnes natives (C-less). La Cys-235 es va reemplaçar per una valina i les Cys-110, Cys-310 i la Cys-364 per una serina, basant-se en els estudis anteriors fets per Poolman et al. (1996). La substitució de Cys es va produir per reaccions en cadena de polimerases (PCR) utilitzant els encebadors adequats (27-30 nucleòtids, Genosys). La MelB C-less conserva les mateixes característiques i manté els mateixos nivells d'expressió que la MelB salvatge (Weissborn et al., 1997). La substitució de l'Arg141 per una cisteïna es va realitzar sobre la seqüència de la MelB C-less mitjançant la tècnica de PCR. Finalment, tal com es va fer per la MelB, s'inclou un promotor tac dins el gen *melB* C-less amb la mutació R141C, corresponent a les histidines a l'extrem 3', per a la seva posterior purificació.

Les cèl·lules acabades de transformar amb la MelB salvatge o el mutant R141C recombinants es van fer créixer en 2 L de medi M9 (Life technologies, catàleg nº 10914-018) a 30°C amb un suplement de carboni i ampicilina (100 mg/ml) en el centre de fermentació de Marsella i posteriorment es van congelar a -80°C. Quan es va començar la purificació, es van descongelar aquestes cèl·lules fins a temperatura ambient i es van resuspendre a una concentració de 5mg/ml en un medi de tampó Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, al qual després es va afegir EDTA a una concentració final de 5 mM per tal de desestabilitzar la membrana bacteriana. Tots aquests passos es van realitzar a 4°C. Posteriorment, per tal de desmembrar les cèl·lules es va afegir DNAsa i RNAsa i MgSO₄ a unes concentracions finals de a 20 mg/ml i 15 mM, respectivament i es va sotmetre les cèl·lules a una pressió de 1200 Psi amb una French Press. Després d'aquest procés es va afegir EDTA en excés (a una concentració final de 15 mM). Les restes bacterianes es van centrifugar a 1200 g durant 5 minuts i les vesícules obtingudes del sobrenedant es van rentar amb tampó Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, β-mercaptoetanol 5 mM i sotmeses a una centrifugació durant 20 minuts a 280000 g. Un cop acabada la centrifugació, es va descartar el sobrenedant, es va resuspendre les IMV's amb el mateix tampó i es van congelar a -80°C.

3. 2. 2. Purificació de la MelB o el R141C

Tots els passos de la purificació es van realitzar a 4°C i es va dur a terme essencialment tal com descriu Pourcher et al. (1995). Les vesícules es van descongelar i rentar amb tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5 mM, Imidazol 10 mM. Posteriorment, es van solubilitzar les proteïnes de membrana amb LAPAO 1% (v/v) durant 20 minuts i es van centrifugar a 280000 g durant 20 minuts més per tal d'eliminar les restes de membrana bacteriana. Les proteïnes solubilitzades es van incubar durant 1 hora amb la resina de níquel Ni-NTA. Després es va construir una columna amb resina de Ni-NTA i seguidament, es va procedir als rentats de la columna, primer amb tampó Tris-HCl 20 mM pH8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5 mM, Imidazol 10 mM, LAPAO 0.1% (v/v), i el segon rentat es va fer amb el mateix tampó però substituint el NaCl 600 mM per NaCl 50 mM. El tercer rentat es va fer amb el mateix tampó que el del segon rentat, però per comtes d'utilitzar LAPAO com a detergent, es va utilitzar DM 0.1%. Per últim es va afegir el tampó d'elució amb una concentració d'imidazol 100 mM en excés perquè d'aquesta manera es desplaça la interacció dels ions níquel amb les histidines. Per tal d'eliminar algunes proteïnes contaminants que encara quedaven junt amb la MelB es va fer passar l'elució per una columna de bescanvi aniònic (MacroPrep Q), la qual reté les proteïnes contaminants i només deixa passar la MelB.

3. 2. 3. Reconstitució de la MelB i el R141C

Es va realitzar una reconstitució amb lípids totals d'*E.coli* a una proporció lípid/proteïna de 2 (pes/pes), ja que segons un estudi realitzat anteriorment per espectroscòpia de fluorescència (Dave, 2001), la proteïna és més activa en aquestes condicions. El procés de reconstitució va partir de la MelB solubilitzada en DM (0.1%, v/v) i es va barrejar amb lípids d'*E.coli* per donar una proporció lípid/proteïna de 2 (p/p). Per tal d'extreure el detergent, es va deixar la mostra sota agitació constant durant tota la nit amb boletes de poliestirè (SM-2 Bio-Beads) a 4°C, tal com descriu Rigaud et al. (1988). Aquestes boletes de poliestirè són capaces de segrestar les molècules de detergent en presència de lípids totals d'*E.coli*. Un cop acabada l'agitació, es van filtrar les boles de poliestirè amb un filtre de llana de vidre,

i els proteoliposomes es van sotmetre a tres cicles repetits de congelació (amb N₂ líquid)/descongelació (a 30°C)-sonicació (durant 30 segons)-rentats (amb tampó Kpi 100 mM pH7 per als experiments de FTIR de transmissió i amb tampó MES 20 mM, KCl 10 mM pH 6.6 per als d'ATR-FTIR) per tal d'eliminar tot el NaCl de fora i dins del proteoliposoma i obtenir una grandària adequada d'aquests.

3. 3. Mesura de la concentració i de l'activitat de la MelB o el R141C

Es va mesurar la concentració de proteïnes segons el mètode Lowry et al., 1951, utilitzant sero albúmina com estàndard.

Per a mesurar l'activitat de la MelB reconstituïda en lípids i solubilitzada, es va utilitzar el mètode de fixació del sucre radioactiu [α -³N]NPG ja descrit anteriorment (Damiano-Forano et al., 1986). Primerament, es van incubar les mostres a analitzar a temperatura ambient amb monensina 0.75 μ M i CICCIP (carbonyl-cyanide-trichloro-methoxy phenylhydrazone dicycloheyl-carbodiimide) 10 μ M. La cèl·lula de diàlisi amb flux continu consta de dues cambres situades una sobre l'altre, separades per una membrana permeable a les molècules petites però no als proteoliposomes o micèl·les de detergent (figura 3.2).

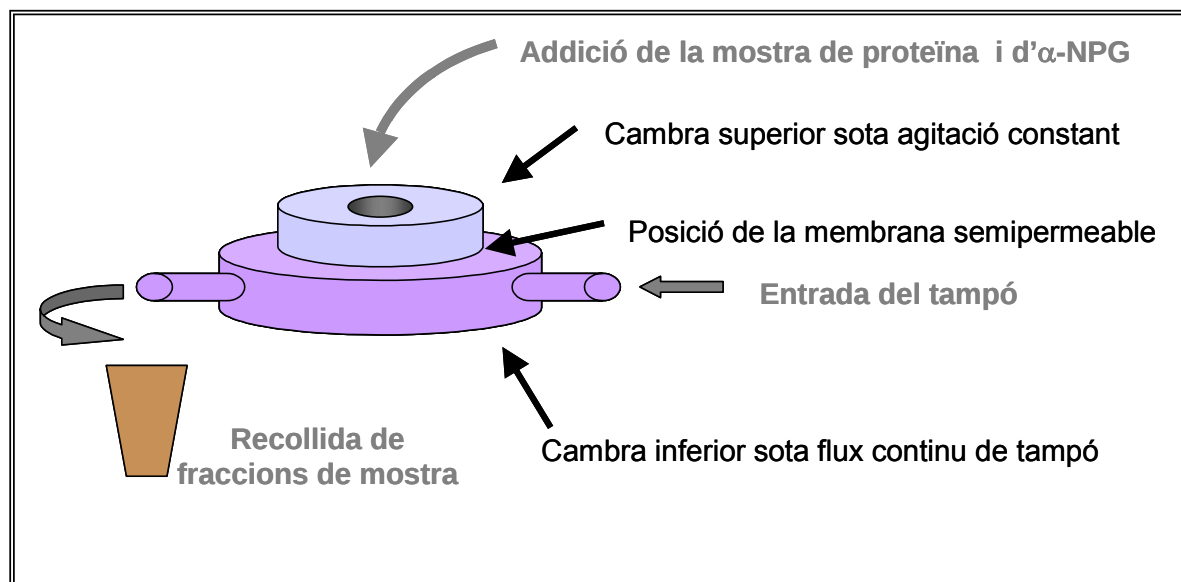


Figura 3.2. Esquema de la mesura d'activitat de la MelB mitjançant el sucre [α -³N]NPG i utilitzant una cèl·lula de diàlisi, tal com descriu Damiano-Forano et al. (1986).

La cambra inferior es va injectar amb tampó i les fraccions es van recollir a la sortida. La suspensió de proteoliposomes o de MelB solubilitzada es va dipositar a la cambra superior sota agitació constant. Es va afegir 1 μM d'un anàleg tritiat de la melibiosa (3H)- α -NPG (0.8 mCi/mmol) i després de deixar equilibrar, el sucre que estava fixat es va desplaçar amb concentracions creixents del mateix sucre no radioactiu. Al final de la manipulació, es va afegir un excés de sucre per tal de desplaçar tot el sucre radioactiu fixat. Les constants de dissociació del α -NPG radioactiu (K_D) i el nombre màxim de llocs de fixació (B_{max}) es van calcular gràficament, utilitzant la representació d'Scatchard (Scatchard, 1949).

3. 3. 1. Comprovació de l'estat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència

Per tal d'assegurar el bon estat de la mostra durant el temps que pot passar entre la seva obtenció i les mesures per espectroscòpia d'infraroig, es va realitzar una comprovació de l'activitat de la MelB per fluorescència abans d'iniciar cada experiment (Dave, 2001), mitjançant fluorescència intrínseca (Mus-Veteau et al., 1995). La prova es basa en els canvis en la fluorescència de residus Trp, com a conseqüència de la unió dels substrats. La figura 3.3 mostra un patró típic de l'efecte dels substrats d'una mostra de MelB activa per espectroscòpia de fluorescència.

Aquests experiments es van realitzar a 20°C amb un fluorímetre SLM AMINCO 8000, de SLM instruments, inc. La longitud d'ona d'excitació fou a 297 nm. Les mesures es van realitzar en cubetes UV/visible de quars de 1×1cm amb mostres de MelB o R141C a una concentració de 20 $\mu\text{g/ml}$, prèviament sonicades durant 30 segons per tal d'evitar agregacions. Aquestes cubetes disposen d'un espai a la base per sotmetre les mostres a agitació constant durant tot l'experiment per tal d'assegurar que no hi ha sedimentació de la mostra i que les addicions es barregen bé i ràpid. Les concentracions de les addicions van ser les mateixes que les descrites per Mus-Veteau et al. (1995). Un cop fet l'espectre de la mostra sense substrats, es va afegir NaCl a una concentració final de 10 mM i es va adquirir l'espectre. Seguidament, es va afegir melibiosa a una concentració final de 10 mM i es va tornar a adquirir un espectre. Els càlculs de l'activitat es van realitzar mitjançant l'equació:

$$\Delta F / F = \frac{\Delta F_{\max} \cdot [L]}{K_{0.5} + [L]}$$

on ΔF és la variació de fluorescència per l'addició de substrat, F és la fluorescència inicial, $[L]$ és la concentració de substrat, $\Delta F/F_{\max}$ és el canvi màxim de fluorescència induït pel substrat i la $k_{0.5}$ és la constant d'equilibri aparent que descriu la meitat del canvi màxim de fluorescència (Mus-Veteau et al., 1995).

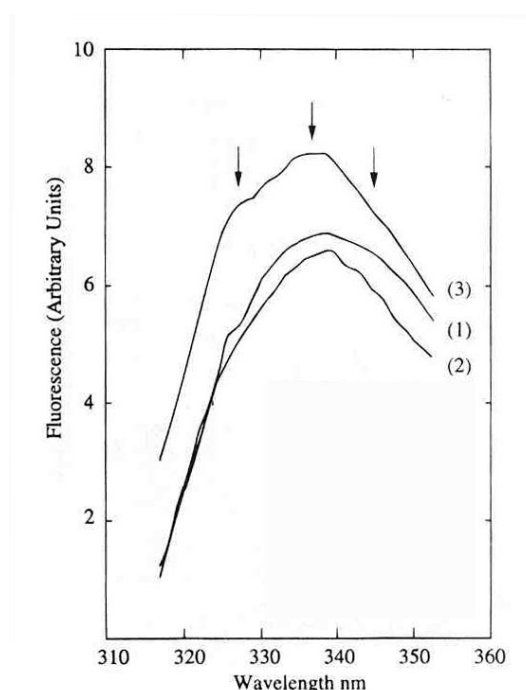


Figura 3.3. Espectres de fluorescència de la MelB en diferents condicions de substrats. Gràfic obtingut de Mus-Veteau et al.(1995).

3. 4. Estructura secundària per espectroscòpia FTIR de transmissió

3. 4. 1. Preparació de la mostra

Es van incubar proteoliposomes de MelB amb diferents substrats (NaCl 10 mM, melibiosa 5 mM, melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM, LiCl 10 mM, KCl 10 mM i glucosa 5 mM) obtenint d'aquesta manera, diferents estats de la MelB. Alíquotes d'aquestes

mostres es van sonicar breument (~12 mg/ml de proteïna) en tampó amb H₂O i es van dipositar en finestres de CaF₂ amb espaiadors de llautó prims de 6 µm. Els proteoliposomes de MelB (13-15 mg/ml de proteïna) en tampó amb D₂O (pD 7.4) també es van dipositar en finestres de CaF₂ però amb espaiadors de tefló de 25 µm. La preparació de la MelB solubilitzada es va dur a terme concentrant el material eluït fins a obtenir una mostra que contenia 10 mg/ml de proteïna en 0.4% de DM (pes/pes).

3. 4. 2. Adquisició dels espectres de FTIR de transmissió

Els espectres de FTIR de transmissió es van adquirir utilitzant un espectròmetre Mattson Polaris equipat amb un detector MCT (mercuri, cadmi, tel·luri), a 2 cm⁻¹ de resolució. L'espectròmetre estava sotmès a una purga contínua d'aire sec, i excepte en els casos expressos, es va mantenir la mostra a una temperatura de 25°C per l'acció d'una cèl·lula termostatzadora. Es van acumular 1000 escombrats per a cada mostra utilitzant una llançadora que compensa les bandes de vapor d'H₂O residuals, es va apoditzar amb una funció triangle i es va realitzar la transformada de Fourier. La figura 3.4 ens mostra diferents tipus de funcions d'apodització que es poden aplicar a la transformada de Fourier. Per tal d'eliminar la contribució de tampó en els espectres d'absorció i poder observar les bandes del lípid i la proteïna, es va procedir a la resta digital dels espectres del tampó adquirits en les mateixes condicions que la mostra. El criteri utilitzat va ser l'obtenció d'una línia base recta entre 1950 i 1750 cm⁻¹.

3. 4. 3. Anàlisi dels espectres de FTIR de transmissió

L'anàlisi dels espectres es realitzà mitjançant l'autodesconvolució de Fourier utilitzant l'algoritme de Kauppinen (Kauppinen et al., 1981) addicionat al programa FD (Spectrum Square). Els paràmetres que es van utilitzar de forma general per a la desconvolució van ser els d'una amplada de banda a mitja alçada (FWHH) de 14 cm⁻¹ i un factor *k* de 2.5-2.7. Els valors de *k* que s'utilitzaren sempre estaven per sota el log (S(senyal)/N(soroll)) (Mantsch et al., 1988). S'utilitzà una funció de forma de banda lorentziana i una funció d'apodització Bessel. Per a la realització de la derivada en l'espai de Fourier es va utilitzar l'algoritme de Kauppinen (Kauppinen et

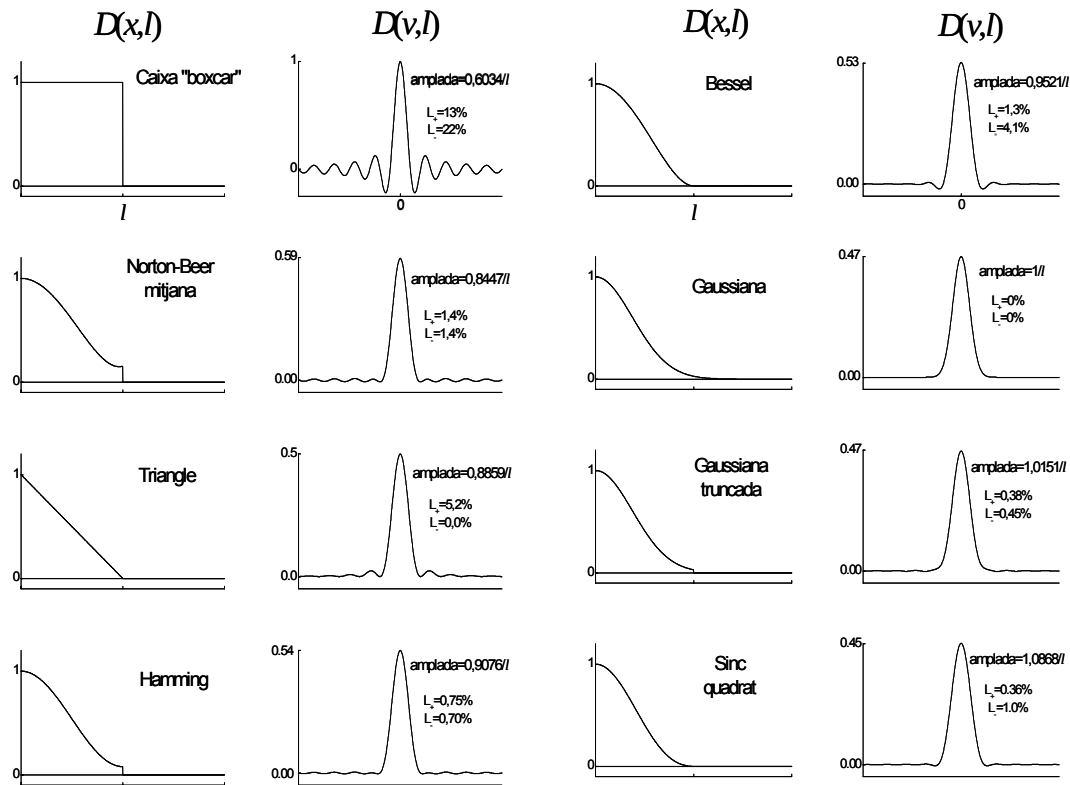


Figura 3.4. Tipus de funcions d'apodització adquirides de Griffiths and Haseth (1986) i de Marshall and Verdun (1990). En la columna $D(x,l)$ es mostren les funcions d'apodització i en la columna $D(v,l)$ es mostren les transformades de Fourier respectives.

al., 1981) amb potència de derivació 3 (la qual dóna forma de quarta derivada a l'espai real) i amb una distància de tall de 0.2. Els espectres també es van processar pel mètode de restauració de la màxima probabilitat, tal com es va descriure

anteriorment (de Noyer and Dodd, 1991), executat amb l'aplicació informàtica SSRES. L'ajustament de bandes i la quantificació dels percentatges de les diferents estructures secundàries, es realitzà mitjançant un procediment iteratiu d'ajustament de bandes per mínims quadrats. L'ajust, realitzat pel programa CURVEFIT, es va executar en el programa GRAMS (Galactic Industries Co.), permetent l'ajust de bandes gaussianes a la regió amida I o I' dels espectres desconvulats. L'ajust amb bandes gaussianes es va iniciar amb els nombres i freqüències de bandes obtinguts per l'autodesconvolució i la derivació. Per a totes les bandes, es va establir una FWHH de 10-14 cm^{-1} i una intensitat de dos terços la intensitat de l'espectre d'absorció a la mateixa freqüència aproximadament. Solament es va deixar que existís una variació de 2-3 cm^{-1} de freqüència respecte a la freqüència inicial durant l'ajustament de les bandes. La proporció de cada estructura en particular es va calcular sobre les àrees de les bandes gaussianes ajustades i dividides per l'àrea total de totes les bandes ajustades amb els màxims situats entre 1685 i 1620 cm^{-1} .

Per a les mesures del bescanvi H/D per transmissió, es va estimar el percentatge total de protons no bescanviats mitjançant les proporcions d'àrees de banda per l'expressió:

$$\frac{\left(\frac{A_{II}}{A_{I'}} \right)_{D_2O}}{\left(\frac{A_{II}}{A_{I'}} \right)_{H_2O}}$$

Les àrees de l'amida I o I' i de l'amida II es van obtenir per integració de la regió 1696-1600 cm^{-1} i 1568-1500 cm^{-1} , respectivament.

3. 5. Bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR

L'ATR-FTIR consisteix en un plat amb forma trapezoïdal que, tot i que existeixen altres dissenys de plats d'ATR-FTIR, aquesta forma trapezoïdal és la més utilitzada per a l'estudi de proteïnes en general (Goormaghtigh et al., 1999). El feix de llum infraroja és dirigit cap al cristall de Ge, el qual és un medi amb un índex de refracció elevat (transparent a la radiació infraroja d'interès). L'angle crític d'entrada

del feix de llum al cristall d'ATR, θ_c , que en el nostre cas és de 45° , depèn de l'índex de refracció de l'element de reflexió interna (IRE), n_1 i del medi exterior, n_2 :

$$\theta_c = \sin^{-1} n_{21} \quad (n_{21} = n_2 / n_1)$$

Després de col·lisionar contra l'IRE, es produeixen vàries reflexions totals de la llum a dins de l'IRE fins arribar al final on la llum surt cap al detector.

L'equació de Maxwell ens demostra que la superposició de les ones entrants i reflectides resulta en una ona perpendicular a la superfície de reflexió total. Aquesta ona es representa a la figura 3.5 i es descriu per l'equació:

$$E = 2 \cos \left(\frac{2\pi z}{\lambda_e} + \phi \right)$$

on z és la coordenada situada a l'eix de la normal de la superfície de l'IRE i $\lambda_e = \lambda_1 / \cos \theta$ on λ_1 és la longitud d'ona dins l'IRE, i $\lambda_1 = \lambda / n_1$, i θ és l'angle d'incidència del feix de llum. El ϕ és el trasllat de la fase (desfasament). Existeix però una pertorbació electromagnètica en el medi posterior a la interfase reflectora, anomenada ona evanescent. Aquesta ona es caracteritza per un decaïment exponencial de la seva amplitud amb la distància des de la interfase d'acord amb

$$E = E_0 e^{-z/d_p}$$

on E_0 és la mitjana de la intensitat del camp magnètic a la interfase, E és la mitjana de la intensitat del camp magnètic a la distància z de la interfase en el medi posterior i d_p és la profunditat de penetració de la ona evanescent. Es pot demostrar que:

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}} \quad (1)$$

Com més gran és λ_1 o més petit és θ , més gran és la profunditat de penetració de la ona evanescent. La presència del camp evanescent és el que possibilita la

interacció entre la llum infraroja i la mostra situada a la superfície de l'IRE. La distància d'interacció de la llum infraroja amb la mostra, serà aproximadament el valor de la d_p . Amb aquest resultat i l'observació de la figura 3.5, podem dir que la millor condició per a les mesures amb espectroscòpia d'ATR-FTIR és que la mostra estigui molt a prop de la superfície d'IRE. Per aquesta raó, els films de proteïnes de membrana o proteïnes reconstituïdes en lípids són molt utilitzats (Arkin et al., 1996; Cabiaux et al., 1997; Le Coutre et al., 1997; Tatulian et al., 1998). De la mateixa manera, l'equació (1) i la figura 3.5 ens indiquen que la intensitat de la banda de l'espectre d'absorció dependrà del número d'ona, ja que la d_p i per tant la interacció amb la mostra incrementa amb la λ .

3. 5. 1. Preparació de la mostra de MelB o R141C i adquisició dels espectres

Es varen preparar mostres de 20 μl de suspensió de proteoliposomes (155 μg) en diferents condicions de substrats i es van estendre homogèniament sobre el cristall de germani ($50 \times 10 \times 2$ mm, Harrick, Ossining, NY, amb 12 reflexions internes a la cara del cristall on es disposa la mostra). Cada film es va deixar assecar a temperatura ambient durant més d'1 hora, i posteriorment es va aplicar un flux continu de nitrogen durant 30 minuts per assegurar un assecament màxim i així evitar diferències en el grau d'hidratació entre diferents mostres. L'aparell d'ATR es va cobrir amb una peça d'acer inoxidable amb una entrada i sortida pel flux de nitrogen gas i una altra entrada i sortida per un bany circulatori termostàtic. L'ús d'un termostatzador que mantingui la mostra a una temperatura constant és essencial per a la realització de l'experiment, ja que els espectres de FTIR són extremadament sensibles a les variacions de temperatura. Per a l'experiment de bescanvi, es va exposar el film sota un flux continu de N_2 gas (220 ml/min) saturat amb vapor de D_2O , provenint de 6 vials amb 2-3 ml de D_2O en cada un i 1 vial amb 6-7 ml de D_2O (figura 3. 6). El primer vial ha de ser més gran perquè és el primer a gastar-se; si fos d'igual volum a la resta, la insuflació de vapor de D_2O s'acabaria abans de finalitzar l'experiment. El flux de N_2 gas es va fer bombollear per cada un d'aquest vials i per tant quan arribava a la mostra estava saturat d'aigua pesada. El tub de sortida del vapor de D_2O ha de ser suficientment llarg, perquè les variacions de pressió i temperatura exteriors no afectin a la mostra (veure figura 3.6) Abans d'iniciar la cinètica de bescanvi H/D es van recollir varis espectres cada 5 minuts per tal d'assegurar l'estabilitat de la mostra inicial. Un cop començat el bescanvi H/D, es van recollir espectres cada 5 minuts durant els primers 300 minuts de la cinètica, després cada 10 minuts fins als 600 minuts i finalment cada 20 minuts fins a 770 minuts. Per a evitar d'altres artefactes deguts a la variació de la temperatura, cal que la temperatura exterior sigui constant i el més semblant possible a la temperatura de la mostra. Cal tenir en compte que l'experiment dura unes 14 hores i, si no es fes així, les oscil·lacions naturals de la temperatura podrien influir en els resultats. Tots els espectres es van adquirir a 20°C utilitzant un espectròmetre FTS6000 Bio-Rad, equipat amb un detector MCT a una resolució nominal de 2 cm^{-1} .

Es van analitzar films en quatre condicions diferents: (a) la MelB o el R141C sense substrats addicionats (és a dir, en presència de H^+ com a únic substrat) i a la

MelB o el R141C incubats durant 12 h amb (b) NaCl 10 mM, (c) melibiosa 5 mM i (d) melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM. Totes les mostres es van sonicar breument abans d'utilitzar per tal d'evitar agregació i com a conseqüència, una extensió del film poc homogènia. Al final de la cinètica de bescanvi H/D ens trobàvem en un estat de film rehidratat, de manera que les concentracions de medi amb sucre o amb sal augmentaven. En el nostre cas s'augmentava unes 20 vegades comparat amb la suspensió inicial i per tant, tots els llocs d'unió estaven saturats.

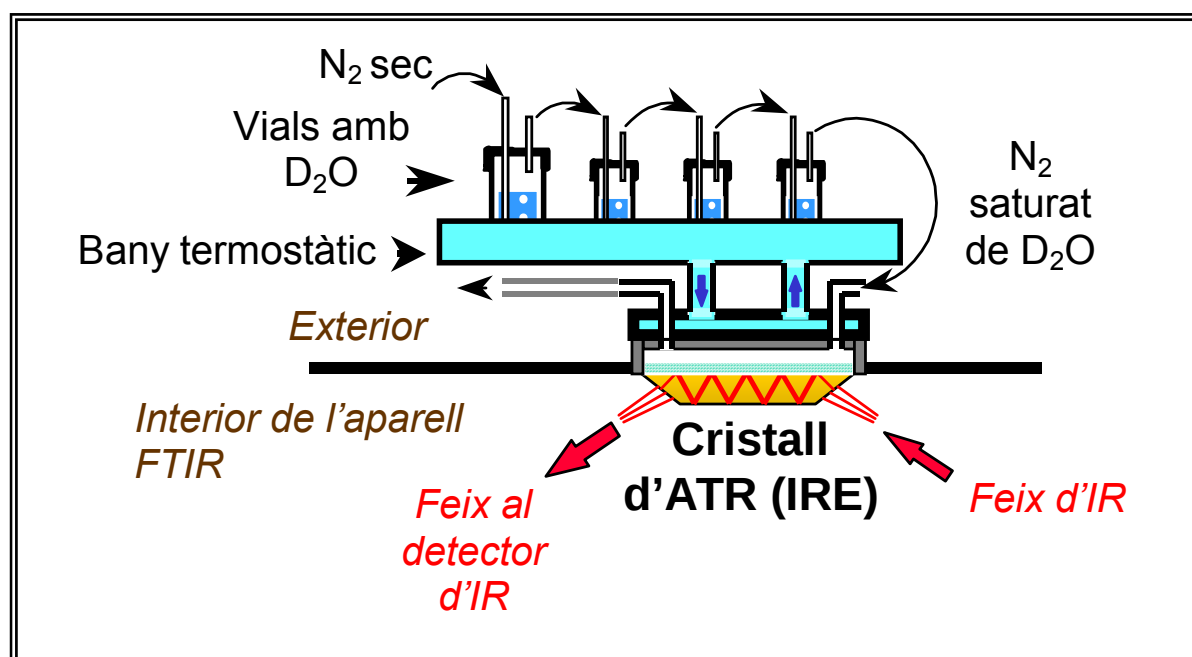


Figura 3.6. Esquema de la disposició experimental d'un experiment de bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR.

3. 5. 1. 1. Neteja del cristall de Ge

La neteja correcta del cristall d'ATR és crucial ja que és important que no hi quedi gens de mostra romanent d'experiments anteriors i que no es perdin les seves propietats per deteriorament de la seva superfície. Així, primer es va afegir sabó especial per a cubetes alcalí, calent ($45^{\circ}C$) durant 1 hora aproximadament. Segon, es va fregar suaument amb els dits (amb guants) i es va afegir un altre cop sabó de cubetes a temperatura ambient. Es va tornar a fregar suaument i es va procedir a rentar amb H_2O destil·lada. És molt important, no deixar l'aigua damunt la superfície,

sinó esbandir varies vegades. Un cop realitzat l'últim rentat, es va assecat ràpidament i amb insistència amb paper absorbent (que no deixi anar fils). Un cop estava ben sec, ja tornava a estar a punt per a estendre-hi un altre cop la mostra.

3. 5. 2. Anàlisi dels espectres d'ATR-FTIR

Per a poder procedir a l'anàlisi dels espectres, es van haver de realitzar varies correccions de les dades experimentals prèvies a l'anàlisi de la cinètica del bescanvi H/D dels grups amida de la proteïna. A) Es van corregir tot els espectres per la contribució d'aigua atmosfèrica (de Jongh et al., 1995), és a dir, es va restar l'espectre del vapor d'aigua de cada un dels espectres de la cinètica de bescanvi de manera que les bandes de vapor es fessin zero. L'aparició de vapor d'aigua succeeix pel fet que en el cas de l'ATR no existeix llançadora que compensi els efectes del vapor d'aigua i per tant els seus nivells van variant al llarg de l'experiment. La figura 3.7 ens mostra un espectre de la MelB sense substrats al minut 350 amb bandes de vapor d'aigua i després de restar-les. B) Es va corregir la senyal de l'amida II per l'inflament del film aplicant la proporció amida II/amida I com a factor de normalització (Goormaghtigh et al., 1999). L'inflament del film es deu a la rehidratació dels liposomes durant l'entrada de vapor de D₂O, de manera que la quantitat de mostra que queda en el pas efectiu de la llum, disminueix. Els rangs d'integració de les bandes amida I i II van ser 1696-1600 cm⁻¹ i 1565-1525 cm⁻¹, respectivament. Aquesta correcció es va fer assumint que l'amida I només es desplaça uns pocs cm⁻¹ cap a números d'ona més baixos degut al bescanvi H/D i per aquesta raó l'àrea d'integració de la regió de l'amida I reflexa la quantitat de proteïna que roman en el feix de llum IR efectiu. Encara més, com que les bandes amida I i II són adjacents a l'espectre, d'altres tipus d'errors com el pas de llum efectiu depenent del número d'ona o problemes de línia base es van minimitzar. C) Una tercera correcció, es va referir a una possible contribució del lípid a la regió de l'amida I i l'amida II. Així que, es va realitzar una cinètica de bescanvi H/D de films de lípids d'*E.coli* sense la presència de proteïna amb i sense substrats, per tal d'estimar la contribució de lípid a les regions amida I i II durant l'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D. El factor de resta es va obtenir escalant la banda de lípid d'estirament CH₂ (3029-2780 cm⁻¹). Val s dir, que l'addició de substrats no interfereix a les regions

d'interès. D) Una altra correcció va ser la de restar la contribució d'aminoàcids de la regió amida II. Aquesta correcció es va realitzar mitjançant la creació de dos espectres sintètics a partir de la seqüència primària de la MeIB. Un dels espectres sintètics es va fer amb dades dels aminoàcids hidrogenats de Venyaminov and Kalnin (1990) per a la correcció dels espectres abans de començar el bescanvi H/D i l'altre amb dades pels aminoàcids deuterats de Chirgadze et al. (1975) per a la correcció dels espectres un cop començat el bescanvi. El factor de resta per escalar l'espectre d'aminoàcids va ser el necessari per eliminar la banda de tirosines (la qual està molt resolta en la forma deuterada) (Lórenz et al., 2001).

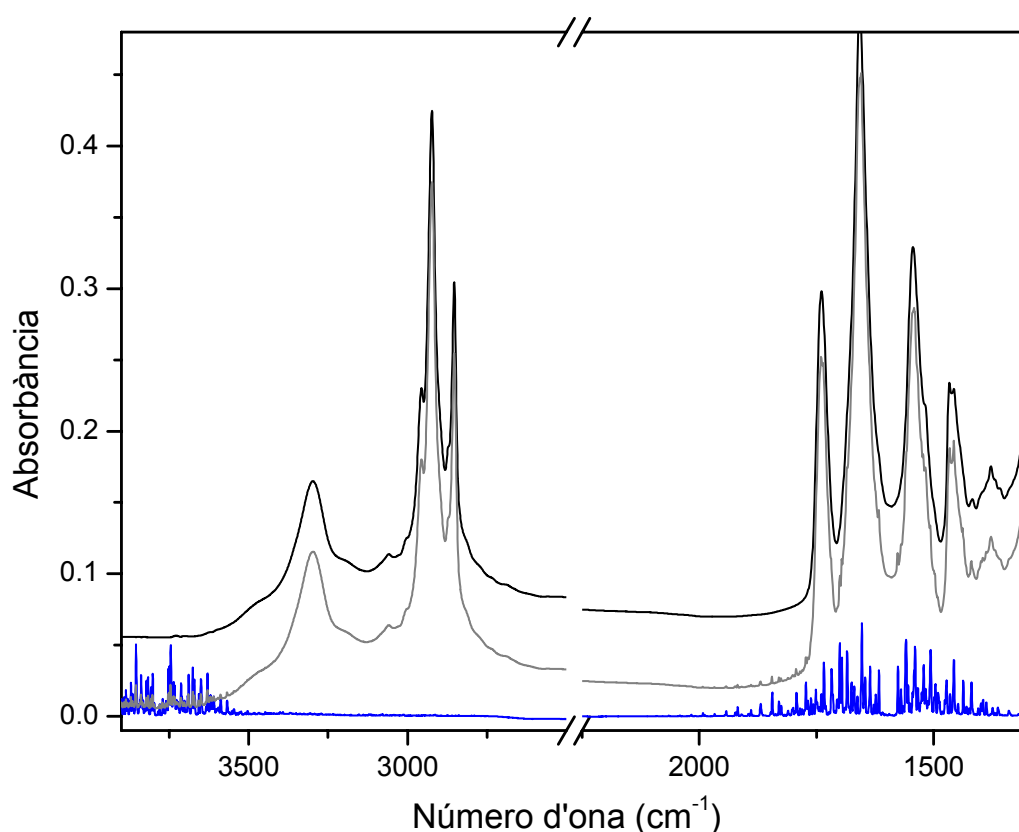


Figura 3.7. Espectre de la MeIB sense substrats (H^+ /MeIB) sense restar-li la contribució de vapor d'aigua (gris) i després d'haver-li restat (negre) i l'espectre de vapor d'aigua (blau).

3. 5. 2. 1. Anàlisi de l'amida II dels espectres d'infraroig

Un cop realitzades totes les correccions indicades, es van obtenir corbes del bescanvi de la MelB en diferents condicions de substrats. Se sap que aquestes corbes són la transformació de Laplace de la funció de distribució del temps de bescanvi dels hidrògens amida (Goormaghtigh et al., 1999). I per tant, la transformació inversa de Laplace de les dades experimentals ens donarà la distribució dels diferents temps de bescanvi dels hidrògens amida. Les transformades inverses de Laplace es van obtenir pel mètode de regularització de màxima entropia (Craig and Brown, 1986; Press et al., 1992), ponderat preferentment a una estimació plana (Lórenz, *comunicació personal*). D'aquesta manera ens assegurem que en el cas que no hi hagi informació a les dades, s'assigna una distribució plana i s'evita així la sobreinterpretació d'aquestes. La solució regularitzada es va obtenir aplicant una minimització obligatòriament positiva, mitjançant un mètode de variable mètrica (Press et al., 1992). La tria del paràmetre regularitzador afecta la resolució de la distribució calculada, perquè quan el seu valor disminueix hi ha més detalls evidents però per contra, el resultat esdevé cada cop més depenent del soroll. Així doncs, el valor òptim del regularitzador aplicat a totes les mostres, es va considerar que era el valor més baix comú a totes les mostres que no van donar resultats modificats significativament pel soroll, tal com indicaven les simulacions de Montecarlo. Les simulacions de Montecarlo ens donen la variació de l'anàlisi dels experiments per la presència de soroll. Això s'aconsegueix utilitzant com a referència les dades de l'ajust de les dades experimentals (les dades ideals) i fent un número de simulacions possibles. Aquestes simulacions es realitzen afegint soroll sintètic a les dades ideals. El soroll sintètic es basa en el soroll experimental. Tots els paràmetres i errors es refereixen als mínims i als errors estàndards obtinguts de mostres independents en les mateixes condicions (n=2-3).

3. 5. 2. 2. Anàlisi de l'amida I dels espectres d'infraroig

Per tal d'analitzar el comportament de cada una de les estructures secundàries degut al bescanvi H/D a partir de l'amida I (Susi et al., 1967; Timascheff et al., 1967; de Jongh et al., 1997), es van seguir diferents intensitats dels espectres desconvulats de les cinètiques de bescanvi: a 1678 cm^{-1} pels girs reversos, a 1660

cm^{-1} per hèlixs α i estructures no ordenades i finalment a 1626 cm^{-1} per làmina β . Els paràmetres de desconvolució utilitzats per a tots els espectres van ser una FWHH de 14 cm^{-1} i una k de 2 (per sota del $\log(S/N)$) (Mantsch et al., 1988). La selecció dels números d'ona representatius de cada estructura secundària es va realitzar conforme al procediment descrit a continuació: Primer, es van seguir una sèrie d'intensitats a diferents números d'ona de tots els espectres de la cinètica restats prèviament pel primer espectre no bescanviat. També es va incloure una intensitat corresponent a la línia base a 1860 cm^{-1} on no existeix absorció per part de la mostra. Un cop arribats a aquest punt, es van seguir varis criteris de selecció: (a) el número d'ona seleccionat ha de descriure una sola estructura secundària sense la contribució d'una altra, excepte per a les hèlixs α de les quals és difícil discriminar la contribució de les estructures no ordenades; (b) han de tenir una bona relació senyal/soroll (S/N); i (c) han de situar-se lluny de punts isosbèstics. Un cop es van obtenir totes les corbes de les intensitats seleccionades, es va aplicar un mètode matemàtic lleugerament diferent a l'aplicat a la banda amida II, ja que el seguiment de la intensitat en una posició dins la banda amida I no arribarà al valor zero després del bescanvi complet. Aquest fet és degut a què l'amida I només es desplaça uns pocs cm^{-1} cap a valors menors del número d'ona, de manera que la banda resultant (amida I') tindrà una absorptància similar que la banda inicial (amida I) en la mateixa regió. Dit d'una altra manera, una cinètica de bescanvi H/D ideal per un valor concret del número d'ona arribaria a una línia base plana no zero en la situació de 100% de bescanvi. Com a conseqüència d'això, la contribució de qualsevol residu no bescanviat en les posicions seleccionades de les cinètiques experimentals quedaria emmascarada per aquesta línia base inevitable. Desafortunadament, en el nostre cas no s'ha pogut calcular el 100% de bescanvi de l'amida I de la proteïna, ja que per aconseguir-ho caldria desnaturalitzar la proteïna, i aquests processos donarien un espectre de la banda amida I molt diferent a l'original i per tant no podria ser comparable. Per aquesta raó, la nostra aproximació es veu limitada als hidrògens que mostren bescanvi mesurable durant la cinètica experimental. En aquest context, la correcció de la contribució de les cadenes laterals d'aminoàcids a partir dels espectres sintètics en la banda amida I, no va afegir informació als resultats ja que només produïa canvis en el valor de la contribució de la línia base. Per tant, no es va

restar la contribució dels aminoàcids a la banda amida I. Per al càlcul de la distribució de poblacions, es va aplicar la transformada inversa de Laplace amb un regularitzador Tikhonov no ponderat d'ordre zero (Craig and Brown, 1986) i es va afegir una línia base (Lórenz, *comunicació personal*). Aquesta regularitzador permet que la distribució només reflecteixi els protons bescanviats (és a dir, que no es poden assignar a una línia base). Només es van considerar, els trets que mostraren reproductibilitat entre dues mostres diferents. Els errors presentats es refereixen a errors estàndard d'experiments independents en les mateixes condicions (n=2-3).

3. 6. Estudi de l'orientació per espectroscòpia d'ATR-FTIR

3. 6. 1. Obtenció dels espectres de polarització de la MelB i el R141C per espectroscòpia d'ATR-FTIR

Es varen preparar films de 20 μ l d'una suspensió de proteoliposomes de MelB en tampó Mes 20 mM, KCl 10 mM pH 6.6 en diferents condicions de substrats, extensos de forma homogènia a una cara del cristall de germani d'ATR (50 $\times$ 10 $\times$ 2 mm, Harrick, Ossining, NY, amb 12 reflexions internes a la cara del cristall on es diposita la mostra). El solvent es va anar evaporant lentament a temperatura ambient durant 1 hora i amb l'ajuda d'un flux continu de nitrogen gas durant 30 minuts. La polarització del feix d'infraroig es va fer amb un polaritzador KRS 694 (tallium bromide iodide), i els espectres es van recollir amb un espectròmetre FTS6000 Biorad. La figura 3.8 ens mostra la situació del polaritzador de la llum abans d'entrar a l'IRE; un cop la llum s'ha polaritzat es pot observar com incideixen el feix de llum paral·lel i perpendicular en el cristall de Ge.

3. 6. 2. Anàlisi de l'orientació de la MelB per ATR-FTIR

L'anàlisi de l'orientació de la proteïna comporta la realització de diversos càlculs complicats, però que en determinades condicions experimentals es poden simplificar, ajudats per les hipòtesis establertes àmpliament en la literatura (Arkin et al., 1996; le Coutre et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999). En aquest sentit, abans d'obtenir l'angle de l'estructura molecular d'interès, s'ha d'obtenir el paràmetre d'ordre de l'estructura orientada.

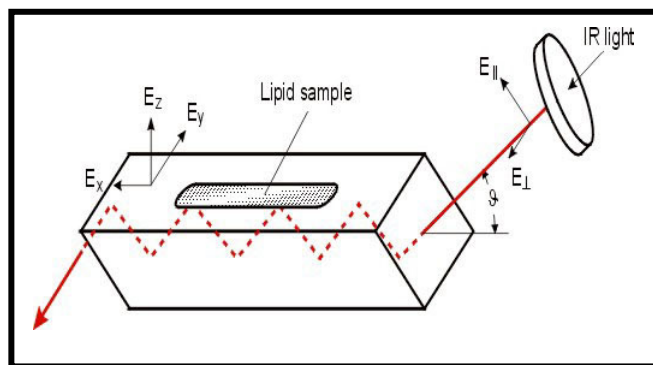


Figura 3.8. Representació esquemàtica de l'IRE i del pas del feix d'infraroig polaritzat. Existeixen dos plans possibles de polarització, $E_{||}$ (polarització paral·lela al pla incident) i $E_{\perp}$ (polarització perpendicular al pla incident).

3. 6. 2. 1. Càlcul del paràmetre d'ordre i de la raó dicroica d'una banda

Si considerem una mostra amb un mode de vibració normal, aquesta manifesta una orientació amb angle ϕ entre el moment de transició dipolar axial i la normal de la superfície del cristall d'ATR. Definim el paràmetre d'ordre (p_{ϕ}) del moment de transició dipolar com (Axelsen et al., 1996; Goormaghtigh et al., 1999):

$$p_{\phi} = \frac{3 \cos^2 \phi - 1}{2} \quad (2)$$

o en el cas que es consideri com una distribució d'angles (i no solament un sol angle d'orientació):

$$p_{\phi} = \frac{3 \langle \cos^2 \phi \rangle - 1}{2} \quad (3)$$

on $\langle \rangle$ representa la mitjana.

Si la vibració normal és activa en l'infraroig, podrem observar l'aparició d'una banda d'absorbància en un espectre d'absorció. La raó dicroica d'aquesta banda es defineix com la raó de la seva àrea total de l'espectre obtingut amb llum polaritzada paral·lelament entre l'àrea de l'espectre obtingut amb la llum polaritzada perpendicularment.

La relació entre la raó dicroica d'una banda obtinguda d'un experiment d'ATR (R^{ATR}) i el paràmetre d'ordre del seu moment de transició dipolar (p_ϕ), ve donada per l'expressió (Goormaghtigh et al., 1999):

$$R^{ATR} = \frac{\int Abs_{90}}{\int Abs_0} = \frac{\langle E_x^2 \rangle}{\langle E_y^2 \rangle} + \frac{\langle E_z^2 \rangle 2p_\phi + 1}{\langle E_y^2 \rangle 1 - p_\phi} \quad (4)$$

on E_x , E_y i E_z són els camps electromagnètics al llarg dels eixos x , y i z , respectivament (figura 3.8). L'obtenció d'uns valors acurats de $\langle E_x^2 \rangle$, $\langle E_y^2 \rangle$ i de $\langle E_z^2 \rangle$ és difícil, perquè depenen de la posta a punt experimental. Concretament, depenen de l'angle d'incidència del feix de llum al cristall d'ATR (θ), de l'índex de refracció del cristall d'ATR (n_1), de l'índex de refracció de la mostra (n_2), de l'índex de refracció del material que hi ha per sobre la mostra (n_3), del gruix del film sobre el cristall d'ATR (d) i del número d'ona (ν).

3. 6. 2. 1. 1. Hipòtesi del film gruixut

Si estem en condicions en què el film experimental és gruixut de manera que el seu gruix (d) és més gran que la penetració de l'ona de llum evanescent per a tots els números d'ona estudiats (veure equació 2) i assumim que la mostra absorbeix poc, resulten equacions relativament simples per al càlcul de $\langle E_x^2 \rangle$, $\langle E_y^2 \rangle$ i $\langle E_z^2 \rangle$. Així doncs, quan estem en aquestes condicions ens trobem en la situació de la hipòtesi del film gruixut, on $\langle E_x^2 \rangle_{thick}$, $\langle E_y^2 \rangle_{thick}$ i $\langle E_z^2 \rangle_{thick}$ només depenen de n_1 , n_2 i θ , essent $n_1 \approx 4.0$ pel cristall de germani, $n_2 = n_3 \approx 1.5$ pels proteoliposomes i $\theta = 45^\circ$ en el nostre cas experimental.

La R^{ISO} és la raó dicroica d'una banda amb un paràmetre d'orde igual a zero (la situació en què l'estructura no està orientada o està orientada en l'angle màgic). L'angle màgic és l'angle que s'obté de $p_\phi = 0$ (equació 3) que equival a $54,3^\circ$. En aquest angle no podem distingir si les estructures formen aquest angle d'orientació o estan globalment desordenades. D'acord amb l'equació 3 i la hipòtesi del film gruixut, la R^{ISO} hauria de ser igual a 2 quan $\theta = 45^\circ$ (independentment dels valors de

n_1 i n_2). En el nostre cas, el càlcul de la R^{ISO} d'un experiment amb aigua pura (substància no ordenada) va ser igual 1.93. Aquesta variació respecte al teòric 2, no pot ser degut a un θ diferent de 45° ja que aquest hauria de variar fins a 58° per donar aquest valor de 1.93, però sí que podria ser deguda a la utilització de llum polaritzada imperfectament. Tots els polaritzadors pateixen d'imperficcions (Goormaghtigh et al., 1999), així que quan aquesta imperfecció s'afegeix a l'anàlisi de R^{ATR} , l'expressió esdevé d'aquesta forma:

$$R^{\text{ATR}} = \frac{(1-f) \int Abs_{90} + f \int Abs_0}{(1-f) \int Abs_0 + f \int Abs_{90}} = \frac{\left[\langle E_x^2 \rangle (1-p_\phi) + \langle E_z^2 \rangle (2p_\phi + 1) \right] (1-f) + \langle E_y^2 \rangle (1-p_\phi) f}{\langle E_y^2 \rangle (1-p_\phi) (1-f) + \left[\langle E_x^2 \rangle (1-p_\phi) + \langle E_z^2 \rangle (2p_\phi + 1) \right] f} \quad (5)$$

on assumim que la imperfecció del polaritzador (f) és el mateix per la llum polaritzada perpendicularment i paral·lelament. D'aquesta manera i amb un valor de $R^{\text{ISO}} \approx 1.93$, podem estimar el valor de f que en el nostre cas va ser de ≈ 0.024 . Aquest resultat entra dins dels valors típics de polaritzadors amb imperfecció descrits anteriorment en la literatura (Axelsen et al., 1995). Substituint la f per 0.024, l'equació 5 queda com:

$$p_\phi = \frac{(n_2^2 - 16)(128R^{\text{ATR}} - 247)}{n_2^2(128R^{\text{ATR}} - 247) - 1904(R^{\text{ATR}} + 1)} \quad (6)$$

3. 6. 2. 2. *Obtenció de l'orientació dels eixos moleculars*

Un cop obtingut el paràmetre d'ordre (p_ϕ) és possible obtenir $\langle \cos^2 \phi \rangle$, on ϕ és l'angle que forma el moment de transició dipolar amb la normal del cristall d'ATR. Tot i que generalment no és l'angle que ens interessa a nivell experimental, ens és necessari per al càlcul de l'angle que forma l'estructura molecular amb la normal de la bicapa fosfolipídica. La relació entre aquests angles ve donada per les propietats que presenta el paràmetre d'ordre (figura 3.9), de manera que si la normal de la

bicapa de fosfolípids està distribuïda axialment al llarg del cristall d'ATR (amb p_γ equivalent a la dispersió d'orientacions de la bicapa lipídica), l'eix de l'estructura molecular està distribuït axialment al llarg de la normal de la bicapa de fosfolípids (amb p_β) i el moment de transició dipolar està distribuït axialment al llarg de l'eix de l'estructura molecular (amb p_α), i per tant, es pot descomposar p_ϕ en producte de tres paràmetres d'ordre:

$$p_\phi = p_\gamma \times p_\beta \times p_\alpha \quad (7)$$

Com que nosaltres estem interessats en el valor de $\langle \cos^2\beta \rangle$, és millor expressar l'equació 7 en funció de p_β :

$$p_\beta = \frac{p_\phi}{p_\gamma \times p_\alpha} \quad (8)$$

El valor de p_α es pot obtenir d'estudis teòrics i de dades experimentals. D'acord amb les dades descrites per Marsh et al. (2000) d'una hèlix α transmembrana, la p_α és igual a 0.65 per l'amida A, 0.43 per l'amida I i -0.37 per l'amida II. Normalment, s'assumeix que el paràmetre d'ordre de la membrana, p_γ (orientació de la bicapa lipídica) és proper a 1 (Goormaghtigh et al. 1999). No obstant, per tal de determinar un valor més exacte de p_β és important tenir una estimació de p_γ de les nostres condicions experimentals. A més, per a la detecció de canvis en les hèlixs transmembrana deguts a l'addició de substrats (que poden ser molt petits), necessitem un valor de p_γ constant entre els experiments. Un cop hem estimat que p_γ és invariable entre experiments diferents, el seu efecte en el p_β obtingut pot ésser eliminat.

Així doncs, a partir de l'equació 8 es va poder obtenir p_β de les bandes amida el qual reflexa l'orientació global de les estructures de la proteïna. Si partim d'una fracció m d'estructures ordenades dins d'una proteïna (en el nostre cas correspondrà majoritàriament a les hèlixs α transmembrana respecte a la resta d'estructures que no tenen una orientació preferent), aleshores la p_β de les estructures orientades vindrà expressada per: $p_\beta(\text{corregida}) = p_\beta / m$ (Marsh and Páli, 2001). El valor de m en el cas de la MelB serà aproximadament 0.5, ja que l'estimació d'estructura hèlix α

és igual al 50% del total d'estructura de la proteïna. Un cop hem determinat el valor de p_β , podem obtenir el valor de l'angle β , i per tant l'orientació única que tenen els eixos moleculars:

$$\beta = \arccos \left[\sqrt{\frac{2p_\beta + 1}{3}} \right] \quad (9)$$

Tot i així, quan existeix una distribució d'orientacions, la β obtinguda no correspon a l'angle mitjà $\langle \beta \rangle$. Normalment, β serà més gran que $\langle \beta \rangle$ quan $p_\beta > 0$ (és a dir, l'angle obtingut està inclinat cap a l'angle màgic).

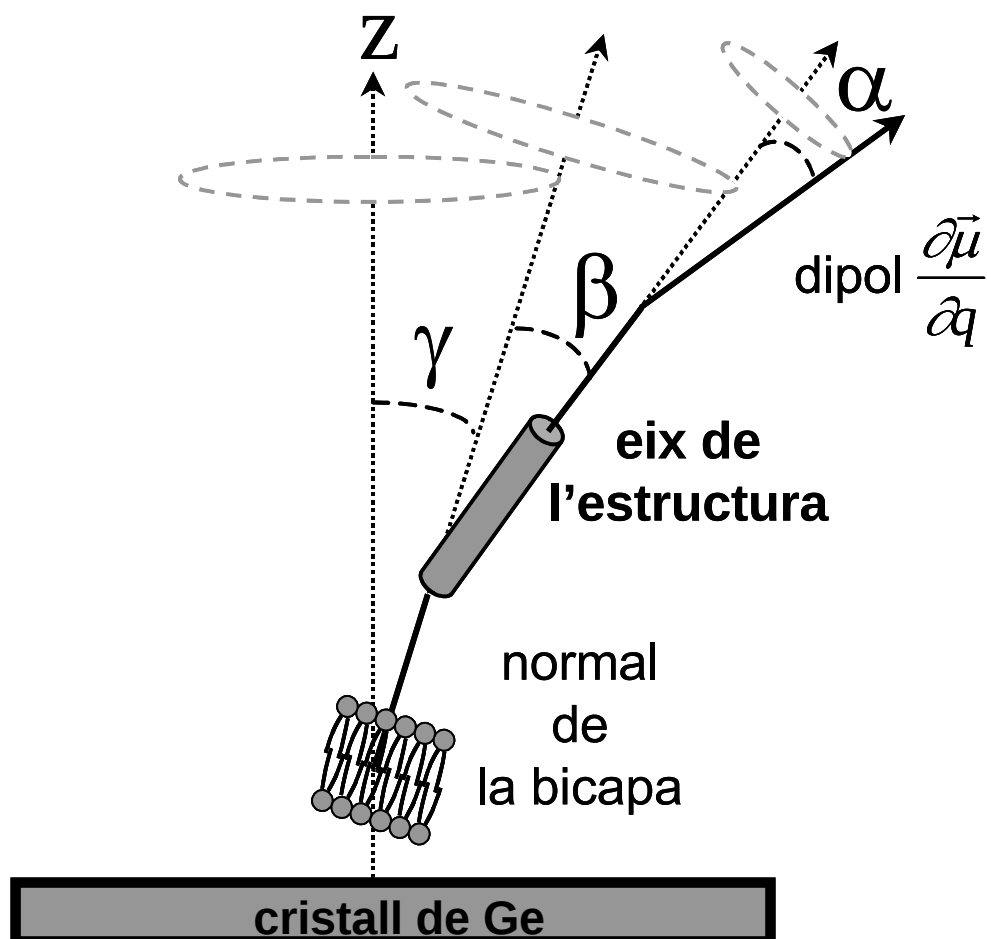


Figura 3.9. Esquema de la relació entre els angles de distribució axial. L'angle γ , és el que hi ha entre la normal del cristall de Ge i la normal de la bicapa; l'angle β és el que hi ha entre l'eix molecular i la normal de la membrana i l'angle α , és que hi ha entre el moment de transició dipolar i l'eix molecular.

3. 6. 2. 3. *Determinació experimental de la raó dicroica (R^{ATR})*

Per a poder aplicar correctament les equacions 3 i 4, es va determinar la integral de les bandes d'absorció d'interès en ambdós casos de polarització, paral·lela i perpendicular. Aquesta determinació presenta algunes dificultats, perquè normalment aquestes bandes en espectroscòpia d'infraroig apareixen sobreposades. Si afegim alguna contribució d'àrea d'una altra banda a la banda mesurada, això afectarà al valor de R^{ATR} . Per aquesta raó, la regió d'integració de la banda a mesurar ha d'estar restringida només a l'interval on la banda apareix resolta, amb una correcció de la línia base entre aquests límits d'integració. Un mètode com el de FSD, el qual conserva l'àrea aprimant les bandes pot millorar els resultats quan existeix un grau important de superposició entre bandes, ja que millora llur resolució. Quan existeix una superposició total, com és el cas de les bandes d'aminoàcids amb les bandes amida, s'ha de restar la contribució de les bandes extremes. Per això, es va restar la contribució de les cadenes laterals de la banda amida I abans de procedir al càlcul del R^{ATR} . En els experiments de bescanvi H/D, quan estem en condicions amb H_2O (abans de l'inici del bescanvi), l'amida A es superposa amb la banda d'aigua i per contra, quan el film està en D_2O , és l'amida A' que es superposa amb la banda d'aigua pesada i l'amida II' amb la banda de lípids. S'ha de tenir en compte, que la determinació de l'àrea de l'amida II també es veu afectada per la presència de lípids i per això, no es va poder obtenir un valor real de la raó dicroica d'aquestes bandes.

Es van utilitzar els següents intervals d'integració: de 3400 a 3200 cm^{-1} per l'amida A, de 1696 - 1605 cm^{-1} per l'amida I i de 1750 - 1720 cm^{-1} per l'estirament del lípid $C=O$, de 2862 a 2845 cm^{-1} per l'estirament simètric del CH_2 i de 2931 a 2912 cm^{-1} per l'estirament asimètric del lípid CH_2 . En els dos últims casos, les àrees es van mesurar en l'espectre autodesconvulat (FSD) ja que es superposen amb d'altres bandes. Tots els errors es refereixen als errors estàndards obtinguts de mostres independents en les mateixes condicions ($n=3$).

3. 6. 2. 4. *Obtenció dels espectres dicroics*

Substituint $\langle E_x^2 \rangle_{thick}$, $\langle E_y^2 \rangle_{thick}$ i $\langle E_z^2 \rangle_{thick}$ en l'equació 3, podem obtenir l'espectre dicroic com a $Abs_{90} - R^{iso} Abs_0$. En les nostres condicions experimentals la R^{iso} és igual a 1,93. Les bandes d'un espectre dicroic amb $p_\phi \approx 0$ s'anul·len; per contra, les

bandes amb $p_\phi > 0$ apareixen com a positives i les bandes amb $p_\phi < 0$ apareixen com a negatives. Així doncs, com que les bandes amb $p_\phi = 0$ desapareixen (no estan globalment orientades o estan orientades molt pròximament a l'angle màgic) es fa possible la millora de la resolució de bandes que provenen d'estructures orientades, com seria el cas de l'amida A, I i II de les hèlixs α transmembrana.

3. 6. 2. 4. 1. Anàlisi dels espectres dicroics

La resolució de les bandes orientades de l'espectre dicroic es pot millor aplicant la desconvolució de l'espectre, resultant en un aprimament d'aquestes bandes. S'han utilitzat dos mètodes de desconvolució: el mètode d'autodesconvolució de Fourier amb una FWHH de 14, una k de 2 i filtre Bessel i també es va aplicar el mètode de desconvolució de la màxima entropia (vegeu Lórenz, 2003) amb una amplada FWHH de 14 cm^{-1} . Aquest mètode, es basa en trobar un espectre desconvulat que quan es convula sigui igual a l'espectre original dins els nivell de soroll de l'espectre original. D'aquesta manera l'espectre desconvulat obtingut és una solució estadísticament possible, és a dir, que és possible que sigui la solució real. Malauradament, existeixen infinites solucions que compleixen aquesta condició estadística. Per tant s'ha de seleccionar la solució més adequada de totes les possibles. El mètode de màxima entropia és un dels mètodes més apropiats per fer aquesta selecció (Press et al., 1992).

4. Resultats i discussió

4. 1. Obtenció de la MelB salvatge i el mutant R141C purificats i reconstituïts

Les purificacions de la MelB salvatge i el mutant R141C s'han realitzat mitjançant el protocol descrit a materials i mètodes. En cada purificació s'obtenen uns 15 mg de MelB salvatge o uns 7 mg de mutant R141C a partir de 25 ml (a 25 mg/ml) de cèl·lules. Un cop recollida la MelB salvatge o el mutant R141C solubilitzats de la segona columna de bescanvi aniònic, la seva puresa es va analitzar mitjançant una electroforesi. El resultat de la purificació de la MelB salvatge i el mutant R141C es mostra en un gel de tinció en plata a la figura 4.1.

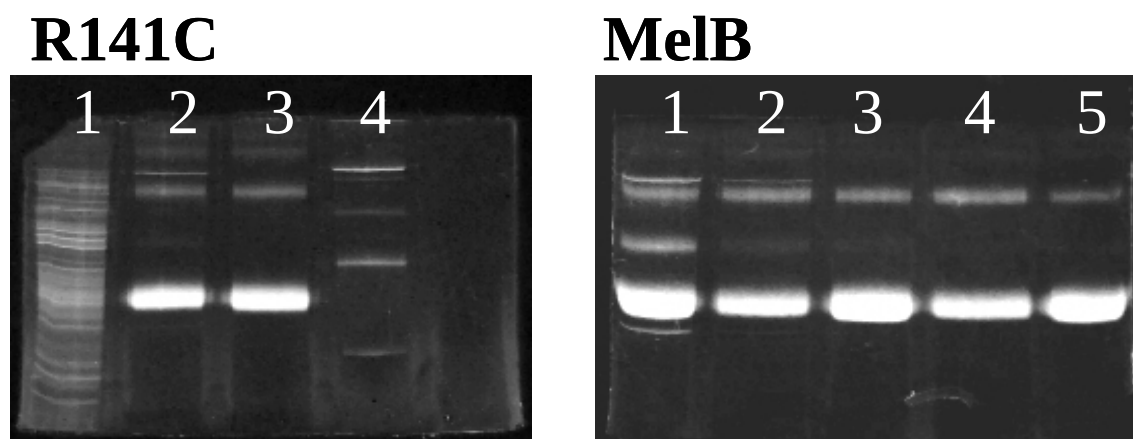


Figura 4.1. Gel de tinció en plata de la MelB i el mutant R141C solubilitzats. El mutant R141C consta de: (1) membrana del mutant R141C solubilitzada, (2) després de passar per la columna de Ni-NTA, (3) després de passar per la columna de Mono-Q i (4) estàndard de proteïna. La MelB té: (1) primera fracció de MelB de la columna Ni-NTA, (2) segona fracció Ni-NTA, (3) primera fracció de columna Mono-Q, (4) segona fracció Mono-Q i (5) proteïna solubilitzada purificada concentrada.

En el gel es pot observar com en cada pas de purificació del mutant R141C, el nombre de proteïnes contaminants va disminuint. Més concretament, podem observar com en el pas de la segona columna mQ (MonoQ), ja no existeixen proteïnes contaminants. Tampoc s'han observat diferències entre la proteïna solubilitzada en DM (obtinguda de la columna mQ de purificació) i la reconstituïda en lípids (dades no mostrades), significat que no existeix degradació de la proteïna a

causa del procés de reconstitució. En el gel de la MelB salvatge també s'observa com la segona passada per la columna de níquel (Ni-NTA) remou quasi totes les proteïnes contaminats. D'acord amb el que mostra el gel de tinció en plata, el qual és més sensible que el gel de SDS/PAGE, observem que la proteïna està totalment purificada i que només existeixen monòmers, i una proporció molt petita de dímers.

4. 2. Comprovació de l'activitat de la mostra per espectroscòpia de fluorescència.

Un cop obtinguda la MelB salvatge i el mutant R141C His-tagged purificats fins a la homogeneïtat i reconstituïts a una proporció lípid/proteïna de 2 (pes/pes), equivalent a la proporció de 120 (mol/mol), es va mesurar la seva activitat mitjançant la unió al sucre radioactiu [α - ^3H]-NPG, competidor del sucre melibiosa (Damiano-Forano et al., 1986). Els resultats indicaren que almenys el 70% dels transportadors de MelB salvatge o R141C eren actius (dades no mostrades). Els valors de K_D obtinguts foren iguals als ja descrits per la MelB salvatge i pel mutant R141C (Abdel Dayem et al., 2003).

Per tal de comprovar que les mostres continuaven actives, després d'un temps des de la seva obtenció fins al seu estudi estructural es va realitzar una segona prova d'activitat. Aquest assaig es basa en els canvis de la fluorescència de residus triptòfan que es produeixen quan s'uneixen els substrats a la MelB (Mus-Veteau et al., 1995). Les mostres de MelB salvatge solubilitzades i de MelB salvatge i mutant R141C reconstituïts en lípids d'*E.coli* es van analitzar per fluorescència, il·luminant a una longitud d'ona d'excitació a 297 nm i es va afegir primer NaCl 10 mM, i melibiosa 10 mM en darrer lloc (Mus-Veteau et al., 1995).

En la figura 4.2 es pot observar un patró d'activitat típic d'una mostra de MelB salvatge en tampó KPi 100 mM, pH 7, on l'addició de NaCl 10 mM, va produir una disminució d'un ~2% del senyal total i l'addició de melibiosa a continuació va fer augmentar el senyal total en un ~13%. Aquest patró de comportament de la MelB salvatge degut a la unió de substrats coincideix amb el descrit anteriorment per Mus-Veteau et al. (1995). D'aquesta manera podem estar segurs que per als estudis estructurals, la proteïna està totalment purificada i activa, funcionalment parlant.

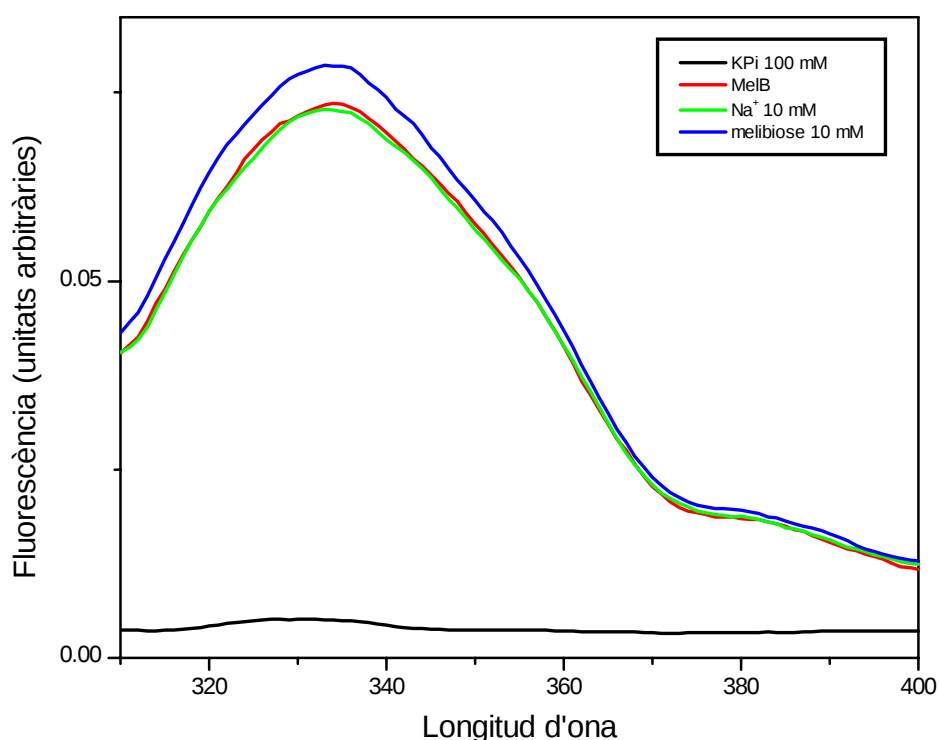


Figura 4.7. Fluorescència intrínseca de la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli*, en diferents condicions de substrats. Es mostren els espectres d'emissió, per una longitud d'ona d'excitació de 297 nm.

4. 3. Estudi de l'estructura secundària de la MelB salvatge per espectroscòpia de FTIR

El procés de purificació de la MelB permet obtenir la proteïna en estat solubilitzat, és a dir, en presència de detergent. Malgrat que el detergent utilitzat no desnatura la proteïna, per a obtenir dades estructurals el més pròximes possibles a l'estat natiu, cal reconstituir la proteïna en liposomes. Cal tenir present doncs, que el resultat final d'aquest procés dependrà, en una mesura o altra, almenys de dos paràmetres essencials: el tipus de lípids utilitzats per a la reconstitució i la relació molar inicial lípid/proteïna. Després de varis estudis realitzats amb diferents lípids i proporcions lípid/proteïna (Dave, 2001), es va determinar que els millors resultats en quan a l'activitat dels proteoliposomes s'aconsegueix amb els lípids d'*E.coli* a una relació molar lípid /proteïna de 120.

Un dels mètodes que proporciona més informació dels sistemes de membrana és l'espectroscòpia FTIR. L'espectroscòpia FTIR de transmissió, permet d'una part,

estimar els percentatges d'estructura secundària de les proteïnes, així com estudiar els canvis conformacionals produïts per l'addició de substrats. Així doncs, en primer lloc es procedí a la estimació de l'estructura secundària per mitjà de l'obtenció del seu espectre d'absorció per espectroscòpia FTIR de transmissió. En segon lloc, s'estudià la variació en l'estructura d'aquest transportador per l'addició de diferents substrats naturals en condicions saturants.

4. 3. 1. Obtenció dels espectres d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de MelB salvatge.

La figura 4.3a ens mostra l'espectre d'absorbància d'infraroig típic, de 1500 a 1800 cm^{-1} d'una suspensió de proteoliposomes de MelB en un tampó amb H_2O , després de la resta del tampó aquós emprat (vegeu materials i mètodes). L'espectre està compost essencialment per tres bandes: el mode d'estirament del lípid éster $\text{C}=\text{O}$ centrat a 1741 cm^{-1} , la banda amida I a 1657 cm^{-1} i la banda amida II a 1545 cm^{-1} . Aquestes tres bandes principals resulten, en realitat, de la superposició d'una sèrie de bandes més estretes. Per tal de descobrir la localització d'aquestes bandes components i de llur

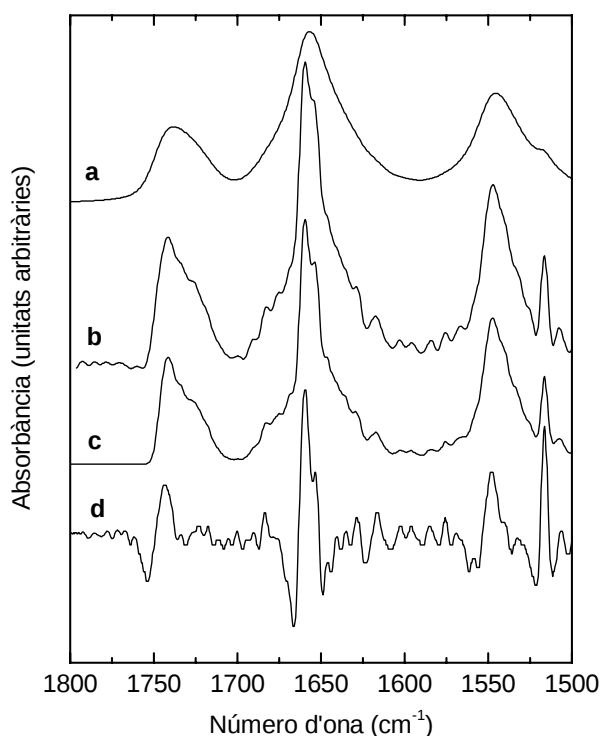


Figura 4.3. Espectres de FTIR de la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli* (1:2 p/p) en tampó KPi 100 mM (pH 7.0) a 20°C. (a) Espectre d'absorció. (b) Espectre desconvolut amb una FWHH de 14 cm^{-1} i una k de 2.6. (c) Restauració de màxima probabilitat de l'espectre d'absorció, calculat amb una FWHH de 14 cm^{-1} i una incertesa del 0.5%, equivalent a una relació senyal/soroll de 200. (d) Tercera derivada de Fourier de l'espectre d'absorció. El punt de tall utilitzat és de 0.2.

intensitat, es va procedir a un tractament matemàtic de desconvolució. El resultat d'aquesta desconvolució es mostra a la figura 4.3b.

El tractament matemàtic de desconvolució està subjecte a diversos paràmetres, l'encert dels quals resultarà en una desconvolució exempta d'artefactes. Així doncs, la desconvolució es va realitzar tenint molta cura en la utilització d'un valor baix d'amplada de banda, per tal d'evitar problemes de sobredeconvolució. A més, es va aplicar un factor de k (factor d'aprimament de les bandes) per sota del $\{\log(\text{senyal/soroll})\}$ per tal d'evitar l'increment del soroll el qual podria introduir l'aparició de bandes artificials (Kauppinen et al., 1981; Mantsch et al., 1988).

En l'espectre desconvulat (figura 4.3b), es pot observar amb claredat que la regió amida I està dominada per una banda principal a 1660 cm^{-1} i una altra secundària a 1653 cm^{-1} , les quals poden ésser assignades essencialment a estructures hèlixs α , tot i que a la banda de 1653 cm^{-1} també hi pot contribuir alguna proporció d'estructura desordenada (Byler and Susi, 1986; Surewicz and Mantsch, 1988; Holloway and Mantsch, 1989). Les bandes individuals obtingudes en la regió de $1669\text{-}1685\text{ cm}^{-1}$ corresponen principalment a girs reversos, i les altres bandes que apareixen a la regió de $1640\text{-}1628\text{ cm}^{-1}$ poden correspondre a estructura làmina β . El fet que existeixi una banda principal al voltant de 1545 cm^{-1} a l'amida II, a més de les bandes a la regió $1660\text{-}1651$ de l'amida I, confirma l'existència dominant d'estructura hèlix α dins la MelB (Goormaghtigh et al., 1994; Cabiaux et al., 1997). Aquesta disposició de bandes d'absorció en l'espectre d'infraroig, no només s'observa en proteïnes de membrana com el transportador de glucosa d'eritròcit humà (Chin et al., 1986; Álvarez et al., 1987), el transportador de lactosa (Le Coutre et al., 1997; Patzlaff et al., 1998) i el transportador antiport multidrogués (Arkin et al., 1996), sinó que també la podem observar en el canals de ions o d'aigua (Mitra et al., 1995; Walz et al., 1995; Cabiaux et al., 1997; Doyle et al., 1998; Le Coutre et al., 1998; Tatulian et al., 1998). A part de la banda més intensa situada a 1547 cm^{-1} a l'amida II, també podem observar una banda molt estreta i intensa deguda a l'anell de tirosina que apareix a 1516 cm^{-1} . Val a dir, que l'espectre desconvulat dels components lipídics de la mostra, de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, no mostra cap pic que pogués interferir amb les bandes de proteïna, per això la quantificació de la banda o els canvis en la forma de la banda no es veuen afectades per la banda de lípids.

Per tal de comprovar la presència de les bandes obtingudes per desconvolució, es va sotmetre l'espectre d'absorbància de la MelB a dos mètodes d'anàlisi diferents. El primer és el mètode de restauració de màxima probabilitat (MLR), un mètode no lineal que reconeix el contingut de soroll de les dades de l'espectre i estima els components més probables de l'espectre utilitzant els paràmetres establerts que maximitzen la probabilitat de l'espectre obtingut (Stephenson, 1988; de Noyer and Dodd, 1991). Tal com es mostra a la figura 4.3c, el mètode de restauració de màxima probabilitat reafirma la forma i posició de les bandes obtingudes en la desconvolució de l'espectre d'absorció. La tercera derivada a l'espai de Fourier (figura 4.3d) és l'altre mètode utilitzat que identifica els pics que corresponen als màxims de les bandes obtingudes per desconvolució i per la màxima probabilitat de l'espectre d'absorció. Així doncs, tres mètodes d'aprimament de bandes (desconvolució de Fourier, derivació de Fourier i restauració de màxima probabilitat) indiquen que la permeasa de MelB mostra bandes d'absorció a dues freqüències distintes en l'interval de $1660\text{-}1651\text{ cm}^{-1}$, on normalment absorbeixen els components estructurals d'hèlixs α de les proteïnes de membrana (Holloway and Mantsch, 1989; Fabian et al., 1992; Arrondo et al., 1993; Surewicz et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995).

4. 3. 2. Obtenció dels espectres d'absorció de la MelB salvatge en D₂O

La incubació dels proteoliposomes de MelB en tampó amb D₂O comporta variacions substancials, si es compara el seu espectre d'absorció amb el de la MelB en H₂O (figura 4.4). En línies generals, l'absorció a l'infraroig es desplaça a números d'ona més baixos després del bescanvi H/D. El canvi més evident, es produeix a la regió de l'amida II, ja que la banda dels hidrògens bescanviats es desplaça de 1550 cm^{-1} cap a 1460 cm^{-1} (banda de lípid), formant una nova banda d'intensitat considerable anomenada amida II'. Un canvi més petit, és el que es produeix a la regió de l'amida I', ja que s'observa una banda molt similar a l'obtinguda en l'espectre d'absorció en H₂O. Aquest fet també es pot veure tant en els espectres desconvulats, com en els restaurats amb la màxima probabilitat o els derivats en D₂O: l'espectre d'absorció de la MelB en H₂O mostra els màxims d'intensitat de les bandes amida I i amida II a 1657 i 1645 cm^{-1} , respectivament i a 1654 (amida I') i

1544 cm^{-1} (amida II) després del bescanvi H/D. Així doncs, es confirma l'existència d'una proporció important d'estructura hèlix α . Si desconvulem l'espectre d'absorció de la MelB en D_2O , seguim observant dos pics principals situats a 1660 i 1653 cm^{-1} (figura 4.4), els quals es poden assignar a hèlixs α (Surewicz and Mantsch, 1988; Holloway and Mantsch, 1989; Fabian et al., 1992; Arrondo et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995). Aquesta assignació és coherent amb les dades d'estructura secundària determinades en H_2O . Encara més, es segueix detectant la presència d'aquestes bandes a 1660 i 1653 cm^{-1} després del bescanvi, el qual desplaça tota contribució d'estructura desordenada fora de la zona corresponent a hèlix α i per tant, es confirma la presència majoritària d'estructura hèlix α (Surewicz et al., 1993).

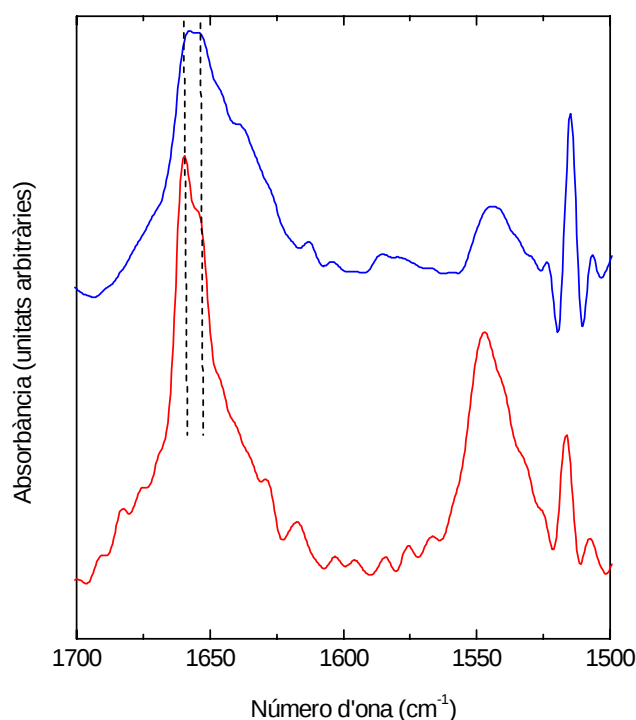


Figura 4.4. Espectres de les regions amida I i II de proteoliposomes de MelB desconvoluts, a 20°C. (Vermell) Resuspès en tampó amb H_2O . (blau) Resuspès en tampó amb D_2O . Els paràmetres utilitzats per a la desconvolució són els mateixos que els de la figura 4.3.

Per últim, el càlcul de la relació àrea amida II / àrea amida I en H_2O i D_2O indica, que un 80% aproximadament de H es bescanvien per D, en un període màxim de 48 hores. Segons aquests resultats, podem dir que la MelB mostra una elevada accessibilitat dels hidrògens amida, tal com també passa en el casos del transportador de glucosa d'eritròcit humà (Álvarez et al; 1987) i el transportador de lactosa (le Coutre et al., 1997) (s'observa més del 80% de bescanvi H/D). Tot i així, aquesta estimació pot ser imprecisa ja que poden existir incerteses en la línia base i en el grau de contribució de les cadenes laterals, però sí que s'observa com la major

part dels H dels enllaços peptídics es bescanvien. L'elevada accessibilitat al bescanvi H/D, podria reflectir la importància de conformacions flexibles en els transportadors de substrats que consisteixen en sucres hidrofílics llargs (Chin et al., 1986; Álvarez et al., 1987; le Coutre et al., 1997) o podria ser degut a l'existència de canals d'aigua o cavitats (Tatulian et al., 1998). Des d'aquest punt de vista, és important conèixer l'efecte dels substrats en el bescanvi per tal d'aprofundir més el coneixement de la relació accessibilitat i estructura.

4. 3. 3. Quantificació de l'estructura secundària

La figura 4.5A mostra l'espectre de l'amida I desconvulada, obtinguda d'una mostra de proteoliposomes de MelB en tampó amb H₂O, amb les bandes ajustades. Cal tenir en compte, que l'espectre d'aquesta figura no és exactament el mateix que el que es mostra a la figura 4.3, i això pot servir per tenir una idea de la reproductibilitat entre diferents mostres. Generalment, només existeixen petites diferències aparents entre aquests espectres, les quals no afecten l'anàlisi de les bandes, ja que hi ha grans similituds en llur posició i àrea. Per altre banda, els espectres obtinguts per la suma de les bandes individuals que constitueixen l'espectre desconvulat i l'espectre d'absorció original són quasi idèntics (línia discontinua). Les àrees d'aquestes components relatives a tota la banda amida I i les atribucions proposades estan descrites a la Taula 4.I. Les bandes situades per sobre de 1660 cm⁻¹, assignades a girs reversos representen un ~17% del total del senyal. Les bandes situades a 1660 i 1653 cm⁻¹ corresponents principalment a hèlixs α , representen el 32% i el 17%, respectivament del total del senyal de l'amida I. Aquest resultat indica que el 50% de l'estructura de la proteïna correspon a dominis hèlixs α , quantitat necessària per construir 12 segments transmembrana. Aquesta conclusió seria totalment compatible amb el model topològic proposat de la MelB que consisteix en 12 α -hèlix transmembrana (vegeu figura 1.5 de la introducció, Pourcher et al., 1996). La interpretació de la banda a 1647/46 cm⁻¹ resulta més complexa, ja que podria ser deguda a estructura hèlix 3₁₀, llaços oberts o fins i tot hèlixs α amb ponts d'hidrogen forts (Fabian et al., 1992; Arrondo et al., 1993; Surewicz et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995). Per últim, les bandes entre 1640 i 1625 cm⁻¹ es poden atribuir a làmina β i representen el 20% de l'estructura de la MelB.

Taula 4.I. Composició de l'estructura secundària i assignacions del transportador de melibiosa d'*E.coli*.

H ₂ O			D ₂ O		
Número d'ona (cm ⁻¹)	% àrea*	Assignació	Número d'ona (cm ⁻¹)	%àrea	Assignació
1683 1676 1669	17	Girs reversos	1683 1678 1671 1665	16	Girs reversos
1660 1653	49	α , no ordenada	1660 1653	42	α
1647	12	3_{10} , llaços oberts, α	1646	13	No ordenada, α
1640 1634+1628	20	Làmina β	1638 1629	29	Làmina β , 3_{10} , llaços oberts

* Aquests valors es van arrodonir al valor més pròxim del número sencer.

Les dues bandes situades a 1660 i 1653 cm⁻¹, representen un ~40% i un ~60%, respectivament del total del senyal de les hèlixs α . L'existència de dos tipus de bandes d'hèlixs α , contrasta amb els resultats obtinguts dels espectres de l'amida I d'altres proteïnes de membrana, incloent-hi altres transportadors, on només s'ha descrit una sola component d'estructura hèlix α (Álvarez et al., 1987; le Coutre et al., 1997). Tot i així, hi ha algunes similituds amb la senyal hèlix α analitzada per la bacteriorodopsina, on també s'hi distingeixen dues bandes principals a 1665 i 1658 cm⁻¹ corresponents a α_{II} i α_I , respectivament (Krimm and Dwivedi, 1982; Cladera et al., 1992; Torres et al., 1995). A més, Tatulian et al. (1997) van suggerir la coexistència de dos components d'hèlixs α a 1658 i 1650 cm⁻¹ en la fosfolipasa A₂ de secreció unida a bicapes lipídiques, corresponent la banda de 1658 cm⁻¹ a unes hèlixs α més flexibles i dinàmiques que les hèlixs estàndard. Així doncs, representa una possibilitat molt atractiva, que l'estructura funcional de la MelB contingui dos tipus de components hèlixs α . Tot i així, amb les dades que tenim no podem descartar completament la possibilitat que aquestes dues components d'hèlixs α

provinguin d'interaccions proteïna-proteïna o del fet que la mostra a analitzar consti d'un 70% de proteïna activa i un 30% inactiva.

Les dades dels components estructurals de la MelB en proteoliposomes en tampó amb D₂O (figura 4.5B) també es troben a la Taula I. Es pot observar una disminució de la intensitat de les bandes situades a números d'ona més alts i un increment de les bandes situades a números d'ona més baixos. La quantificació de l'estructura secundària és lleugerament diferent, un ~16% de girs reversos (bandes a 1683, 1678, 1671 i 1665 cm⁻¹), un 42% d'hèlixs α (20% de la banda 1660 i 22% de 1653 cm⁻¹) i un 13% d'estructura no ordenada més hèlixs α (banda a 1646 cm⁻¹). Després del bescanvi H/D, les bandes corresponents a estructures no ordenades es desplacen a números d'ona inferiors a l'interval de 1660 a 1650 cm⁻¹ (Surewicz et al., 1993). Les bandes a 1638 i 1629 cm⁻¹ corresponen al 29% del total d'estructura i es poden assignar a una mescla de làmina β , llaços oberts i hèlixs 3₁₀ (Fabian et al., 1992; Arrondo et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995).

Les bandes situades en la zona de l'espectre corresponent a hèlixs α sumen aproximadament, un 49% del total de l'estructura. En aquest percentatge hi pot

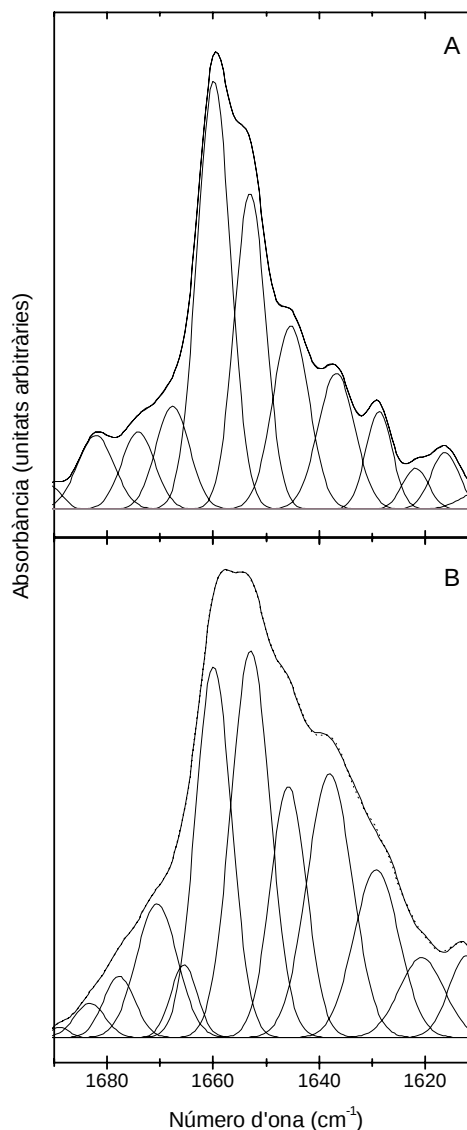


Figura 4.5. Espectres de l'amida I desconvolada i amb les bandes ajustades. (A) Proteoliposomes de MelB en tampó amb H₂O. (B) Proteoliposomes de MelB en tampó amb D₂O.

contribuir l'absorció de l'estructura no ordenada, però del que sí podem estar segurs és que la MelB té un mínim del 42% d'hèlixs α regulars, al qual s'hi ha de sumar un cert percentatge d'hèlixs 3_{10} que apareix a 1646 cm^{-1} , ja que aquesta és la quantificació de MelB després del bescanvi H/D. Anteriorment en la literatura, ja es remarcava el fet que la quantificació d'estructura secundària d'una proteïna a partir dels espectres desconvulats pot tenir varis inconvenients (Holloway and Mantsch, 1989; Arrondo et al., 1993). També és interessant de tenir en compte, que la introducció dels coeficients d'extinció descrits per de Jongh et al. (1996) en el càlcul per la mostra en H_2O dona un 48% d'hèlixs α , 12% de làmina β , 26% de girs reversos i 14% d'altres estructures. Unes dades, que no qüestionen la idea general de l'estructura de la MelB descrita abans.

Així doncs, d'acord amb les dades obtingudes de la MelB en H_2O i en D_2O , podem estimar les estructures de la MelB que queden, consisteixen en un 10% de girs reversos, un 7% d'estructura no ordenada i fins a una 20% de làmina β . Part d'aquesta estructura làmina β , podria correspondre a un llaç citoplasmàtic de 30 aminoàcids de llarg (S206-L234) corresponent al llaç 10-11 de la MelB, el qual està predit que sigui estructura làmina β (dades no publicades). Tot i així, s'han de realitzar experiments addicionals per tal de desxifrar clarament la proporció de làmina β en la proteïna i la correspondència de dominis.

4. 3. 4. *Estudi de l'estructura de la MelB salvatge solubilitzada*

La MelB solubilitzada en 0.1% DM és una condició en la qual la proteïna reté la seva activitat (Pourcher et al., 1995). La figura 4.6 (*espectre negre*) mostra l'espectre desconvulat de l'amida I de la MelB solubilitzada en 0.1% DM, amb dues bandes principals situades a 1658 i 1651 cm^{-1} , només lleugerament desplaçades en comparació amb la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli* (figura 4.3). A més, existeixen d'altres bandes situades en números d'ona lleugerament diferents, reflectint algunes diferències en quan a conformació, quan la MelB està solubilitzada. Tot i les diferències, existeix una estructura quasi igual a la nativa de la MelB solubilitzada en DM. Així, la quantificació de l'estructura secundària dona un contingut del ~46% d'hèlixs α (de les bandes a 1658 i 1651 cm^{-1} , tot i que aquesta última banda deu contenir una part d'estructura no ordenada). Els girs reversos i

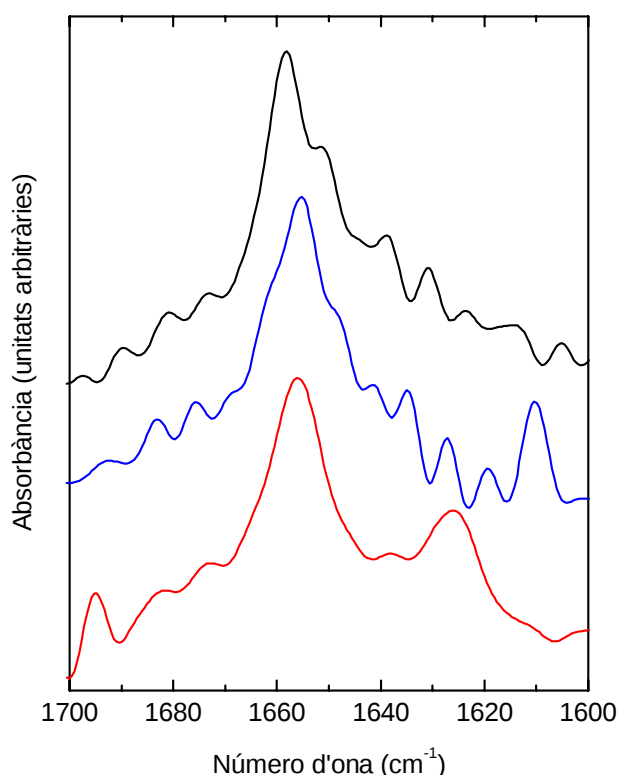


Figura 4.6. Espectres de l'amida I desconvolada de la MelB solubilitzada en detergent en tampó amb H₂O. (*Espectre negre*) Solubilitzada en 0.1% de DM (p/p). (*Espectre vermell*) Solubilitzada en tritó X-100 (1% p/v). (*Espectre blau*) Solubilitzada en 0.1% DM després de 24 h a 42°C. Tots els espectres es van adquirir a 4°C i van ser desconvolats tal com s'indica al peu de figura 4.3.

làmina β , representen el ~24% i ~20%, respectivament. La banda situada a 1645 cm⁻¹ la qual pot ser atribuïda a una barreja d'hèlixs 3_{10} i llaços oberts, correspon al 10% d'estructura restant.

La solubilització de la MelB reconstituïda en 1% (pes/volum) Tritó X-100 (TX-100), té un efecte molt més dramàtic (figura 4.6, *espectre vermell*), ja que comporta la seva desnaturalització. Un dels canvis més importants és la supressió de les dues bandes d'hèlixs α (1660-1650 cm⁻¹) observades tant a la MelB reconstituïda com a la solubilitzada en 0.1% DM, per una sola banda principal d'hèlix α situada a 1656 cm⁻¹.

Aquesta banda ocupa una posició corresponent a un rang d'hèlixs α més estàndards (Goormaghtigh et al., 1994). Tot i aquesta diferència, l'ajust de bandes de la MelB en TX-100 dóna un contingut d'estructura secundària similar al de la MelB reconstituïda o solubilitzada en DM. De manera que s'ha calculat un 46% d'hèlixs α (banda a 1656 cm⁻¹), un 25% de girs reversos, 17% de làmina β i 13% d'una barreja de làmina β , hèlixs 3_{10} i estructura no ordenada. La prova d'activitat de la MelB solubilitzada en TX-100 per espectroscòpia de fluorescència, va resultar en una proteïna no funcional, ja que no responia a l'addició de substrats.

La desnaturalització de la MelB solubilitzada en DM, es pot dur a terme escalfant moderadament (24h a 42°C). La desconvolució de l'espectre a la regió de

l'amida I (figura 4.6, *espectre blau*) mostra la presència de dues bandes noves situades a 1625 i 1695 cm^{-1} , corresponents a estructures β -intermolecular. Aquest patró d'aparició de bandes és molt freqüent en els casos de desnaturalització tèrmica de proteïnes, indicant l'agregació de la proteïna (Clark et al., 1981; Prestrelski et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995). A més, s'observa l'aparició d'una sola banda d'hèlix α a 1656 cm^{-1} igual que en el cas de la MelB solubilitzada en TX-100. En aquest cas però, el contingut d'estructura hèlixs α disminueix fins al ~37% junt amb un clar increment en el contingut de làmina β del ~36%. El test d'activitat de la MelB sota l'addició de substrats per espectroscòpia de fluorescència també va donar negatiu, com en el cas de la MelB solubilitzada en TX-100.

Aquests resultats de l'anàlisi de l'estructura secundària i la seva funcionalitat, reafirmen la idea descrita abans, sobre la importància de l'existència de dos tipus de bandes hèlixs α necessàries per al funcionament de la MelB, ja que aquestes no apareixen en cas de la proteïna solubilitzada en TX-100 (desnaturalitzada) o escalfada en DM (agregada), estats en els quals la proteïna no és funcional.

4. 3. 5. Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats

Varis estudis previs sobre les propietats de la MelB reconstituïda per fluorescència intrínseca suggereixen l'existència de canvis conformacionals per l'addició de substrats naturals de la MelB (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996). Degut aquests indicis, es va investigar l'efecte de la unió de Na^+ i/o melibiosa en els espectres de FTIR. Tal com es pot observar a la figura 4.7, ambdós substrats, per separat o junts, indueixen canvis significatius en l'espectre d'absorció d'IR, concretament a les bandes situades a 1660 i 1653 cm^{-1} assignades a hèlixs α . La unió del Na^+ produeix una disminució de la banda a 1653 cm^{-1} i també un lleuger augment de la banda i un lleuger desplaçament a longituds d'ona més baixes de la banda de 1660 cm^{-1} . En canvi, la incubació amb el catió K^+ no va produir cap efecte (dades no mostrades). La unió de melibiosa produeix un lleuger corriment de les dues bandes d'hèlixs α a 1660 i 1653 cm^{-1} a una nova posició de 1658 i 1651 cm^{-1} , respectivament i una disminució de la intensitat d'aquesta segona banda. Aquest efecte, no es va observar quan es va addicionar sacarosa (un substrat que no és

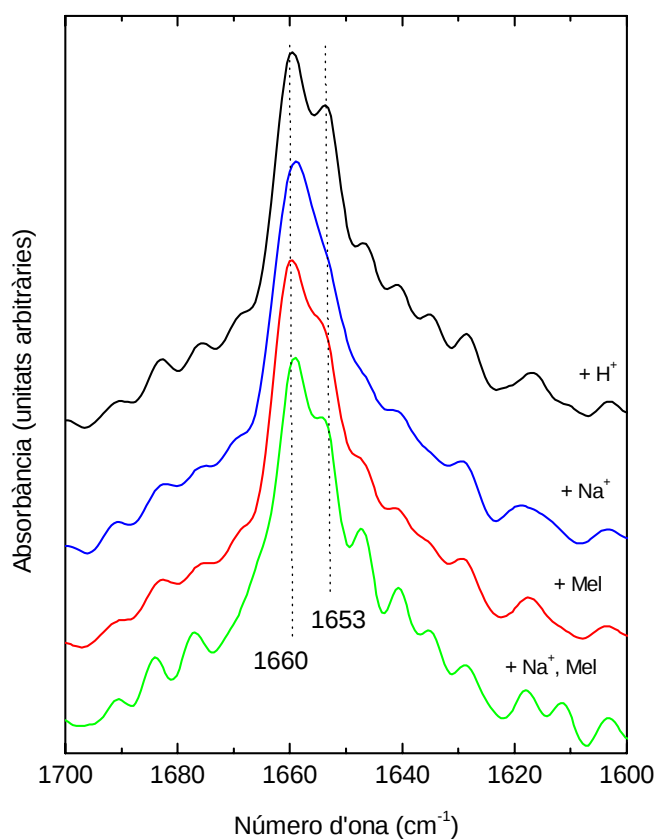


Figura 4.7. Efecte dels substrats sobre l'estructura de la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli* i en tampó amb H₂O. Es representa l'amida I desconvulada amb els mateixos paràmetres que la figura 4.3. Tot els espectres es van adquirir a 20°C.

les dues components d'hèlixs α a 1660 i 1653 cm⁻¹, suggereixen que la interacció de l'ió o el sucre o ambdós junts amb la MelB, modifica les propietats d'aquestes components estructurals. Val a dir, que canvis a nivell d'hèlixs α deguts a la interacció amb un sucre ja han estat descrits pel transportador de glucosa d'eritròcit (Chin et al., 1986), tot i que no ha sigut així per la permeasa de lactosa (le Coutre et al., 1997). Si els canvis espectrals de la MelB produïts per l'addició dels substrats impliquen reorientacions estructurals, és una pregunta que no podem respondre encara. Tot i així, les modificacions de les components d'hèlixs α de la MelB degudes a la unió de substrats confirmen diverses evidències espectroscòpiques i bioquímiques, que indiquen ajustaments cooperatius de la MelB deguts a la unió de substrats (Mus-Veteau et al., 1995; Gwizdek et al., 1997; Maehrel et al., 19998;

transportat per la MelB). L'addició d'ambdós substrats, Na⁺ i melibiosa, reverteix en part els efectes produïts per la unió de Na⁺ sol. És a dir, la diferència en intensitat entre les bandes a 1660 i 1653 cm⁻¹ produïda per l'addició de Na⁺, torna a disminuir situant-les en una posició més igualitària en intensitat. A més d'aquests canvis a nivell d'hèlixs α , també es produeixen d'altres canvis més petits en les zones corresponents a girs reversos i a làmines- β .

Aquests canvis observats a nivell d'espectre d'amida I sota l'addició de substrats diferents, i més concretament els canvis produïts a nivell de

Cordat et al., 1998). Encara més, estudis de fluorescència intrínseca i d'anàlisi de FRET, suggereixen que aquests canvis podrien sorgir a nivell d'hèlixs que formen part de la regió d'unió al sucre. D'aquesta manera, es pot especular sobre el fet que les propietats d'absorció dels dominis de les hèlixs que voregen el lloc d'unió al sucre canvien de forma concomitant, i això dóna lloc a la possibilitat interessant de què els substrats indueixen canvis en les hèlixs α .

Un altre fet a destacar dels espectres desconvulats de la MelB en diferents condicions de substrats, és que les dues components d'hèlixs α a la regió de 1660 a 1650 cm^{-1} de l'amida I hi segueixen essent presents. Encara més, aquestes dues components sofreixen canvis diferents depenent del substrat addicionat, confirmant els indicis anteriors sobre l'existència de dues components d'hèlixs α en la MelB funcional. Per altra banda, si aquestes dues components tinguessin origen en dos tipus de poblacions de MelB funcional (70%) i no funcional (30%) seria molt difícil d'imaginar que la component corresponent a l'hèlix α no funcional es modifiqués per la presència de substrats.

4. 4. Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia ATR-FTIR

Fins a dia d'avui, s'han realitzat molt pocs estudis de cinètiques de bescanvi H/D en proteïnes de membrana i a més han estat restringides només a l'anàlisi a nivell de la regió amida II (Goormaghtigh et al., 1994; Rath et al., 1998; Saba et al., 1999). Tot i així, s'ha demostrat que aquesta tècnica és una bona eina per l'estudi dels processos cinètics de moltes proteïnes solubles (de Jongh et al., 1997; de Jongh et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999). Per aquesta raó, la seva aplicació en l'estudi de les propietats dinàmiques de les proteïnes de membrana sembla ser molt interessant.

L'estudi de la cinètica de bescanvi H/D es va dur a terme sobre mostres de MelB salvatge i de mutant de R141C en diferents condicions de substrats. L'estudi de la cinètica es va realitzar a nivell de bescanvi global de la proteïna mitjançant la banda amida II i a nivell de cada estructura secundària mitjançant les intensitats de la banda amida I, per tal d'esbrinar canvis conformationals deguts a l'addició de substrats. Cronològicament però, es va fer un primer treball sobre la cinètica de bescanvi H/D de la MelB salvatge i posteriorment es va realitzar un altre del mutant

R141C. A continuació, exposarem els resultats experimentals de la MelB salvatge i en un apartat següent, els resultats del mutant R141C.

Es van realitzar cinètiques de bescanvi H/D de la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli*. Per tal d'estudiar l'efecte dels substrats naturals de la MelB en el procés de deuteració, es van pre-equilibrar en medis de composicions determinades per tal de donar lloc a diferents complexos: (a) el complex binari H^+ /MelB en un medi lliure de Na^+ i sucre; (b) el complex binari Na^+ /MelB en un medi lliure de sucre amb NaCl 10 mM; (c) el complex ternari H^+ /mel/MelB en un medi lliure de Na^+ amb melibiosa 5 mM; (d) i finalment el complex ternari Na^+ /mel/MelB en un medi amb NaCl 10 mM i melibiosa 5 mM. Aquestes quatre condicions de substrats són representatives de la funció de la proteïna, ja que els estudis de fluorescència intrínseca i de FTIR anteriorment esposats en aquest treball suggereixen canvis estructurals deguts a la seva addició (Mus-Veteau et al., 1996).

4. 4. 1. La banda amida II i la cinètica de bescanvi H/D global de la MelB salvatge

Es va estudiar la deuteració a temps real de films secs de proteoliposomes de MelB, produïts per l'exposició a una corrent de N_2 saturat de D_2O , per mitja de la mesura d'espectres d'ATR-FTIR a la regió de 1800 a 1400 cm^{-1} . L'experiment il·lustrat en la figura 4.8 es va realitzar sobre preparacions del complex binari H^+ /MelB. Els espectres representats es van mesurar abans de començar el procés de deuteració, $t = 0$ (*espectre 1*) i a diferents temps després de començar la deuteració (*espectre 2-4*). Tots els espectres mostren tres grans pics d'absorció, a 1739 cm^{-1} (fosfolípids), a 1657 cm^{-1} (amida I) i a 1544 cm^{-1} (amida II). Un cop ha començat el procés de deuteració, la banda d'amida II es desplaça uns 100 cm^{-1} cap a números d'ona menors i forma una nova banda amida II encavalcada amb la banda a 1460 cm^{-1} (la qual correspon majoritàriament a la vibració de tiores del lípid CH_2). Tal com s'ha descrit prèviament (de Jongh et al., 1997), part de la disminució de l'absorbància de totes les bandes dels espectres 2-3 (figura 4.8A) es deu a l'increment en la hidratació del film el qual resulta en un inflament dels proteoliposomes fixats en el cristall de germani, produint una separació del pas del feix de llum incident i per tant, una disminució de l'absorbància. La figura 4.8B

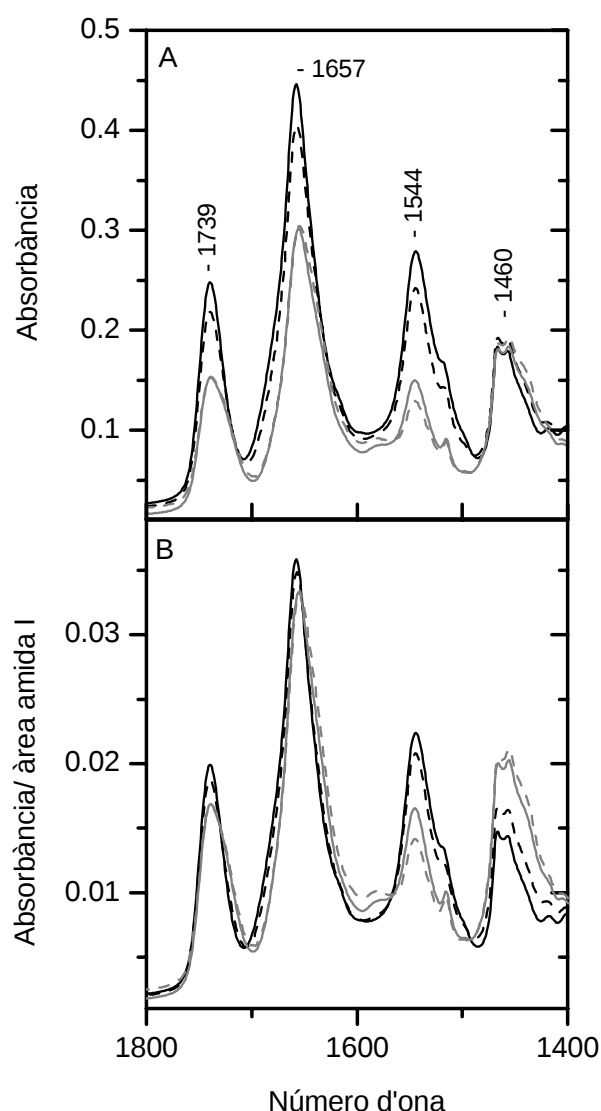


Figura 4.8. (A) Espectres de proteoliposomes de MelB a la regió 1800-1400 cm^{-1} inicialment en tampó MES 20 mM, KCl 10 mM (pH 6.6) adquirit abans d'iniciar-se el bescanvi H/D a $t = 0$ min (*negre sòlid*) i després d'iniciar-se: a $t = 2.5$ min (*negre línia discontinua*), a $t = 34$ min (*gris sòlid*) i a $t = 770$ min (*gris línia discontinua*). (B) Els mateixos espectres del pannel A corregits per l'inflament del film mitjançant l'àrea de l'amida I (1696-1600 cm^{-1}) com a estàndard intern i representats per la relació absorbància/àrea amida I. La subtracció de la contribució de l'aigua atmosfèrica es va realitzar a tots els espectres.

mostra els mateixos espectres corregits per l'inflament del film usant la relació amida II/amida I com a factor de normalització (vegeu materials i mètodes). Quan comparem el tercer i quart espectre de la figura 4.8A, no observem més disminució de les bandes C=O i amida I, tot i que s'observa un decreixement continu de l'amida II. D'aquestes observacions, podem deduir que al voltant dels 35 minuts l'inflament del film s'ha acabat encara que el bescanvi H/D continua.

L'accessibilitat global de les proteïnes al D_2O , es pot seguir mesurant la variació de l'àrea entre 1565 i 1525 cm^{-1} del senyal de l'amida II, corregida per l'àrea de l'amida I, respecte al temps (vegeu revisió Goormaghtigh et al., 1999). La figura 4.9A mostra el canvi en el senyal d'amida II del complex binari H^+/MelB al llarg del temps. Al final de l'experiment (als 770 minuts), la quantitat d'hidrògens amida bescanviats és de l'ordre d'un 55%. Aquest

resultat basat en el senyal de l'amida II, ens proveeix informació sobre l'accessibilitat

de tota la proteïna i l'extrapolació a les 24 h de les dades experimentals, ens mostra una MelB relativament accessible amb un bescanvi H/D del 60%. En els resultats anteriorment exposats en aquest treball en el capítol 4.3, el bescanvi H/D calculat era del 80% però cal tenir en compte que no hi havia cap correcció sobre la contribució de les cadenes laterals. Si es fa aquesta correcció de les dades experimentals obtingudes dels espectres de FTIR de transmissió en D₂O, obtenim un resultat del 60% de bescanvi H/D, coherent amb els resultats ara presentats. El percentatge de bescanvi H/D de la MelB és molt més baix que els bescanvis obtinguts per altres transportadors politòpics de membrana de substrats hidrofílics, tal com el transportador de glucosa d'eritròcit humà que és del 85% (Álvarez et al., 1987), la permeasa de lactosa d'*Escherichia coli* del 95% (le Coutre et al., 1997) o el transportador mitocondrial ADP/ATP del 85% (Lórenz et al., 2001).

La forma de les corbes de bescanvi H/D depèn del nombre d'hidrògens i el temps en què es bescanvien. Dit d'una altra manera, són les transformacions de Laplace de la distribució de funcions dels temps de bescanvi de cada grup hidrògens amida. Així, per tal d'obtenir aquesta distribució

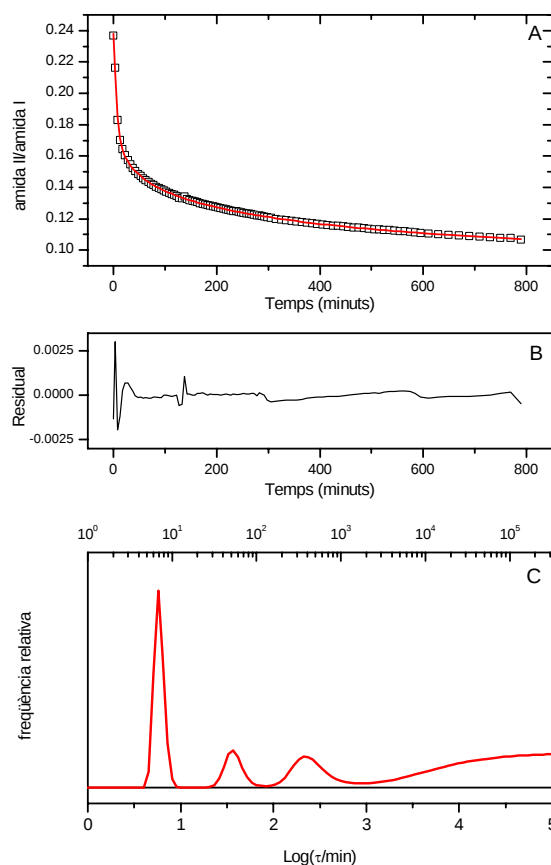


Figura 4.9. (A) Cinètica de bescanvi H/D de la raó àrea amida II/àrea amida I del film del complex H⁺/MelB. Les dades s'han corregit per l'inflament del film, i la contribució de les cadenes laterals i de lípids d'*E.coli*. La línia vermella representa l'ajust de les dades experimentals mitjançant la transformació inversa regularitzada de Laplace. (B) El residual obtingut de la resta de la cinètica experimental menys l'ajust matemàtic. El gràfic s'ha expandit 100 vegades respecte al pannel A. (C) La funció de distribució de la cinètica de bescanvi H/D de A mitjançant transformació inversa de Laplace.

de poblacions d'hidrògens amida es va utilitzar un mètode regularitzat per calcular la transformada inversa de Laplace de les dades experimentals (figura 4.9C). Aquesta distribució de poblacions es resol en quatre components de diferent proporció i a diferents constants de temps. Tenint en compte el rang de temps que dura l'experiment, podem considerar les tres primeres components de la distribució, com la població de protons amida bescanviables: una component de bescanvi ràpid amb una constant de temps de situada a uns 6 min, una de bescanvi intermedi a 35 min i una de bescanvi lent a 235 min. L'última, és una component molt lenta amb una constant de temps per sobre dels 1000 min i probablement, representa la població d'hidrògens amida que realment no es bescanvien o bé una fracció que no s'analitza perquè no es bescanvien durant l'experiment. La transformació de Laplace directa de la distribució de poblacions calculada, es representa en una línia vermella en la figura 4.9A, on es pot apreciar que s'ajusta bé a les dades experimentals. Així, la diferència entre les dades experimentals i les dades ajustades es mostra a la figura 4.9B, la qual es pot considerar representant del soroll existent en el càlcul de la distribució de poblacions.

Ja hem esmentat abans, que en estudis previs per espectroscòpia de fluorescència i FTIR demostren que l'addició de

substrats a la MelB comporta un canvi més o menys general en la conformació de la

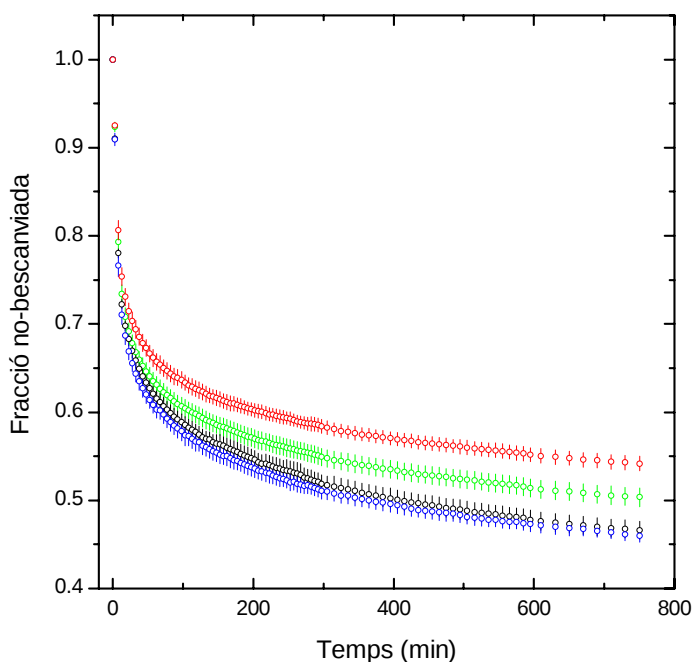


Figura 4.10. Cinètiques de bescanvi H/D de la banda amida II de la MelB en diferents condicions de substrats. En *negre*, es representa el complex $H^+/MelB$, en *blau*, el complex $Na^+/MelB$, en *vermell* el complex terciari $H^+/mel/MelB$ i en *verd* el $Na^+/mel/MelB$. La barra d'error representa l'error estàndard calculat de $n = 3$ experiments. Tots els espectres es van corregir per contribució d'aigua atmosfèrica, cadenes laterals, lípids d'*E.coli* i inflament del film.

proteïna (Mus-Veteau and Leblanc., 1996; Maehrel et al., 1998; Cordat et al., 1998; Cordat et al., 2000). Així doncs, per tal d'analitzar si la modificació de propietats del bescanvi H/D global de la MelB (quantitat i cinètica) o dels diversos components d'estructura secundària, acompanya les variacions induïdes per unió de substrats, es va comparar en primer lloc la cinètica de bescanvi de tota l'amida II

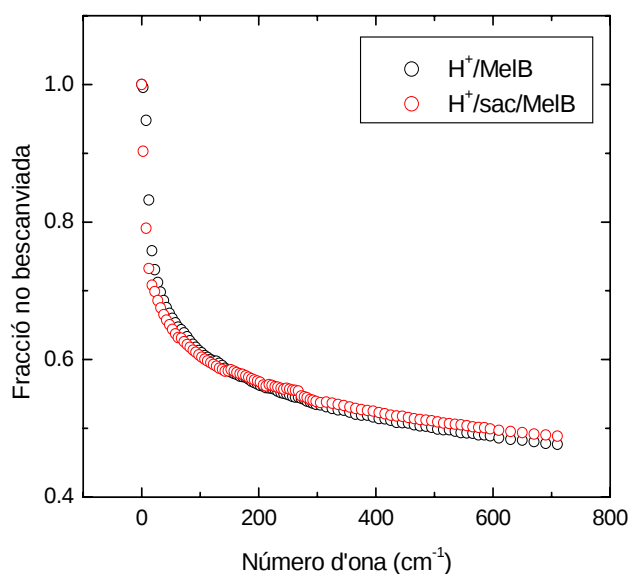


Figura 4.11. Comparació de les cinètiques de bescanvi H/D de la banda amida II dels complexos H⁺/MelB (sense substrats) i H⁺/sac/MelB (addició de sacarosa 5 mM). A totes les dades se'ls ha aplicat les correccions indicades a la figura 4.10.

pels diferents complexos de MelB. La figura 4.10 ens mostra les dades de les cinètiques de bescanvi per a cada complex de la MelB. Al minut 770, obtenim un bescanvi total d'un 54% similar (negre i blau) pels complexos binaris H⁺/MelB i Na⁺/MelB. En canvi, el bescanvi H/D del complex ternari H⁺/mel/MelB decreix un 8% en comparació amb els complexos binaris (vermell, 46% de bescanvi). El complex ternari Na⁺/mel/MelB es situa en una posició intermèdia amb un 50% de bescanvi (verd). Aquests resultats apunten de forma concloent, que l'addició de melibiosa té un efecte protector de l'estructura envers el bescanvi H/D, ja que indueix canvis conformacionals que protegeixen els protons del bescanvi per deuterons. Els possibles efectes inespecífics provocats per la unió de melibiosa varen ser descartats quan es van analitzar els efectes de l'addició de sacarosa 5 mM, la qual no és un substrat natural de la MelB (Mus-Veteau et al., 1995).

La figura 4.11 ens mostra que no hi ha diferències en el nivell de bescanvi H/D entre els complexos H⁺/MelB i H⁺/sacarosa/MelB, de manera que reafirma el fet que l'addició de sacarosa no confereix protecció a la MelB envers el bescanvi H/D. Per altra banda, si afegim sacarosa 50 mM s'observa una disminució de la quantitat de

bescanvi H/D, encara que no tant com la produïda per l'addició de melibiosa 50 mM (dades no mostrades). Aquest resultat indica que a elevades concentracions de sucre (que en el film sec és de l'ordre de 20 vegades més) es produeixen efectes inespecífics.

Per tal d'analitzar la influència dels diferents substrats naturals de la MelB sobre

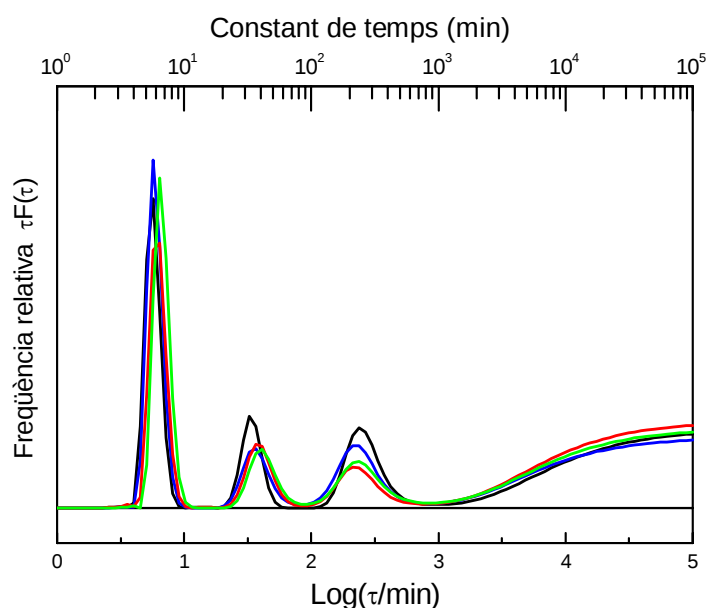


Figura 4.12. Distribució de funcions de l'amida II de la MelB en diferents condicions de substrats obtingudes mitjançant la transformació inversa de Laplace de les cinètiques de bescanvi H/D. En *negre*, es representa la MelB sense substrats afegits, amb addició de NaCl 10 mM (*blau*), amb addició de melibiosa 5 mM (*vermell*) i amb addició de melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM (*verd*).

les constants de temps i de magnitud de cada component de la cinètica, es va comparar les distribucions de poblacions dels bescanvi H/D de la banda amida II dels diferents complexes de la MelB (figura 4.12 i taula.II). En general, es pot observar una distribució de poblacions similar a nivell de constant de temps i magnitud dels components de bescanvi de protons entre les diferents condicions de

substrats. Tot i així, són visibles algunes diferències de comportament de la MelB segons estigui en presència de melibiosa o no. Una d'elles, és la tendència que mostra el complex ternari $H^+/mel/MelB$ a reduir la magnitud de les components cinètiques, sobretot pel que fa a la component lenta (Taula 4.II). Per altre banda, quan la MelB s'incuba amb Na^+ , la component ràpida és la més gran comparada amb la resta de condicions de substrats. Pel que fa a les constants de temps de cada component, el complex ternari $Na^+/mel/MelB$ mostra les dues primeres components ràpida i intermèdia, més lentes que en els altres tres casos. Aquests resultats indiquen que la unió de qualsevol dels substrats naturals de la MelB, d'un

de sol o ambdós alhora, indueixen canvis conformacionals evidenciats pels canvis

Taula 4.II. Components bescanviats obtinguts del seguiment de la banda amida II de la MelB en diferents condicions de substrats durant el bescanvi H/D.

Components		H ⁺	Na ⁺	H ⁺ /melibiosa	Na ⁺ / melibiosa
All					
Ràpida	Constant de temps (min)	5.6 ± 0.2 ^a	5.8 ± 0.4	6.1 ± 0.2	6.5 ± 0.3
	Àrea (%)	26.7 ± 0.9	29.4 ± 0.6	25.0 ± 1.0	28.2 ± 0.8
Intermèdia	Constant de temps (min.)	34 ± 2	35 ± 2	38 ± 3	40 ± 2
	Àrea (%)	10.4 ± 0.4	8.9 ± 1.2	9.1 ± 0.6	8.6 ± 0.5
Lenta	Constant de temps (min.)	240 ± 20	220 ± 20	220 ± 20	235 ± 15
	Àrea (%)	15.5 ± 0.4	14.3 ± 0.8	9.6 ± 0.5	11.3 ± 0.4
No bescanviable	Constant de temps (min.)	>1000	>1000	>1000	>1000
	Àrea (%)	47.4 ± 0.9	45.5 ± 2.0	56.5 ± 1.1	52.0 ± 0.5

^a Tots els errors es refereixen als errors estàndards obtinguts de mostres independents en les mateixes condicions per n = 3 experiments.

en les característiques del bescanvi H/D i per tant, estan d'acord amb d'altres conclusions descrites en aquest treball.

La comparació dels nivells de bescanvi H/D extrapolats a 24 hores, suggereixen que la unió de melibiosa a la MelB redueix significativament l'accessibilitat de la proteïna al solvent. Ambdós anàlisi, la quantitat total de bescanvi H/D i les constants de temps de la cinètica de bescanvi, evidencien una reducció sistemàtica de la mida de les diferents poblacions dels protons bescanviabls induïda pel sucre, amb el corresponent augment de la població de protons no bescanviabls (taula 4.II). Per aquesta raó, podem concloure que els canvis estructurals i dinàmics induïts per la melibiosa, incrementen la protecció d'alguns aminoàcids que estaven total o parcialment accessibles abans de l'addició del sucre. Aquests resultats, que indiquen un increment en el grau de compactació de la proteïna, estan d'acord amb el fet que la MelB purificada en presència de melibiosa és molt més estable (Pourcher et al., 1995). En absència de sucre però, la quantitat de bescanvi H/D de la MelB en presència de Na⁺ (Na⁺/MelB) o H⁺ (H⁺/MelB) és comparable. Per contra, la unió

d'ambdós substrats quan el catió unit és el Na^+ , dóna diferències respecte el complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{MelB}$, situant-se en una posició intermèdia. Encara més, les diferències trobades en les funcions de distribució (Taula 4.II) indiquen que la unió de Na^+ i/o melibiosa indueix arranjaments estructurals que desemboquen en canvis de les propietats d'accessibilitat (mida de les components, constants de temps) dels protons amida ja bescanviabls. Aquestes observacions concorden amb el fet que la incubació de MelB amb almenys 10 mM d'ions sodi, modifiquen l'afinitat de la MelB pel sucre (Mus-Veteau et al., 1995; Pourcher et al., 1995; Cordat et al., 2000). No obstant, les nostres dades indiquen que els canvis produïts per la unió de Na^+ a la MelB no resulten en cap modificació radical de les característiques del seu bescanvi H/D.

4. 4. 2. La banda d'amida I i la cinètica de bescanvi H/D a nivell d'estructura secundària

Mentre els canvis observats a l'amida II són deguts al conjunt de la proteïna, l'amida I ens pot proporcionar informació de les diferents estructures secundàries. Així, les intensitats a diferents números d'ona de la banda d'amida I de la proteïna són bons indicadors de la contribució individual dels components estructurals (estructures de girs reversos, d'hèlixs α , o de làmina β) del procés bescanvi H/D global (de Jongh et al., 1997). La troballa d'aquestes freqüències a les quals se segueix la variació de cada estructura, s'aconsegueix examinant els espectres de diferència a diferents temps de la cinètica de bescanvi desconvulats en les diferents condicions de substrats. A la figura 4.13A, podem observar els espectres de diferència desconvulats, obtinguts del complex ternari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$. Els espectres de diferència s'obtenen d'un espectre adquirit a temps t després de l'inici del bescanvi, el qual es desconvula i se li resta l'espectre a temps zero, desconvulat. Així, aquests espectres de diferència ens indiquen a quins valors de freqüència trobarem els canvis més importants. D'aquesta manera i per les dades obtingudes pels estudis de FTIR anteriorment realitzats (capítol 4.2), es van seleccionar els següents números d'ona: 1678 cm^{-1} per a seguir els canvis en els girs reversos, ja que té suficient intensitat i està lluny de la contribució de l'estructura làmina β ; 1660 cm^{-1} es va preferir per comptes de 1655 cm^{-1} perquè aquest últim està molt a prop

d'un punt isobàstic per mesurar les hèlixs α i estructures no ordenades, i a 1626 cm^{-1} en comptes del 1623 cm^{-1} per mesurar l'estructura làmina β , perquè les

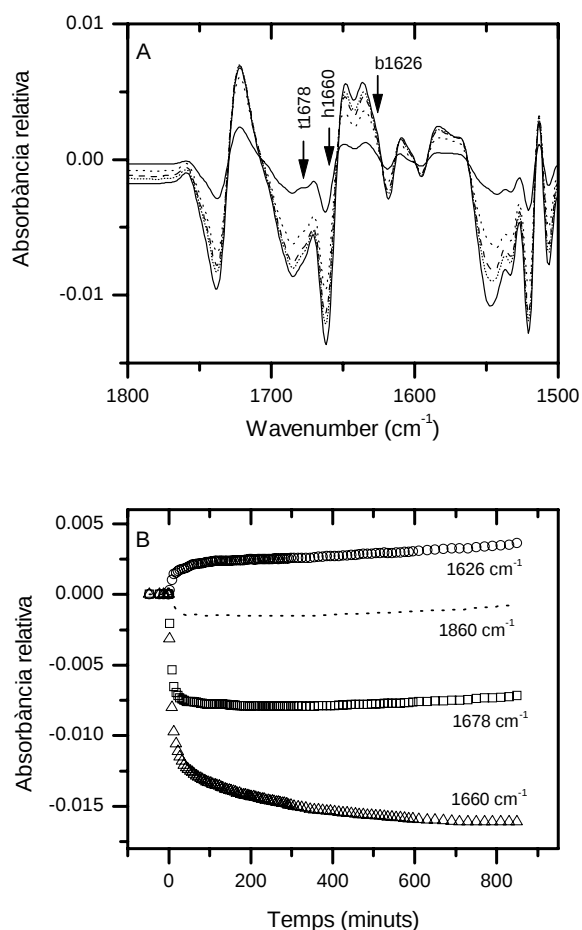


Figura 4.13. Anàlisi de la cinètica de bescanvi de l'amida I del complex terciari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MeIB}$. (A) Diferència dels espectres desconvulats a diferents temps durant el bescanvi H/D a la regió $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Les fletxes a 1678 , 1660 i 1626 cm^{-1} senyalen les intensitats que s'enregistren al pannel B. (B) Canvis d'intensitat dels espectres de diferència desconvulats de A durant el bescanvi H/D. Tots els espectres es van desconvular i restar pel primer espectre no bescanviat. La barra d'error representa l'error estàndard de $n = 2\text{--}3$ experiments.

variacions presents en aquest últim número d'ona eren de poca amplitud. A més, per tal de millorar l'exactitud de les mesures d'intensitats es va utilitzar una línia base a 1860 cm^{-1} , ja que en aquest número d'ona no existeix absorció per part de la mostra. Les intensitats negatives (com en el cas de la intensitat a 1678 cm^{-1}) són degudes al fet que representen la desaparició de protons amida que es bescanvien per deuterons i que per tant, es desplacen uns $5\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ cap a números d'ona més baixos. Per contra, les intensitats positives són degudes a l'aparició d'estructures deuterades procedents de números d'ona més alts. La figura 4.13B mostra les variacions d'intensitat d'aquests tres números d'ona escollits representatius de cada estructura secundària de la regió d'amida I i de la línia base en

funció del temps al llarg de la cinètica de bescanvi H/D. Pot observar-se com la cinètica corresponent als girs reversos (1678 cm^{-1}) és molt ràpida, mentre que la

corresponent a les hèlixs més estructura no ordenada és una mica més lenta, i la corresponent a les estructures β és encara més lenta.

Aquest tipus d'anàlisi, és especialment interessant quan es vol comparar com varia la contribució de cada un dels components estructurals sota diferents condicions de substrats durant el bescanvi H/D. Per aquesta raó, es va mesurar la variació del senyal a 1678, 1660 i 1626 cm^{-1} respecte el temps, de cada complex de la MelB. Els resultats s'exposen a la figura 4.14, i es pot observar com la quantitat de bescanvi H/D de l'estructura làmina β (1626 cm^{-1} , *pannell superior*) depèn dels substrats amb un patró de variacions molt similar al patró mostrat per

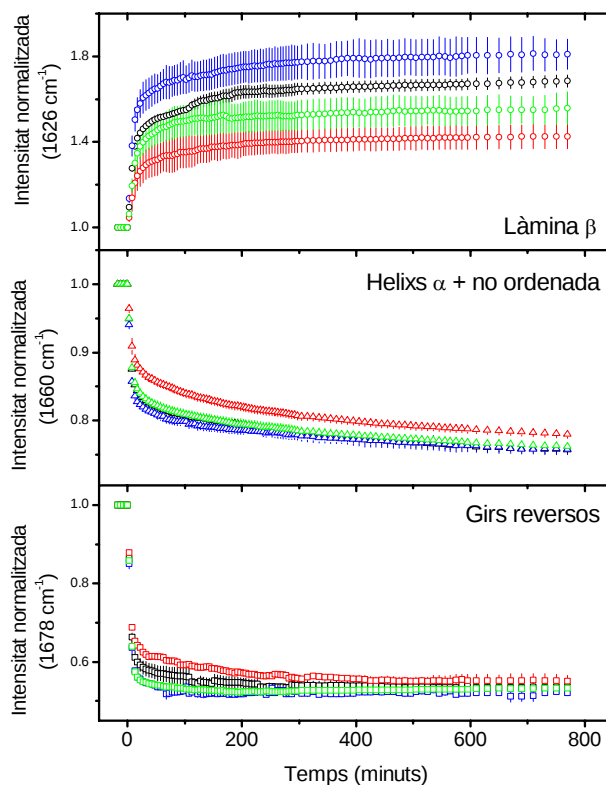


Figura 4.14. Cinètiques de bescanvi H/D dels components d'estructura secundària de la MelB en diferents condicions de substrats. Els colors corresponen a: (*negre*) a la MelB sense substrats incubats, (*blau*) després de la incubació amb NaCl 10 mM, (*vermell*) després d'afegir melibiosa 5 mM i (*verd*) després d'afegir melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM. L'escala vertical s'ha ajustat a unitats arbitràries per a cada panell.

la regió amida II (vegeu la figura 4.10). Així, tenim un bescanvi H/D elevat pel complex binari Na^+/MelB , intermedi pels complexos H^+/MelB i $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ i baix pel complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{MelB}$. Encara més per les estructures en làmina β , l'addició del sucre melibiosa al complex H^+/MelB dóna lloc a un 32% menys de bescanvi comparat amb el complex H^+/MelB . Les estructures hèlixs α més no ordenada (figura 4.14, *pannell mig*) mesurades a 1660 cm^{-1} , tenen un patró de canvi similar a les estructures làmina β però de forma molt menys intensa. L'addició de melibiosa al complex H^+/MelB també fa disminuir l'accessibilitat de les estructures hèlixs α més

no ordenada en un 13% comparat amb la MelB sense substrats ($H^+/MelB$). En el cas dels girs reversos (figura 4.14, *pannell inferior*), l'addició del catió, o del sucre o d'ambdós alhora, no produeixen canvis a nivell de quantitat de bescanvi en cap dels casos; només són visibles algunes petites variacions durant els primers 250 minuts de la cinètica. Aquests resultats a nivell d'estructura secundària indiquen clarament que la unió del sucre protegeix principalment les estructures làmina β i menys intensament a les hèlixs α més estructures no ordenades. De totes maneres, no podem determinar la quantitat d'estructura protegida pel sucre i per tant, és difícil saber quina estructura a nivell quantitatiu és la més protegida de les dues.

De la mateixa manera que amb la banda amida II, per tal d'aprofundir més en les diferències de la cinètica de bescanvi (diferents temps i quantitat de cada component) en diferents condicions de substrats, es va procedir a l'anàlisi de cada una de les seves cinètiques de bescanvi H/D aplicant la transformada inversa de Laplace, lleugerament diferent de l'aplicada a l'amida II (vegeu materials i mètodes). Abans però, donat que el procés d'obtenció i anàlisi de dades implica diferents passos, es va realitzar un anàlisi acurat dels errors produïts en l'adquisició de les dades, dels produïts en l'anàlisi i els deguts a la repetició dels espectres entre diferents mostres. En primer lloc, es va establir l'interval de confiança per simulacions de Montecarlo ($n=20$; es va utilitzar el soroll obtingut de la diferència entre les dades experimentals i les dades del seu ajust per a les simulacions), ja que d'aquesta manera es va obtenir la incertesa en les constants de temps causades pel soroll experimental. Les simulacions de Montecarlo utilitzen un mostratge estadístic per ajustar solucions tenint en compte la presència de soroll en les dades experimentals. La solució obtinguda serà la més probable estadísticament. En segon lloc, es van estimar els errors sistemàtics comparant les constants de temps de dos o tres experiments diferents. Es va prendre el valor més alt de les dues fonts d'error com a error total. Com a conclusió d'aquest anàlisi, només les primeres components cinètiques de la distribució de funcions de la regió amida I (amb constants de temps per sota ~ 30 min) van mostrar diferències més altes que l'error produït, i per aquesta raó són les úniques que es consideraren a l'hora d'analitzar els resultats.

La figura 4.15 mostra les típiques distribucions de poblacions del bescanvi H/D obtingut de les diferents condicions de substrats de cada una de les estructures

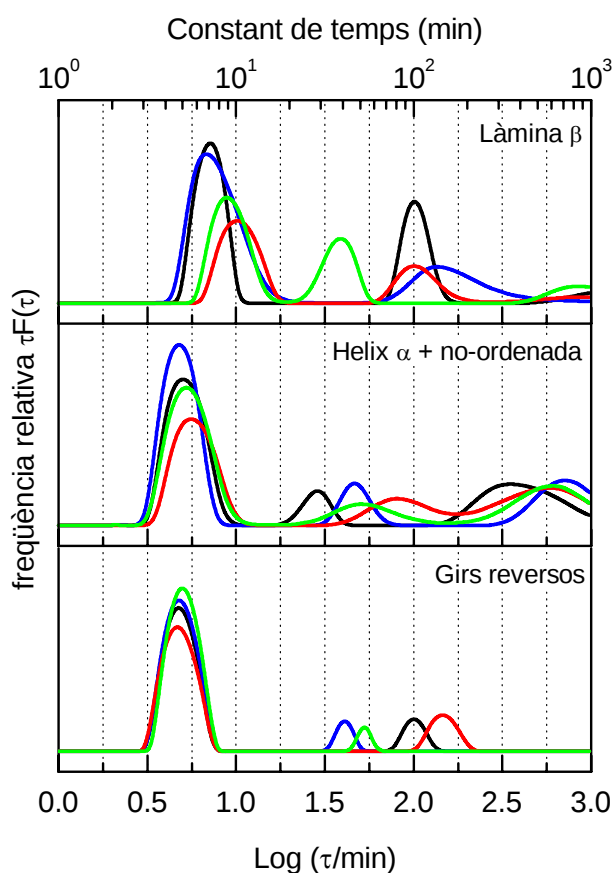


Figura 4.15. Distribució de funcions dels components d'estructura secundària de la MelB en diferents condicions de substrats obtingudes mitjançant la transformada inversa de Laplace de les cinètiques de bescanvi H/D de l'amida I. Els colors corresponen a: (*negre*) sense incubació de substrats, (*blau*) després de la incubació amb NaCl 10 mM, (*vermell*) després d'afegir melibiosa 5 mM i (*verd*) després d'afegir

secundàries. Referint-nos només a la component cinètica ràpida, les diferències més grans, a nivell de constants de temps i mida de la component, degudes a l'addició de substrats s'observen per l'estructura làmina β . Pels complexos binaris $H^+/MelB$ i $Na^+/MelB$ trobem el component ràpid a uns 7 min, per contra aquest mateix component es desplaça fins 8.9 min pel complex ternari $Na^+/mel/MelB$ i a 10.2 min pel $H^+/mel/MelB$. L'addició de melibiosa també comporta una disminució de la quantitat de protons bescanviables, essent el complex ternari incubat amb H^+ el més protegit respecte les altres condicions de substrats. Per contra l'addició de Na^+ ($Na^+/MelB$) és l'estat en què les estructures β són més

accessibles al bescanvi H/D. En el cas de les hèlixs α i estructures no ordenades, les diferències en el component ràpid són més petites a nivell de constants de temps però són més significatives a nivell de quantitat d'aquesta component. Pel complex binari $Na^+/MelB$, la constant de temps es centra a 4.9 min, en canvi per la resta de complexos és situa al voltant de 5.2 min. A més, aquest complex binari $Na^+/MelB$ mostra una quantitat de protons bescanviables una mica més elevat que en la resta de casos, essent el complex ternari $H^+/mel/MelB$ el que menys. Els complexos $H^+/MelB$ i $Na^+/mel/MelB$ mostren una quantitat de protons bescanviables similars,

situant-se en una posició intermèdia. A l'hora d'analitzar els girs reversos, només s'observen petites diferències entre les diferents condicions, situant la constant de temps del component cinètic ràpid aproximadament a 4.7 min en tots els casos. Les diferències entre quantitat de bescanvi en les diferents condicions són massa petites per ser establertes; així doncs podríem dir que els girs reversos es bescanvien tots en la mateixa quantitat.

L'anàlisi del bescanvi H/D a nivell de cada estructura secundària revela diferències que no es poden observar només estudiant la regió amida II. En concret, l'estructura làmina β presenta diferències molt clares depenent del substrat unit, cosa que concorda amb les conclusions obtingudes de l'anàlisi de l'amida II, que ens diu que la incubació de H^+ i melibiosa amb la MelB (H^+ /mel/MelB) representa ser la situació més protegida. Tots i que les diferències són més petites a nivell d'hèlix α i estructures no ordenades, també observem un augment de la protecció envers el bescanvi H/D degut a la unió de la melibiosa. En línies generals, la troballa més significativa és l'efecte protector del sucre melibiosa envers el bescanvi H/D. Tot i que l'aplicació de correccions a les dades experimentals és molt complexa, els errors obtinguts són suficientment baixos per concloure que aquest efecte té lloc principalment a nivell d'estructura làmina β i de forma intermèdia a nivell d'estructura hèlix α i estructures no ordenades, tenint en compte que la proporció d'aquest conjunt d'estructures és majoritari en el transportador.

4. 5. Estudi del bescanvi H/D del mutant R141C per ATR-FTIR

Els resultats de la cinètica de bescanvi H/D a nivell d'amida II i amida I sobre la MelB salvatge exposats anteriorment (capítol 4.4) i d'altres treballs que també utilitzen la cinètica de bescanvi H/D mesurat per ATR-FTIR (de Jongh et al., 1997; de Jongh et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999) demostren la validesa de la tècnica per obtenir informació sobre els canvis conformationals en l'estructura secundària de les proteïnes. Per aquesta raó, es va aplicar la mateixa tècnica d'anàlisi del bescanvi H/D per espectroscòpia ATR-FTIR sobre un mutant de la MelB, el R141C, el qual tot i tenir unes constants d'afinitat per la unió de substrats similars a la proteïna salvatge, no els pot transportar (Abdel Dayem et al., 2003). Aquesta mutació està localitzada al llaç 4-5, que és molt important pel reconeixement del

sucre (Cordat et al., 2000; Ambroise et al., 2000) a més de jugar un paper crucial en la funció *simport* de la MelB (Abdel Dayem et al., 2003).

De manera similar a la MelB salvatge, es va purificar i reconstituir el mutant R141C (vegeu figura 4.1) i aquests proteoliposomes es varen incubar en medis amb diferents substrats, donant quatre complexes diferents, com en el cas de la MelB salvatge: a) un complex binari $H^+/R141C$ en un medi lliure de Na^+ i sucre, b) un complex binari $Na^+/R141C$ en un medi amb NaCl 10 mM lliure de sucre, c) un complex ternari $H^+/mel/R141C$ en un medi amb melibiosa 5 mM lliure de Na^+ i finalment d) un complex ternari $Na^+/mel/R141C$ en un medi amb melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM.

4. 5. 1. La banda d'amida II i la cinètica de bescanvi H/D global del mutant R141C

El procés de deuteració degut a la introducció de N_2 gas saturat amb vapor de D_2O sobre films secs de mutant R141C es va mesurar mitjançant l'enregistrament de la variació del senyal en funció del temps de l'espectre d'ATR-FTIR a la regió $1800-1400\text{ cm}^{-1}$ tal com es descriu anteriorment per a la MelB salvatge en el capítol 4.4 d'aquest treball. Així doncs, primer de tot es van comparar els espectres d'absorció de la banda d'amida I d'ATR-FTIR del mutant R141C i de la MelB salvatge en medi sense Na^+ ni melibiosa (figura 4.17A) abans de començar i al finalitzar el bescanvi. Encara que no s'observen gaires diferències en l'amida I i II entre la proteïna mutant i la salvatge, sí que s'observa una banda

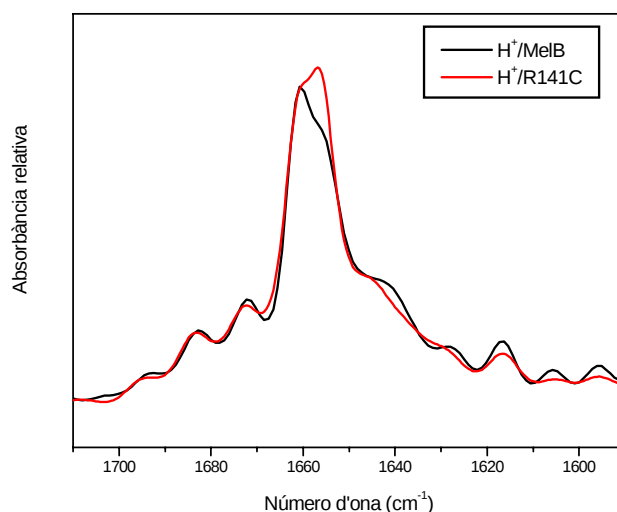


Figura 4.16. Comparació de l'estructura secundària de la MelB salvatge i el mutant R141C sense substrats. Els espectres es van desconvolucionar utilitzant una FWHH de 14 cm^{-1} i una k de 2.5.

1460 cm^{-1} més intensa pel mutant R141C després del bescanvi. Aquesta observació ens suggereix que hi haurà més bescanvi H/D en el cas del mutant. A més, també podem comprovar que no existeixen diferències significatives en la forma de les bandes amida I i amida II de la proteïna mutant i la salvatge. Respecte aquest punt, s'ha de tenir en compte que l'anàlisi de l'estructura secundària del mutant R141C tot i trobar-se algunes diferències en les intensitats de les bandes hèlix α principalment i en menys grau en les làmina β , no es van detectar canvis significatius en la posició

dels seus màxims ni en la seva quantificació (figura 4.16).

Els canvis a nivell d'estructura làmina β serien esperats, si considerem que el llaç 4-5, que conté la mutació a la posició 141, està compost principalment d'aquest tipus d'estructura. Així, es refermaria la predicció d'estructura β del llaç 4-5. Les causes de l'augment d'intensitat de la banda a 1653 cm^{-1} només poden ser especulatives, però suggereixen que existeix algun tipus interacció entre el llaç 4-5 i un grup de hèlixs α en la MelB salvatge, ja sigui en forma de llaç re-entrant o per proximitat de l'hèlix IV i/o V i el llaç 4-5. La figura 4.17B, mostra tres espectres d'absorció seleccionats abans ($t = 0$) i després de començar el procés de deuteració, a $t = 35$ i 770 minuts, del complex binari $\text{H}^+/\text{R141C}$, ja corregit per l'inflament del film i per la

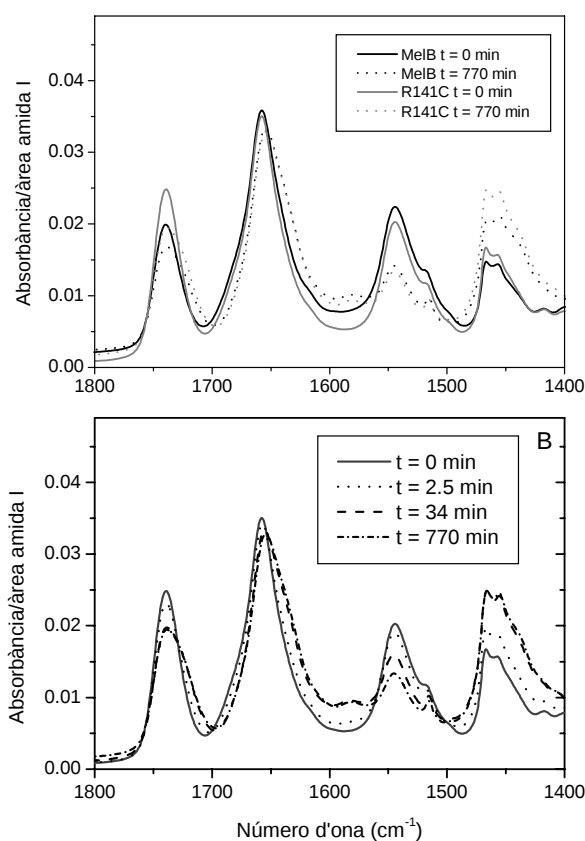


Figura 4.17. (A) Espectres de proteoliposomes de MelB i R141C abans d'iniciar-se i al finalitzar el bescanvi H/D (B) Espectre de proteoliposomes de R141C inicialment en tampó MES 20 mM, KCl 10 mM (pH 6.6) adquirit abans d'iniciar-se el bescanvi H/D a $t = 0$ min i després d'iniciar-se: a $t = 2.5$ min, a $t = 34$ min i a $t = 770$ min. Tots els espectres estan corregits per l'inflament del film mitjançant l'àrea de l'amida I ($1696\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) com a estàndard intern i s'ha restat la contribució d'aigua atmosfèrica.

contribució de l'aigua atmosfèrica (Goormaghtigh et al., 1999). D'acord amb el decreixement de la banda amida II, la qual ens dóna informació sobre el bescanvi global de la proteïna, el $H^+/R141C$ mostra una accessibilitat global del 63%, comparada amb el 53% del complex $H^+/MelB$ de la salvatge (capítol 4.4). Aquest resultat indica que el mutant té una conformació més oberta quan no hi adicionem substrats.

La figura 4.18 representa les dades de les cinètiques de bescanvi H/D del mutant R141C en cada condició de substrat. Els complexos binaris $H^+/R141C$ i $Na^+/R141C$ mostren una accessibilitat molt similar (62-63%), per altra banda, l'addició del sucre melibiosa resulta en un decreixement de l'accessibilitat en un 8% en el cas del complex ternari $H^+/mel/R141C$, i en un decreixement d'un 11 % pel complex $Na^+/mel/R141C$. El patró de canvi d'accessibilitat de les cinètiques de bescanvi H/D del mutant R141C (figura 4.18) sota diferents condicions de substrats és bàsicament igual a l'obtingut per la MelB salvatge (vegeu

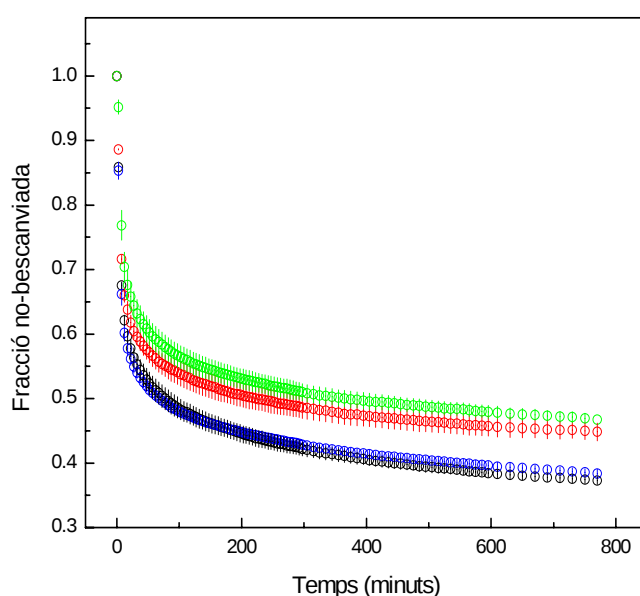


Figura 4.18. Cinètiques de bescanvi H/D de l'amida II del mutant R141C en diferents condicions de substrats. En *negre*, es representa el complex $H^+/R141C$, en *blau*, el complex $Na^+/R141C$, en *vermell* el complex terciari $H^+/mel/R141C$ i en *verd* el $Na^+/mel/r141C$. La barra d'error representa l'error estàndard calculat de $n = 3$ experiments.

figura 4.10), amb la diferència que en el cas de la proteïna mutant el complex terciari $Na^+/mel/R141C$ és l'estat menys bescanviat. Tot i aquesta diferència, els resultats indiquen que la unió de sucre confereix més protecció al bescanvi H/D , deguda a una major compactació de la proteïna, tal com s'ha descrit anteriorment per la MelB salvatge (capítol 4.4).

La resolució de les constants de temps del bescanvi H/D es dóna a través de l'aplicació de la transformada inversa de Laplace, la qual ens dóna una distribució de

poblacions del bescanvi amida II global. La distribució de poblacions es resol en quatre components amb diferents constants de temps i àrees. La figura 4.19 ens mostra les distribucions de poblacions dels quatre complexes del mutant R141C amb

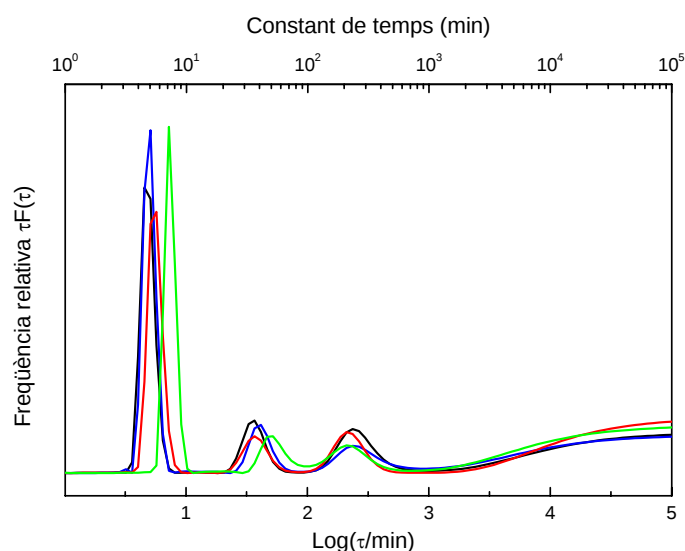


Figura 4.19. Distribució de funcions de l'amida II del mutant R141C en diferents condicions de substrats obtingudes mitjançant la transformació inversa de Laplace de les cinètiques de bescanvi H/D. En *negre* es representa el mutant R141C sense substrats afegits, amb addició de NaCl 10 mM (*blau*), amb addició de melibiososa 5 mM (*vermel*) i amb addició de melibiososa 5

diferents constants de temps i àrees. Els complexes binaris $\text{Na}^+/\text{R141C}$ i $\text{H}^+/\text{R141C}$ mostren la mateixa constant de temps per la component ràpida ($4.9 \text{ min} \pm 0.2$), tot i que l'àrea de bescanvi és més gran pel complex $\text{Na}^+/\text{R141C}$ (figura 4.19 i Taula 4. III). Per altre banda, les constant de temps i l'àrea de la component intermèdia i lenta són molt similars entre ambdós complexes binaris. El

comportament del mutant R141C en presència de Na^+ o H^+ és molt similar al de la MelB en les mateixes condicions. El complex ternari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ mostra la component cinètica ràpida més lenta (al voltant de 7.7 minuts) comparat amb la resta de complexes i el complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ es situaria en una posició intermèdia, al voltant de 5.4 minuts. Les àrees de bescanvi de totes les components cinètiques del complex $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$, són més petites comparades amb la resta de complexes. El complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ també té totes les components cinètiques lleugerament més petites que la proteïna sense el sucre unit, però en una posició intermèdia entre els complexes binaris amb H^+ o Na^+ i el complex ternari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$. En general, la distribució de poblacions sota diferents condicions de substrats pel mutant R141C presenta més diferències entre si que en cas de la MelB salvatge, on les diferències no eren tant grans (vegeu figura 4.12).

Si comparem les dades del bescanvi global del mutant R141C i de la MelB salvatge (taula 4.III) observarem que tots els complexos del mutant mostren més bescanvi H/D que la MelB salvatge. L'augment en l'accessibilitat al bescanvi H/D ve donada per una disminució del grau de compactació de la seva estructura (figura 4.20). Aquest augment del bescanvi H/D del mutant que és de l'ordre del 10%,

excepte pel complex $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ que és aproximadament del 5%, es deu principalment a l'augment en l'accessibilitat de la població d'hidrògens de la component ràpida. Cal tenir en compte, que la diferència de bescanvi global entre $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ i $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ coincideix aproximadament amb la diferència de bescanvi de la població d'hidrògens de la component ràpida, que és

del 5%. Aquestes dades comparatives ens indiquen que quan el sucre s'uneix al mutant en presència del catió Na^+ , aquesta disposició no és gaire més oberta o accessible respecte la MelB salvatge, com sí que passa en el cas dels altres complexos. És a dir, en presència de sucre i Na^+ l'absència de la càrrega positiva en la posició 141 en el mutant R141C no afecta tant a nivell d'accessibilitat com en la resta de complexos. En general però, si considerem les dades obtingudes de l'àrea i les constants de temps de la component cinètica ràpida, podem afirmar que la eliminació de la càrrega positiva a la posició 141 resulta en una conformació més oberta de la proteïna sense afectar l'estructura secundària en gran mesura.

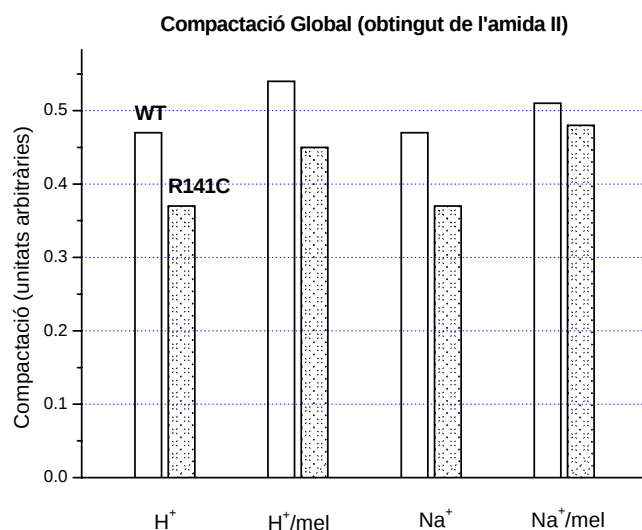


Figura 4.20. Representació gràfica del nivell de compactació del mutant R141C en diferents condicions de substrats. Les dades s'han extret de l'àrea de l'amida II de cada complex de proteïna salvatge i mutant.

Taula 4.III. Comparació dels components bescanviats obtinguts del seguiment de la banda amida II durant la cinètica de bescanvi H/D de la MeIB salvatge i del mutant R141C en diferents condicions de substrats.

Components All	H ⁺		Na ⁺		H ⁺ /melibiosa		Na ⁺ /melibiosa	
	R141C	MeIB	R141C	MeIB	R141C	MeIB	R141C	MeIB
Ràpida	Constant de temps (min)	4.9 ± 0.2 ^a	5.6 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.3	6.1 ± 0.2	7.7 ± 0.5
	Àrea (%)	37.4 ± 0.3	26.7 ± 0.9	39.8 ± 0.7	29.4 ± 0.6	35.1 ± 0.8	25.0 ± 1.0	33.6 ± 2.3
Intermèdia	Constant de temps(min)	37 ± 3	34 ± 2	41 ± 3	35 ± 2	37 ± 4	38 ± 3	52 ± 1
	Àrea (%)	10.4 ± 0.7	10.4 ± 0.4	9.8 ± 0.5	8.9 ± 1.2	7.7 ± 1.6	9.1 ± 0.6	7.9 ± 0.7
Lenta	Constant de temps (min)	237 ± 20	240 ± 20	256 ± 10	220 ± 20	199 ± 12	220 ± 20	223 ± 13
	Àrea (%)	12.6 ± 1.6	15.5 ± 0.4	10.5 ± 0.5	14.3 ± 0.8	11.3 ± 0.4	9.6 ± 0.5	9.8 ± 0.9
No bescanviable	Constant de temps (min)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Àrea (%)	39.2 ± 1.3	47.4 ± 0.9	39.9 ± 0.7	47.5 ± 2.0	46.0 ± 2.0	56.2 ± 1.1	48.8 ± 0.8

^a Tots els errors es refereixen als errors estàndards obtinguts de mostres independents en les mateixes condicions per n = 3 experiments.

Una possible explicació d'aquests resultats, seria que l'efecte de la mutació fa que es desenganxi una interacció electrostàtica amb la mediació de l'Arg141 del llaç 4-5 amb un altre llaç, possiblement el llaç 10-11 (vegeu capítol 4.4). Això produiria diferències importants en l'accessibilitat dels llaços del mutant R141C en diferents condicions de substrats, cosa que no s'observa amb la MelB salvatge. Aquesta hipòtesi la podem confirmar mitjançant l'anàlisi del bescanvi H/D de l'estructura secundària en diferents condicions de substrats.

Encara que les diferències més intenses es donen en la població ràpida, caldria destacar l'existència d'una disminució de l'accessibilitat de la component lenta dels complexos $\text{Na}^+/\text{R141C}$, $\text{H}^+/\text{R141C}$ i $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ en contrast amb els mateixos complexos de la MelB salvatge. Per contra, quan s'addiciona melibiosa (complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{R141C}$), la component lenta es torna lleugerament més accessible al deuterons, i més ràpida. De manera similar a la ja descrita per la MelB salvatge, quan el mutant R141C està incubat amb Na^+ o H^+ mostren la mateixa quantitat de bescanvi, i l'addició de sucre resulta en un augment de la protecció envers el

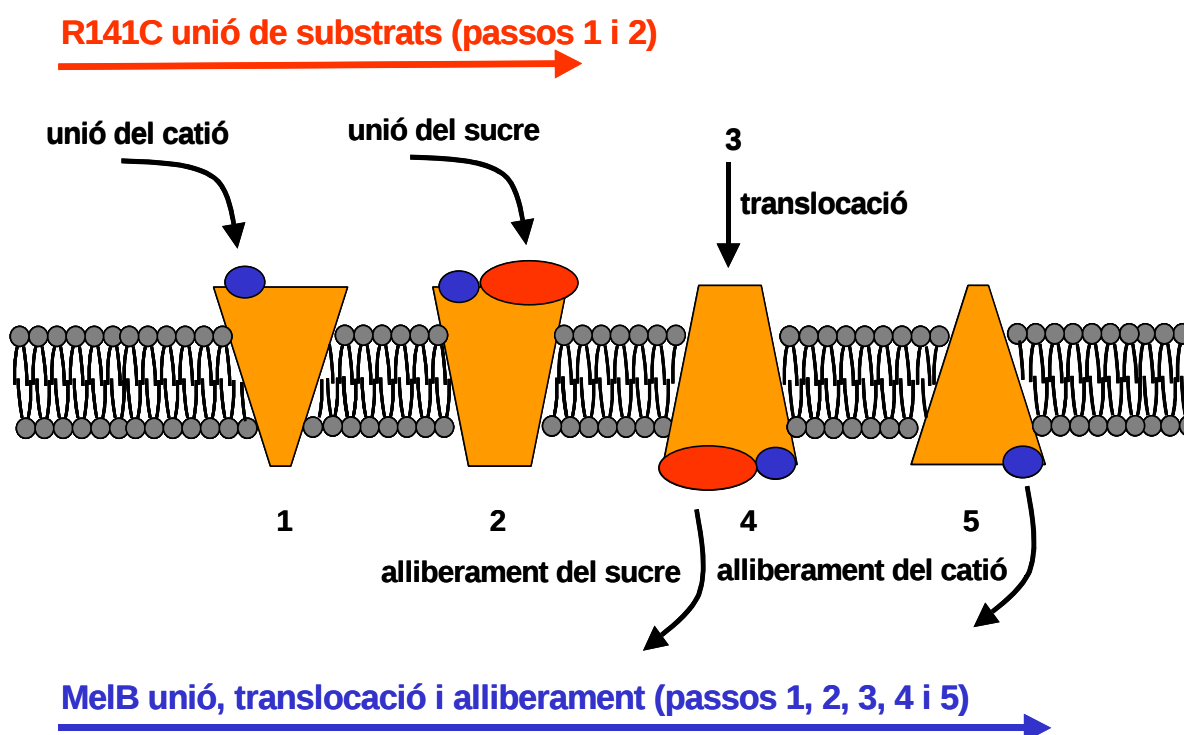


Figura 4.21. Representació comparativa dels estats d'unió i transport de la MelB salvatge i el mutant R141C.

bescanvi H/D. Així, quan incubem el $H^+/R141C$ amb melibiosa, la proteïna augmenta la seva compactació en un 7% aproximadament, i per la salvatge l'increment és molt similar (8%). Pel complex $Na^+/R141C$, l'increment de la compactació degut a la incubació amb melibiosa és de l'ordre de l'11%, mentre per la proteïna salvatge és només d'un 4% (figura 4.20). Aquesta diferència de comportament converteix el complex $Na^+/mel/R141C$ en l'estat més protegit, per contra l'estat més protegit de la MelB salvatge és el complex $H^+/mel/MelB$. A part de les diferències estructurals intrínseques causades per la mutació, una possible explicació d'aquest comportament diferent, és que la MelB salvatge uneix i transporta els substrats, oberta cap a l'exterior i cap a l'interior, en canvi el mutant R141C només és capaç d'unir-los. Per tant, sota les condicions experimentals en les quals estan adquirides les dades d'infraroig, el R141C estarà present en una mescla de menys estats comparats amb la MelB salvatge (figura 4.21).

4. 5. 2. La banda amida I i el bescanvi H/D a nivell d'estructura secundària del mutant R141C

L'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D a nivell d'amida I ens dona informació sobre l'accessibilitat dels diferents components d'estructura secundària (girs reversos, hèlixs α o làmina β) al solvent aquós tal i com s'ha descrit a l'apartat 4.4 per la MelB salvatge (de Jongh et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999). La determinació del números d'ona representatius de cada estructura secundària del mutant R141C es va dur a terme de la mateixa manera que per la MelB salvatge (vegeu capítol 4.4), i va donar els mateixos números d'ona, amb les mateixes característiques d'una bona intensitat de senyal, lluny dels punts isobèstics i amb una mínima contribució d'altres components d'estructura secundària (figura 4.22). Aquest fet, recolza la idea que si l'estructura secundària del mutant R141C fos significativament diferent de la MelB salvatge, molt possiblement observariem diferències en la posició de les intensitats seleccionades per representar cada component d'estructura secundària. La figura 4.23 exposa les cinètiques de bescanvi H/D per a cada estructura secundària en diferents condicions de substrats del mutant R141C. Els girs reversos mesurats a 1678 cm^{-1} del complex ternari $Na^+/mel/R141C$ són els menys bescanviats i per contra el complex $H^+/mel/R141C$ és

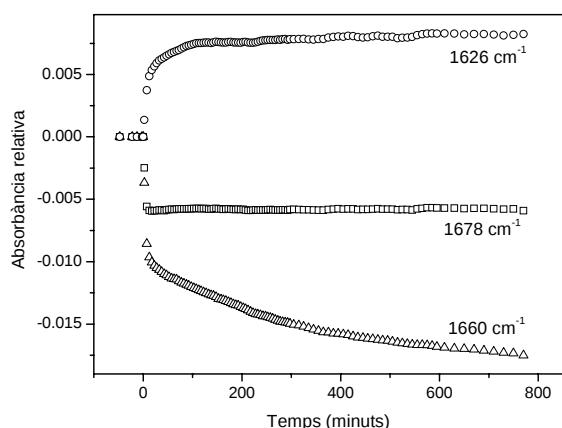


Figura 4.22. Anàlisi de la cinètica de bescanvi de l'amida I del complex binari $H^+/R141C$. Canvis d'intensitat dels espectres de diferència desconvulats durant el bescanvi H/D. Tots les intensitats es van desconvular i restar pel primer espectre no bescanviat. Les intensitats es van adquirir restant la línia base a 1860 cm^{-1} , prèviament.

el més accessible. Els complexes binaris $H^+/R141C$ i $Na^+/R141C$ mostren una accessibilitat similar i situats en una posició intermèdia respecte els complexes ternaris. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts pels girs reversos de la MelB salvatge, on no es van trobar diferències en la quantitat de bescanvi H/D entre diferents condicions de substrats. A més, el mutant R141C mostra una cinètica més ràpida que la de la MelB salvatge, de tal manera que als 30 minuts ja està completada. Aquest fet indica que quasi tots els girs

reversos accessibles es bescanvien dins d'aquest període de temps. Les hèlixs α més estructures no ordenades, mesurades a 1660 cm^{-1} , mostren un ordre d'accessibilitat igual als girs reversos, amb la particularitat que el complex ternari $H^+/R141C$ està molt més bescanviat respecte a la resta de complexes. Aquest resultat es torna a contraposar amb l'obtingut per la MelB salvatge, on les diferències entre substrats eren molt més petites, a més de ser el complex $H^+/Mel/MelB$ el més protegit envers el bescanvi H/D. Per altre banda, el patró de bescanvi H/D a nivell d'estructures làmina β mesurades a 1626 cm^{-1} , mostra el complex $H^+/mel/R141C$ com l'estat menys accessible, seguit del $Na^+/mel/R141C$ i del $Na^+/R141C$, essent el $H^+/R141C$ el més accessible de tots. Aquest patró és molt similar a l'obtingut per la MelB salvatge, tot i que les diferències són més intenses i que el complex $H^+/R141C$ és el més bescanviat en contraposició a la MelB salvatge que era el complex $Na^+/MelB$ el més bescanviat. El conjunt de totes les dades, indica que la unió de sucre en presència de Na^+ o H^+ és molt diferent estructuralment parlant.

Per tal d'obtenir la distribució de funcions de la cinètica de bescanvi H/D de cada una de les components de l'estructura secundària, es va aplicar la

transformada inversa de Laplace amb alguna variació (vegeu mètodes

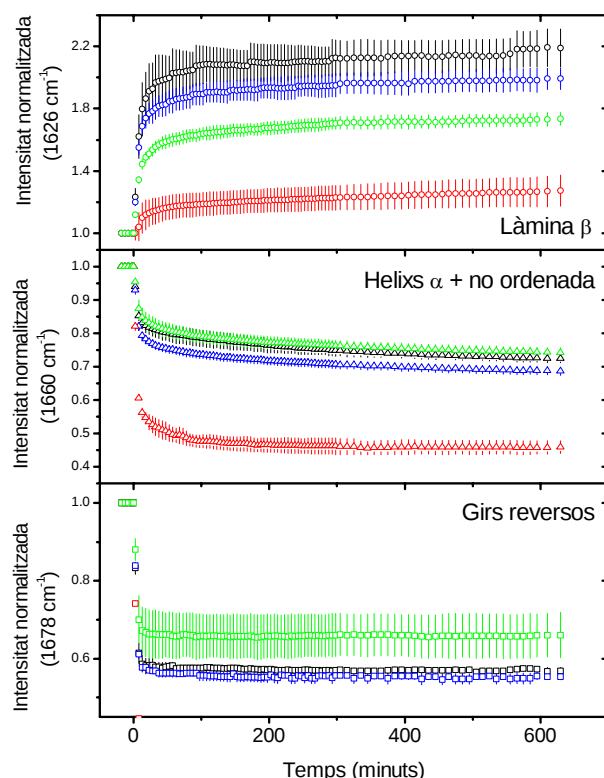


Figura 4.23. Cinètiques de bescanvi H/D del components d'estructura secundària del mutant R141C en diferents condicions de substrats. Els colors corresponen: (*negre*) al R141C sense substrats incubats, (*blau*) després de la incubació amb NaCl 10 mM, (*vermell*) després d'afegir melibiosa 5 mM i (*verd*) després d'afegir melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM. L'escala vertical s'ha ajustat a unitats arbitràries per a cada pannel.

experimentals) a les bandes amida I. Tal i com es pot observar a la figura 4.24 (*pannell inferior*) els girs reversos presenten una component cinètica ràpida centrada

al voltant dels 4.0 minuts per cada condició de substrat però amb diferents contribucions d'àrees. Aquest resultat contrasta amb l'obtingut per la MelB salvatge on totes les contribucions d'àrees eren molt similars entre diferents condicions de substrats i a més es centraven al voltant de 4.7 min. Les hèlixs α més estructures no ordenades (*pannell mig*) mostren una component cinètica ràpida centrada cap a 5 min, per les quatre condicions de

substrats, resultat homòleg a l'obtingut per la proteïna salvatge. Tot i així, el complex ternari H^+ /mel/R141C té una contribució d'àrea molt més alta que en les altres tres condicions de substrats, i en canvi aquesta mateixa condició és la més petita en el cas de la proteïna salvatge. Les estructures làmina β (*pannell superior*) són les components estructurals de la proteïna on les diferències entre diferents condicions de substrats són més importants, tal com passava per la MelB salvatge. El complex H^+ /mel/R141C té la component cinètica ràpida situada a 13.5 min comparada amb els 10.2 min per la proteïna salvatge. A més, la contribució d'àrea en el cas del

mutant R141C és més petita que per la MelB salvatge. L'altre complex ternari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ també té la constant de temps de la component cinètica ràpida lleugerament desplaçada i menys contribució d'àrea comparada amb els complexes binaris. Els complexes binaris presenten una constant de temps de la component cinètica ràpida iguals (a 5.4 min) però la contribució d'àrea és lleugerament més gran pel complex $\text{H}^+/\text{R141C}$.

En general, l'anàlisi de cada estructura secundària basat en el seguiment de la banda amida I del mutant R141C dóna diferències més intenses en accessibilitat entre diferents condicions de substrats que en el de la MelB salvatge. La cinètica de bescanvi H/D (figura 4.23) i la transformada inversa de Laplace (figura 4.24) dels girs reversos sota diferents condicions de substrats mostren que la unió de melibiosa en presència de Na^+ resulta en una mena de girs reversos més estructurats i per contra, la unió de melibiosa en presència de H^+ dóna uns girs reversos manifestament menys estructurats. Això podria indicar que el mutant R141C que només uneix substrats però no els transporta (figura 4.21), adopta conformacions diferents almenys a nivell de girs reversos quan té la melibiosa unida i el catió co-transportador és el Na^+ o el H^+ . Quan observem el mutant amb el Na^+ o

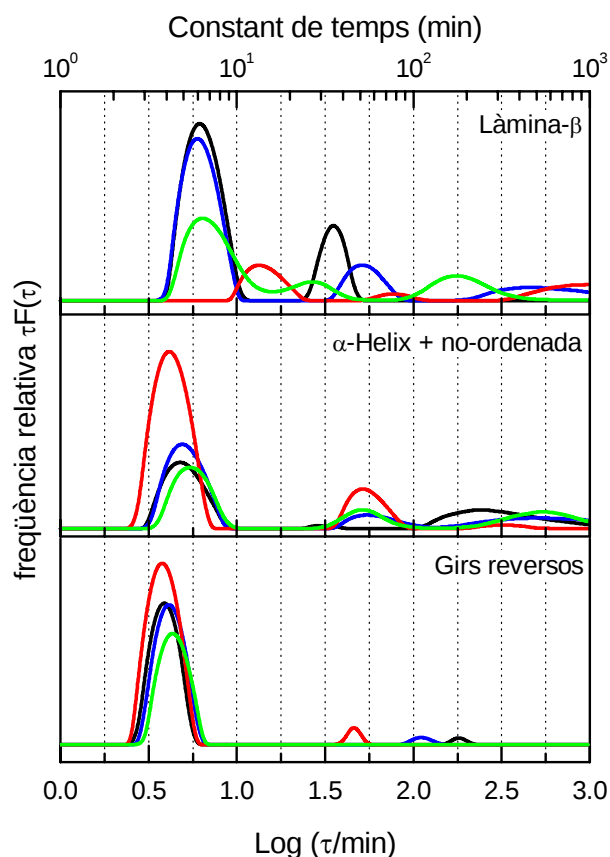


Figura 4.24. Distribució de funcions dels components d'estructura secundària del mutant R141C en diferents condicions de substrats obtingudes mitjançant la transformada inversa de Laplace de les cinètiques de bescanvi H/D de l'amida I. Els colors corresponen a: (*negre*) sense incubació de substrats, (*blau*) després de la incubació amb NaCl 10 mM, (*vermell*) després d'afegir melibiosa 5 mM i (*verd*) després d'afegir melibiosa 5 mM i NaCl 10 mM.

el H^+ no trobem diferències entre ells, indicant que la addició del sucre és el pas crucial per obtenir un efecte remarcable en l'increment de la compactabilitat. Aquestes diferències en l'addició de substrats no es van trobar per la MelB salvatge (figura 4.14), on els girs reversos es bescanvien tots en la mateixa quantitat tot i que existien algunes petites diferències en la forma de la cinètica durant els primers 200 minuts. Per tant, l'absència d'una càrrega positiva en la posició 141 magnificaria l'efecte conformational induït per la melibiosa, tot i que l'efecte particular (increment o decreixement de la compactabilitat) possiblement és diferent comparat amb la proteïna salvatge.

Les estructures hèlixs α més estructures no ordenades segueix un patró molt similar al dels girs reversos. De la mateixa manera doncs, la incubació de $H^+/R141C$ amb melibiosa resulta en un clar decreixement de la compactabilitat, i per contra en presència de Na^+ , la incubació amb melibiosa dóna un canvi molt petit. En el cas de la MelB salvatge, les diferències d'accessibilitat són més petites i a més, l'estat clarament més protegit envers el bescanvi H/D és el complex ternari $H^+/mel/R141C$ (capítol 4.4). Podria ser possible que la major afinitat del sucre per la MelB en presència de Na^+ , resultés en un augment de la compactabilitat de les hèlixs α . Fet que no es pot observar en el cas de la MelB salvatge perquè estem mesurant la mitja de diferents estats de transport i per tant, els efectes poden quedar emmascarats.

En les estructures làmina β també s'observen diferències importants en diferents condicions de substrats, amb un patró molt similar a la MelB salvatge. Aquests resultants reiteren l'observació anteriorment trobada per la proteïna salvatge, que el sucre s'uneix a les estructures làmina β i que aquestes estructures estan molt possiblement localitzades als llaços 4-5 i 10-11 (capítol 4.4).

La comparació entre l'accessibilitat global i la de cada estructura secundària, en diferents condicions de substrats mostren un patró diferent per ambdós proteïnes. Per la MelB salvatge, la compactabilitat global és la mateixa (o molt similar) tant si està en presència de H^+ com de Na^+ , i la incubació addicional de melibiosa resulta en un increment de la compactabilitat de la proteïna. Aquest comportament es reflexa en l'anàlisi de les estructures secundàries, on la incubació amb melibiosa no dóna quasi cap canvi a nivell de girs reversos, però sí que incrementa la

compactabilitat a nivell d'estructures hèlixs α més estructures no ordenades i encara en més alt grau a nivell d'estructures làmina β . Pel mutant R141C, aquest comportament és més complex d'interpretar. Els canvis en la compactabilitat global també mostren un increment degut a la unió de melibiosa (figura 4.21), però les estructures individuals canvien de forma diferent. Mentre que totes tres estructures secundàries incrementen la seva compactabilitat en presència de melibiosa i Na^+ , en presència de melibiosa i H^+ també incrementa la compactabilitat a nivell d'estructures làmina β però produeix un decreixement de la compactabilitat pels girs reversos i per les hèlixs i estructures no ordenades.

Ja que no sabem el nivell del 100% d'accessibilitat per les estructures secundàries, els canvis observats a l'amida I són tots relatius, i per aquesta raó no podem establir comparacions quantitatives amb les de l'amida II, o entre ells. Per tant, l'increment de la compactabilitat global del mutant R141C quan està incubat amb sucre i H^+ , s'ha d'interpretar com a provinent principalment de l'increment en la compactabilitat de les estructures làmina β . Així, el decreixement en la compactabilitat dels girs reversos i les hèlixs α més estructures no ordenades pel mutant R141C, ha de ser menys significatiu que l'increment en les làmina β . D'aquesta manera es pot explicar el diferent nivell de compactabilitat global pel $\text{H}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ i el $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$ comparat amb $\text{H}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ i el $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ (figura 4.21).

4. 6. Estudi de l'orientació de la MelB salvatge i el mutant R141C per ATR-FTIR

En aquesta secció s'ha estudiat l'orientació de l'estructura de la MelB salvatge utilitzant la tècnica de polarització de la reflexió total atenuada de la llum infraroja amb transformada de Fourier (ATR-FTIR) (Axelsen et al., 1995; le Coutre et al., 1997; Lafrance et al., 1997; Bechinger et al., 1999; Grimard et al., 2001; Ding et al., 2001). La possibilitat de que els canvis conformationals produïts per l'addició de substrats, també desemboquin en canvis en l'angle d'orientació de les estructures secundàries de la proteïna és una qüestió molt interessant a estudiar. Els experiments de polarització es van realitzar sobre films secs de proteoliposomes preparats sobre un cristall de germani (Ge). L'obtenció de films orientats es va dur a

terme secant amb N_2 gas els proteoliposomes o lípids sols, estesos sobre el cristall de Ge. L'anàlisi de l'orientació dels films de lípids sols també és molt important perquè els resultats sobre l'orientació de la proteïna estan directament vinculats amb la correcta orientació del film sobre el cristall d'ATR (Tamm and Tatulian, 1993). Així, es van estudiar els mateixos complexos de MelB salvatge i de mutant R141C que es van utilitzar per a la tècnica de bescanvi H/D i d'estructura secundària, ja que són les condicions on s'han demostrat evidències de canvis conformacionals de la proteïna per la unió de substrats (Mus-Veteau et al., 1995).

4. 6. 1. *Determinació de l'orientació de la membrana*

Abans de determinar l'orientació de la proteïna dins la membrana, hem de conèixer si aquesta membrana s'orienta bé sobre el cristall de Ge. Si no fos així, no podríem assegurar que la proteïna està orientada respecte a la membrana i la detecció de canvis en l'orientació deguts a la unió de substrats seria molt difícil de determinar. Dit matemàticament, per tal d'obtenir informació sobre l'orientació de l'estructura molecular respecte la normal de la bicapa lipídica, o sigui el paràmetre d'ordre p_β , hem de dividir p_ϕ/p_α entre la p_γ , on p_γ és el paràmetre d'ordre de la dispersió d'orientacions de la bicapa lipídica (vegeu materials i mètodes i figura 2.9). Si p_γ és 1, no es necessita fer cap correcció perquè estem en la situació òptima; si per contra $p_\gamma = 0$, aleshores no és possible obtenir l'orientació del film de l'experiment. Per estimar el valor de p_γ , es van utilitzar films secs de DMPC (1-miristoil-2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidicolina) i es van estendre sobre el cristall de Ge. Per a qualsevol fosfolípid saturat en estat cristal·lí, el paràmetre d'ordre de l'estirament i la vibració de tisoires del grup CH_2 , respecte l'eix de les cadenes lipídiques és de $p_\alpha = -0.5$ i per tant, la oscil·lació de la banda té un paràmetre d'ordre $p_\alpha = 1$. El paràmetre d'ordre de la cadena lipídica del DMPC en fase cristal·lina respecte la normal de la membrana és $p_\beta=0.93$ (Hübner and Mantsch, 1991). Amb aquesta dada i degut al fet que podem obtenir experimentalment lípids de DMPC en fase pseudocristal·lina, la qual correspon a un film sec de DMPC, podem obtenir una estimació de com s'orienta el fosfolípid dins el film sec sobre el cristall de Ge. En la figura 4.25A es pot observar els espectres d'orientació paral·lela i perpendicular d'un film sec de DMPC, dels quals s'ha calculat un p_γ de 0.79, 0.78 i 0.73 corresponents a

les vibracions d'estirament, de tisores i d'oscil·lació, respectivament. Per tant, dins les nostres condicions experimentals, podem aconseguir films altament orientats només assecant la mostra estesa sobre el cristall de Ge, amb un p_γ de 0.77 aproximadament.

També es varen realitzar experiments d'orientació de films secs de lípids d'*E.coli* purs (figura 4.25B), assumint que el valor de p_γ és el mateix que pel lípid

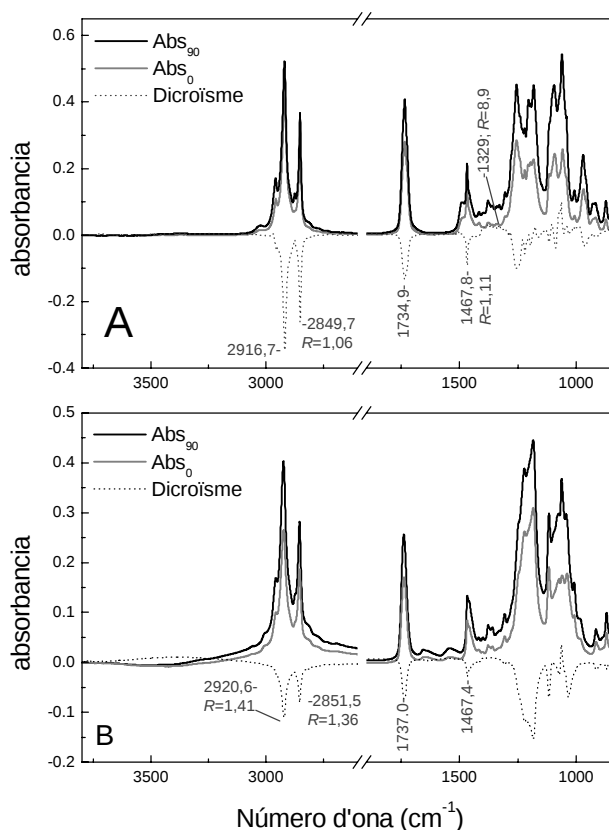


Figura 4.25. (A) Espectres amb llum polaritzada $\parallel$, $\perp$ i de dicroïsme d'un film de lípids de DMPC. (B) Espectres de polarització $\parallel$, $\perp$ i de dicroïsme d'un film de lípids d'*E.coli*.

DMPC. D'aquesta manera, els càlculs donaren uns valor de p_ϕ/p_α de -0.33, -0.27 i -0.26 corresponents a les vibracions d'estirament asimètric del CH_2 (3000-2900 cm^{-1}), d'estirament simètric del CH_2 (2800-2700 cm^{-1}) i de l'estirament del $\text{C}=\text{O}$ (1800-1700 cm^{-1}), respectivament. Aquests valors en l'orientació del lípid no van variar en presència de cap dels substrats de la MeIB. Per exemple, la incubació de Na^+ en lípids d'*E.coli* purs, va donar uns valors de p_ϕ/p_α de -0.32, -0.27 i -0.24 per a cada vibració (figura 4.25B). Cal tenir en compte que, si aquests valors varien significativament entre experiments és perquè

membrana no s'ha orientat bé o s'ha orientat diferent sobre el cristall de Ge i per tant, l'experiment no és vàlid (Tamm and Tatulian, 1993). En el nostre cas, tots els films varen donar la mateixa orientació independentment de la presència dels diferents substrats i la proteïna.

4. 6. 2. Espectres de dicroïsme de la MelB salvatge

Els espectres de dicroïsme dels proteoliposomes de MelB, obtinguts de la resta de l'espectre de la MelB amb la llum polaritzada paral·lelament menys l'espectre de la MelB amb llum polaritzada perpendicularment, ens donen informació sobre l'existència de vibracions amb orientació (vegeu materials i mètodes). Encara més, les estructures vibracionals que no estiguin orientades no apareixeran en l'espectre de dicroïsme.

4. 6. 2. 1. Anàlisi dels espectres de dicroïsme de la MelB salvatge en H₂O

La figura 4.26A mostra els espectres d'absorció d'un film sec de MelB sense

substrats addicionats (és a dir, H⁺/MelB) reconstituïda en lípids d'*E.coli* amb la llum polaritzada paral·lelament (II) i perpendicularment ($\perp$). Fent la subtracció entre l'àrea de la banda de l'espectre II i del $\perp$, obtenim l'espectre dicroic del qual obtenim informació sobre l'orientació de diverses estructures moleculars. El factor de resta utilitzat per l'obtenció de l'espectre dicroic va ser igual a 1.93 (vegeu materials i mètodes), ja que és el valor en les nostres condicions experimentals on les estructures sense orientació s'anul·len i per tant, només apareixen bandes d'estructures orientades. La figura 4.26B

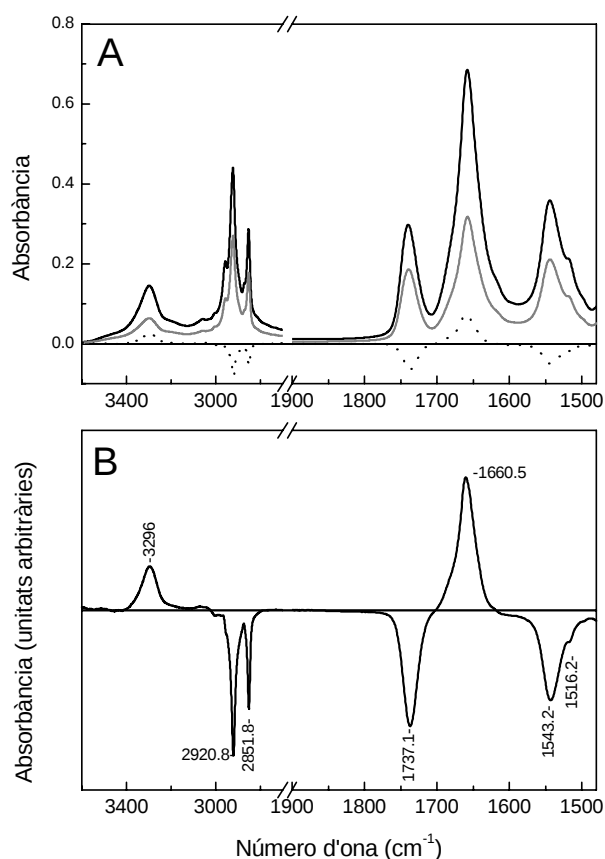


Figura 4.26. (A) Espectres de polarització II (negre) i $\perp$ (gris) de proteoliposomes de MelB sense substrats en tampó amb H₂O i el seu espectre de dicroïsme (negre puntejat). (B) Espectre de dicroïsme del pannel A ampliat.

mostra l'espectre dicroic ampliat, i les bandes que apareixen són les corresponents a

les vibracions amb orientació. La informació que obtenim de l'espectre dicroic és diversa: el signe de les bandes de lípid amb intensitats a 2921, 2852 i 1737 cm^{-1} ens donen informació sobre la correcta orientació d'aquest en el film. Les intensitats de les bandes amida A (3296 cm^{-1}), amida I (1660 cm^{-1}) i amida II (1543 cm^{-1}), que també apareixen a l'espectre de dicroïsme ens indiquen clarament que existeix estructura helicoidal orientada al llarg de la normal de la membrana (Susi and Byler, 1986; Surewicz and Mantsch, 1988). Per altre banda, que l'amida I i l'amida II tinguin signes contraris en l'espectre dicroic és correcte, ja que la vibració majoritària corresponent a l'amida I és deguda principalment a l'estirament de l'enllaç C=O i per l'amida II és deguda majoritàriament a l'enllaç N-H, i aquestes vibracions són perpendiculars entre sí. Per aquesta raó, apareixeran de signe contrari en l'espectre dicroic (figura 4.26B). Dins la banda amida II, a més de la intensitat a 1543 cm^{-1} indicadora d'estructures hèlixs α orientades, també s'observa una espatlla corresponent a les tirosines a 1516 cm^{-1} , indicant que almenys algunes d'elles estan orientades. Aquest fet no és estrany, si tenim en compte que 15 de les 27 tirosines de la MelB, estan situades als segments transmembrana (Pourcher et al., 1996). De la mateixa manera, també apareix una banda a 1497 cm^{-1} en l'espectre dicroic deguda a l'existència de fenilalanines orientades (no mostrat). En general, les dues bandes d'aminoàcids i les intensitats de les bandes amida I amida II de l'espectre dicroic, assignen orientació principalment helicoidal de la proteïna, per tant, indica que almenys una part de les hèlixs α transmembrana de la MelB estan orientades. L'existència d'orientació de part o totes les hèlixs α no és un resultat sorprenent, ja que un estudi recent que analitza cristalls bidimensionals de MelB per difracció de raigs-X, troba que existeix un grup de 7 hèlixs α transmembrana amb certa orientació respecte la normal de la membrana (Hacksell et al., 2002).

Tal com s'ha anat demostrant en diversos estudis espectroscòpics de fluorescència (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau and Leblanc, 1996; Cordat et al., 1998; Cordat et al., 2000) i de FTIR (capítol 4.3), existeixen evidències importants sobre l'existència de canvis conformacionals de la MelB per l'addició de substrats. Per aquesta raó, l'estudi de l'orientació de la MelB ens ofereix la possibilitat de saber si la unió de substrats modula l'orientació de l'estructura secundària, i si és així com la modula.

Així, tal com es descriu a procediments experimentals, calcularem la R^{ATR} (raó dicroica) de les bandes que sabem que presenten orientació perquè apareixen a l'espectre dicroic, mitjançant la raó de l'àrea de la banda amb llum polaritzada paral·lelament entre l'àrea de la banda polaritzada perpendicularment. A la pràctica però, ens trobarem amb problemes de reproductibilitat durant la realització dels experiments. Per exemple, es va obtenir un valor de $p_\phi = 0.092 \pm 0.016$ ($n=3$ experiments) per l'amida I i un $p_\phi = -0.193 \pm 0.020$ ($n=3$) per l'estirament asimètric del CH_2 de la MelB. Tot i que les variacions semblen molt petites, la precisió (és la raó entre el valor de p_ϕ i l'error Standard) del valor de p_ϕ de l'amida I és de 5,75. Aquest valor és inferior a 6 i segons els resultats dels experiments per valors de precisió inferiors a 6, es limita la detecció de les variacions d'orientacions degudes als efectes dels substrats. Per tant, si obtenim variacions de p_ϕ entre diferents experiments de la MelB en les mateixes condicions, aquestes podrien ser causades per les petites variacions en l'orientació del film sobre el cristall de Ge (p_γ). És concebible que els films de proteoliposomes no mostrin exactament la mateixa orientació, degut a la pròpia variació de la posta apunt experimental per a cada experiment. Encara que és una variació molt petita, s'ha de corregir per tal d'observar petites diferències en l'angle d'orientació. Per tal de realitzar aquesta correcció es va determinar el valor de p_γ mitjançant el valor de p_ϕ de l'estirament asimètric del CH_2 , $p_\gamma = p_\phi / (-0.274)^{(1)}$, assumint que les bandes de lípid d'*E.coli* mostren el mateix paràmetre d'ordre del lípid pur en fase líquida (vegeu materials i mètodes). Els resultats d'aquests càlculs, donaren un valor de $p_\gamma = 0.69 \pm 0.09$ pels films de proteoliposomes, indicant que la presència de proteïna redueix l'ordre del film sobre el cristall de Ge de l'ATR. Després d'aquesta consideració, es van obtenir uns valors per la MelB sense substrats, de $p_\phi/p_\gamma = 0.154 \pm 0.014$ per l'amida I (precisió de 11) i de $p_\phi/p_\gamma = -0.326 \pm 0.012$ per l'estirament asimètric del CH_2 . La resta de paràmetres també incrementaren la seva precisió. A més, a resultes de l'eliminació dels problemes d'orientació del film, la proporció (p_ϕ/p_γ) s'estableix respecte la normal de la membrana dels proteoliposomes, no respecte la normal de cristall d'ATR.

⁽¹⁾ $-0.274 = p_\beta \cdot p_\alpha$ si $p_\alpha = -0.5$ pel lípid CH_2 simètric $\longrightarrow p_\beta = 0.548$ $\beta = 33^\circ$ (vegeu materials i mètodes)

4. 6. 2. 2. Anàlisi dels espectres de dicroïsme de la MelB salvatge en D₂O

Es van obtenir primerament espectres amb llum polaritzada paral·lelament i perpendicularment de films de proteïna que havien estat sota un flux de vapor de D₂O durant 900 minuts i posteriorment assecats. La figura 4.27A mostra els espectres polaritzats $\parallel$ i $\perp$ i l'espectre dicroic d'un film sec de MelB sense substrats en D₂O (és a dir, D⁺/MelB). Podem observar com l'amida II és més petita que la banda amida II del complex H⁺/MelB (figura 4.26A), indicant que la proteïna ha bescanviat bona part dels hidrògens de la seva estructura per deuterons, concretament, el 60%. La figura 4.27B representa l'espectre dicroic ampliat, on apareixen les tres bandes de lípid d'*E.coli* amb el mateix signe i amb números d'ona similars a la MelB en H₂O (vegeu figura 4.26B). Aquesta similitud en els números d'ona dels màxims de les bandes de lípid, indiquen que l'orientació d'aquests no es veu afectada pel bescanvi H/D. Per contra, les bandes amida A, I i II sofreixen

petits desplaçaments en els màxims de les intensitats de les bandes, situant-se ara a 3299, a 1655 i a 1542.5 cm⁻¹, respectivament. Aquests petits desplaçaments són deguts a la desaparició de part dels hidrògens de l'estructura orientada de la proteïna, de manera que en l'espectre de dicroïsme de la MelB en D₂O les amides A i II observades (no és el cas de l'amida I) representen els hidrògens de les

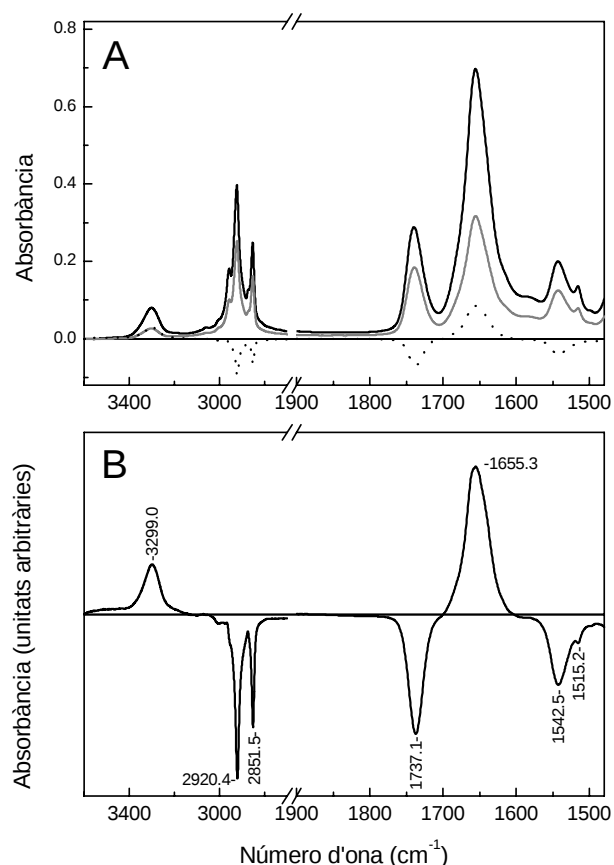


Figura 4.27. (A) Espectres de polarització $\parallel$ (negre) i $\perp$ (gris) d'un film de proteoliposomes de MelB sense substrats en tampó amb D₂O i el seu espectre de dicroïsme (negre puntejat). (B) Espectre de dicroïsme del pannel A ampliat.

estructures orientades resistents al bescanvi (Goormaghtigh et al., 1994). L'amida A' correspon als hidrògens de l'enllaç N-H orientat que es bescanvien (l'enllaç N-H és causant del 95% de la vibració en l'amida A) i es desplacen cap a 2590 i 2740 cm^{-1} i l'amida II' representa els hidrògens orientats de l'enllaç C-N perpendicular al C=O i que es desplaça a 1460 cm^{-1} (Goormaghtigh et al., 1994). Les amides I i I' estan totalment superposades, ja que les bandes d'estructures bescanviabiles que componen l'amida I només es desplacen uns 5-10 cm^{-1} , i per tant, representen la població d'hidrògens bescanviabiles i no bescanviabiles de les estructures orientades (Goormaghtigh et al., 1994; de Jongh et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999).

L'obtenció d'informació de les estructures orientades de la proteïna en D_2O és més complicada que en H_2O degut als canvis que sofreixen les bandes en bescanviar-se els H per D. Així doncs, l'amida A que es bescanvia dona dues bandes amida A' molt poc intenses amb màxims situats a 2590 i 2470 cm^{-1} , que a més es superposen parcialment amb la banda d'absorció del vapor de CO_2 (dades no mostrades). Restar la contribució de vapor de CO_2 és molt difícil ja que aquest sofreix canvis d'intensitat molt elevats entre l'adquisició d'un espectre i el següent. A més, l'assignació d'estructura secundària mitjançant la banda amida A' no està descrita en la literatura i per tant, és difícil dir quines són les estructures bescanviades orientades. L'amida II' també es superposa totalment amb la banda de lípid a 1460 cm^{-1} i per tant tampoc és una bona candidata per a estudiar l'estructura secundària bescanviada orientada. Ara bé, si ens fixem en la posició dels màxims i el signe de les bandes de l'amida A i II de l'espectre de dicroïsm de la MelB en D_2O (figura 4.27B) de les bandes amida A i II, podem dir que els hidrògens de les estructures orientades resistents al bescanvi són majoritàriament hèlixs α (Goormaghtigh et al., 1994). Això ens permet dir, que totes o part de les hèlixs α orientades observades en l'espectre dicroic de la MelB en H_2O són resistents al bescanvi H/D. Els hidrògens bescanviats a deuterons de les tirosines orientades s'observen en la banda molt resolta a 1515 cm^{-1} (Chirgadze et al., 1975). Per tant, algunes de les 15 tirosines situades als segments transmembrana pertanyen a les hèlixs α transmembrana bescanviabiles orientades. Les fenilalanines en canvi, no es poden observar en l'espectre dicroic perquè es veuen camuflades per la incorporació de la banda amida II'.

4. 6. 3. Efecte dels substrats en l'orientació de les estructures de la MelB salvatge

Considerant els paràmetres de correcció dels lípids (secció 4.6.3), s'analitzaren els experiments de polarització realitzats sobre films de MelB incubats en diferents substrats formant: (a) el complex binari H^+ /MelB lliure de Na^+ i melibiosa, (b) el complex binari Na^+ /MelB en un medi amb NaCl 10 mM lliure de melibiosa, (c) el complex terciari H^+ /mel/MelB en un medi amb melibiosa 5 mM lliure de Na^+ i finalment (d) el complex terciari Na^+ /mel/MelB en un medi amb NaCl 10 mM i melibiosa 5 mM, tant en tampó H^+ com en tampó D^+ . Els valors obtinguts de cada paràmetre d'ordre en diferents condicions, es mostren a la Taula 4.IV. Cal tenir en compte però, que la R^{ATR} i com a conseqüència, el paràmetre d'ordre p_β ens dona

Taula 4.IV. Taula de valors dels paràmetres d'ordre, p_β i els angles β de la MelB en diferents condicions de substrats.

	Amida I -I'	Amida A en D_2O	$_{ss}CH_2$	C=O
H^+ /MelB	$P=0.36\pm0.02$ $P_{1/2}=0.72\pm0.04$ $\beta=26\pm2$	$P=0.67\pm0.04$ $\beta=28\pm2$	$P=-0.33\pm0.01$ 70.1 ± 0.4	$P=-0.26\pm0.01$ 66.7 ± 0.3
Na^+ /MelB	$P=0.24\pm0.01$ $P_{1/2}=0.48\pm0.01$ $\beta=36\pm1$ ($\Delta+10\pm2$)	$P=0.49\pm0.02$ $\beta=36\pm1$ ($\Delta+8\pm2$)	$P=-0.32\pm0.01$ 69.6 ± 0.1 ($\Delta-0.5\pm0.4$)	$P=-0.24\pm0.01$ 65.2 ± 0.2 ($\Delta-1.5\pm0.4$)
H^+ /mel/MelB	$P=0.36\pm0.02$ $P_{1/2}=0.73\pm0.03$ $\beta=25\pm1$ ($\Delta-1\pm2$)	$P=0.61\pm0.01$ $\beta=31\pm1$ ($\Delta+3\pm2$)	$P=-0.33\pm0.01$ 70.2 ± 0.2 ($\Delta+0.1\pm0.5$)	$P=-0.25\pm0.01$ 66.0 ± 0.2 ($\Delta-0.7\pm0.5$)
Na^+ /mel/MelB	$P=0.31\pm0.01$ $P_{1/2}=0.63\pm0.02$ $\beta=30\pm1$ ($\Delta+4\pm2$)	$P=0.61\pm0.06$ $\beta=31\pm3$ ($\Delta+3\pm4$)	$P=-0.32\pm0.01$ 69.8 ± 0.2 ($\Delta-0.3\pm0.5$)	$P=-0.24\pm0.01$ 65.6 ± 0.4 ($\Delta-1.1\pm0.5$)

informació sobre l'estructura global, és a dir, l'orientada i la no orientada. Per a les bandes amida, el paràmetre d'ordre correspon a p_β (orientació de l'estructura de la proteïna, veure fig. 3.9), mentre que per les bandes de lípid correspon a la relació p_ϕ/p_γ (veure secció 3.6.2.2). En concret, el valor de p_β de l'amida I correspon a l'orientació de tota la proteïna, és a dir, considerant totes les estructures secundàries no bescanviades orientades i no orientades. D'una altra manera, la p_β de l'amida I' correspon a l'orientació de les estructures secundàries bescanviades i no bescanviades orientades i no orientades. La repetició dels valors de la relació p_ϕ/p_γ del lípid, ens indiquen que la correcció del valor de p_γ és correcte. Per tal de d'obtenir el valor de p_β de l'amida I i I' de l'estructura orientada solament, es dona un segon paràmetre d'ordre suposant que els segments no transmembranals de la proteïna no estan globalment orientats ($p_{1/2}$). Aquesta suposició és possible, si assumim que el 50% de la proteïna correspon a hèlix α transmembrana i l'altre 50% correspon a la resta d'estructures secundàries no orientades (Pourcher et al., 1996; capítol 4.3). Per altre banda, els paràmetres d'ordre obtinguts per l'amida A en D_2O representen les estructures no bescanviades. Si comparem els angles obtinguts de l'amida A corresponents a les estructures no bescanviades, amb els angles corresponents a les hèlixs α transmembrana de l'amida I corregida, podem veure que són molt similars. Ja que aquests valors s'han obtingut de bandes i suposicions diferents, els podem acceptar com a plenament vàlids. Si comparem els valors de les bandes amida I i amida A de cada un dels complexos de la MelB amb la resta, podem concloure que existeix reorientació de les hèlixs α transmembrana degut a la unió de substrats. En concret, els complexos $H^+/MelB$ i $H^+/mel/MelB$ contenen els segments transmembrana més orientats amb un angle al voltant de 26° , seguit del complex $Na^+/mel/MelB$ amb 30° i per últim el $Na^+/MelB$ amb un angle de 36° . L'addició de melibiosa al complex binari $Na^+/MelB$ confereix més orientació global de les hèlixs α transmembrana. En canvi no sembla produir-se el mateix efecte pel $H^+/MelB$. S'ha de tenir en compte, que els angles d'orientació obtinguts per a cada condició de substrat, depenen de la combinació d'orientacions de les dues bandes d'hèlixs α . Per tant, tot i presentar angles d'orientació similars com és el cas de $H^+/MelB$ i $H^+/mel/MelB$, poden ser deguts a orientacions individuals diferents de cada una de

les bandes que componen els segments transmembrana, però que en suma donen una orientació global és similar.

Les dades sobre l'orientació de les estructures no bescanviades en la zona de l'amida A mostren més variabilitat entre sí i comparat amb els paràmetres d'ordre corregits de l'amida I ($P_{1/2}$), perquè probablement aquestes dades depenen de dos processos, el bescanvi H/D i l'orientació. En el cas del complex ternari H^+ /mel/MelB existeix una diferència més gran entre els angles obtinguts per l'amida A i l'amida I i l', i això voldria dir que la correcció del 50% d'hèlixs α transmembrana no és el valor més correcte quan la proteïna està incubada amb melibiosa i H^+ . Una possible explicació és que l'angle obtingut per l'amida A reflecteixi almenys una altre estructura secundària a més de les hèlixs α transmembrana o també potser que en aquest cas existeixi més variació en l'amida A degut als dos processos que l'afecten. Aquesta observació reforçaria els resultats de la cinètica de bescanvi H/D on el complex ternari H^+ /mel/MelB és l'estat on existeixen més canvis a nivell d'estructura làmina β i d'estructura hèlix α (vegeu figures 4.10 i 4.11). És una idea temptadora imaginar-se que la unió del sucre i el protó a la MelB, comporta canvis a nivell dels llaços 4-5 i 10-11 predits com d'estructura làmina β i d'algunes hèlixs α , de manera que canvia l'orientació global de les hèlixes de la proteïna. El complex terciari Na^+ /mel/MelB presenta el mateix angle de les estructures resistents al bescanvi H/D que el complex terciari H^+ /mel/MelB, indicant que l'orientació d'aquestes és el mateix en ambdós estats. Tot i així, no existeixen diferències entre l'angle que fa referència a l'estructura secundària i el de les estructures no bescanviades, cosa que lligaria amb el fet que aquest estat no presenta diferències de bescanvi a nivell hèlixs α i sí en presenta per en un grau menor que el complex Na^+ /mel/MelB (vegeu figures 4.10 i 4.11). Això explicaria perquè la correcció del p_β del 50% és vàlida per aquest complex terciari.

Per tal de discernir més sobre quines són les estructures de la MelB que mostren orientació en diferents condicions de substrats, es va representar el valor de p_β de cada complex de la MelB, en funció del número d'ona de la banda d'amida I. L'anàlisi es va centrar en la regió de 1670 a 1650 cm^{-1} , ja que és en aquesta regió on s'han assignat dos tipus d'hèlixs α transmembrana per a la MelB (capítol 4.3). Per tal d'entendre com depèn el valor del paràmetre d'ordre p_β del número d'ona, es varen

simular tres situacions d'orientació simple (figura 4.28). a) Si només tinguéssim una sola estructura orientada, observariem un valor constant del paràmetre d'ordre (figura 4.28A); b) Si a més de tenir una sola estructura orientada, tinguéssim altres estructures no orientades, s'observarà un màxim de p_{β} en el número d'ona on la contribució de l'estructura orientada és màxima respecte la resta d'estructures, donant un valor subestimat de l'estructura orientada (Figura 4.28B); c) Si tenim dues estructures amb orientació i d'altres sense orientació, es formaran dos màxims

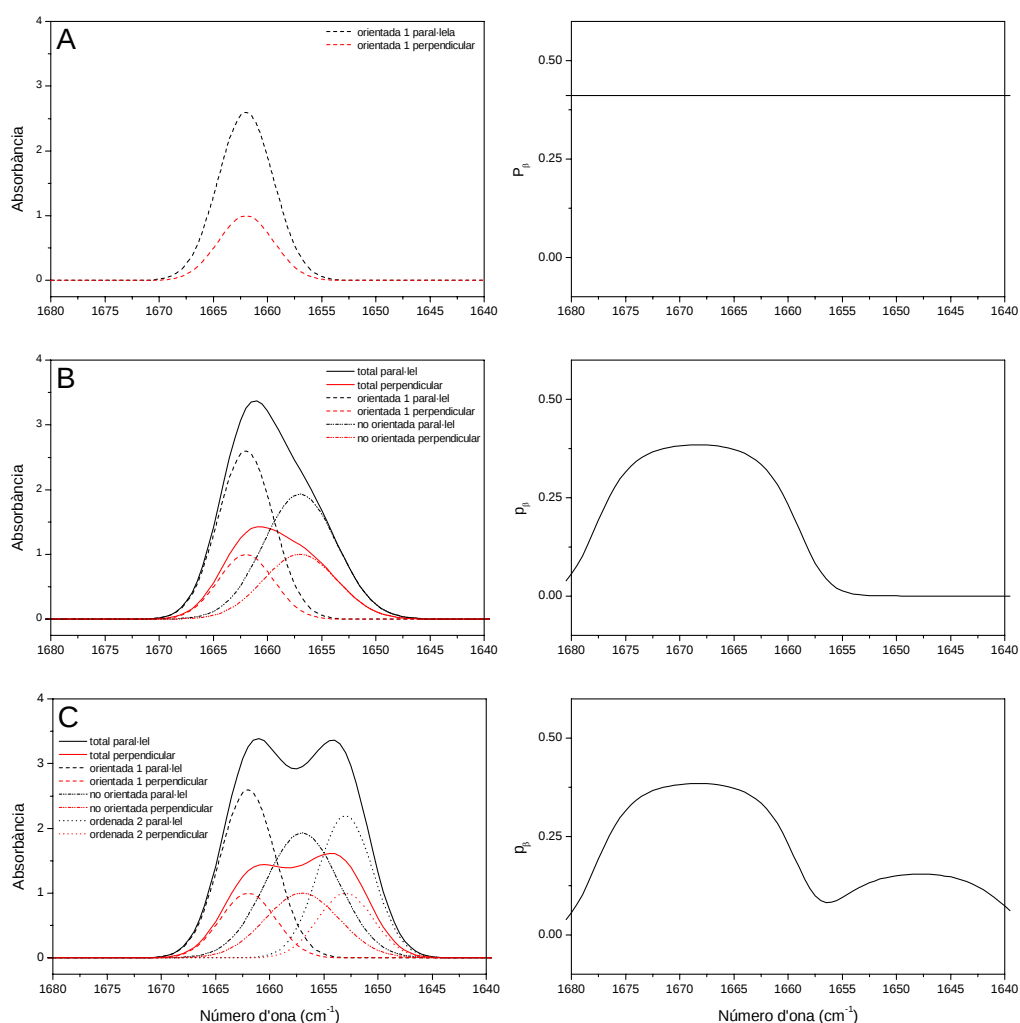


Figura 4.28. Model de representació del paràmetre d'ordre p_{β} en funció del nombre de bandes orientades en l'espectre de polarització II i $\perp$. (A) Quan solament existeix una sola estructura orientada polaritzada a paral·lelament i perpendicularment. (B) Una estructura orientada més una no orientada, i la suma de les dues (total) polaritzades II i $\perp$. (C) Dues estructures orientades i una de no orientada i la suma de les tres polaritzades II i $\perp$. Les bandes sintètiques s'han creat segons els paràmetres d'una banda gaussiana.

corresponents a cada orientació, units per una línia que variarà suaument d'un màxim a l'altre, amb un mínim que reflexarà on hi ha menys orientació (figura 4.28C). Cal tenir present, que l'anàlisi d'aquesta figura ens dóna bàsicament informació qualitativa de la diferent orientació de bandes.

La figura 4.29 ens mostra els resultats de p_β obtinguts del espectres de dicromisme desconvulats, dels quatre complexos de la MelB en tampó amb H_2O .

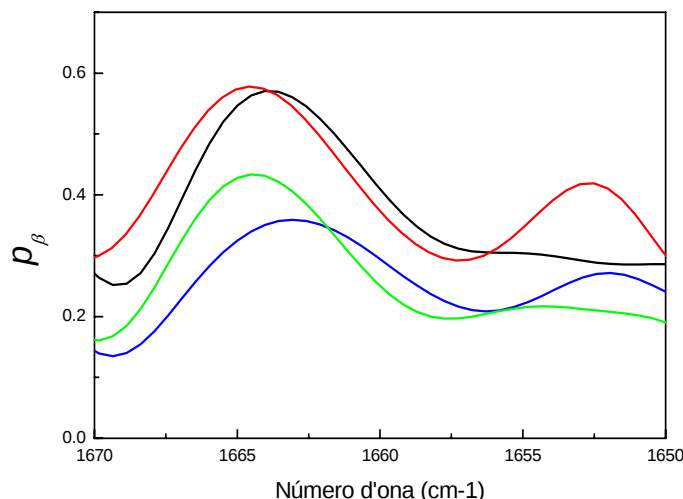


Figura 4.29. Representació gràfica del paràmetre d'ordre p_β en funció del número d'ona a la regió 1670-1650 cm^{-1} de la MelB en diferents condicions de substrats.

Existeixen dos màxims i un mínim pels complexos $Na^+/MelB$, $Na^+/mel/MelB$ i $H^+/mel/MelB$. En cas del complex binari $H^+/MelB$, el segon màxim, tot i existent, no és tant evident. Els dos màxims estan situats entre 1664,5-1663,0 cm^{-1} i entre 1655,5-1652,0 cm^{-1} en les quatre condicions de substrats, essent un de major i l'altre de menor orientació, respectivament.

Aquesta observació indica clarament l'existència de dos tipus d'orientació d'hèlixs transmembrana, i dóna suport a les evidències anteriorment descrites sobre l'existència de dos tipus d'hèlixs α que a més es modifiquen per l'addició de substrats. Encara més, en el treball de Hacksell et al. (2002) en que s'estudien cristalls bidimensionals de la MelB per difracció de raigs-X, també troben indicis sobre l'existència de dos grups d'orientació dels segments transmembrana a més dels situats de forma perpendicular al pla de la membrana. Aquest grup d'orientacions diferents podrien contribuir a l'obtenció de les dues bandes d'infraroig.

D'acord amb la fig. 4.29, el màxim de la primera banda dóna diferents orientacions depenent de les condicions de substrats, de manera que la p_β és de 0.57, 0.36, 0.58 i 0.43 pels substrats H^+ , Na^+ , $H^+/melibiosa$ i $Na^+/melibiosa$, respectivament. Per tant, podem dir que la banda situada al voltant de 1662 cm^{-1}

assignada a estructura α -hèlix és l'estructura més orientada de totes que presenta modulació de l'orientació per l'efecte dels substrats. Si comparem en diferents condicions de substrats, ens trobem que la unió del Na^+ sol a la MelB disminueix l'orientació d'aquesta banda, i que l'addició posterior de melibiosa l'incrementa. Quan la proteïna està en presència de H^+ aquesta banda està més orientada que en presència de catió sodi, i l'addició de melibiosa l'incrementa poc.

La segona banda situada a 1652 cm^{-1} mostra menys orientació que la primera, encara que podria ser degut a una major influència de bandes d'estructures no orientades. L'orientació d'aquesta segona banda també depèn de la unió de substrats amb un patró molt diferent de la banda a 1662 cm^{-1} tal que p_β és 0.30, 0.27, 0.42 i 0.22 pel substrats H^+ , Na^+ , H^+ /melibiosa i Na^+ /melibiosa, respectivament. En aquest cas, la incubació amb Na^+ o H^+ presenta una orientació molt similar, però a diferència del que passava amb la banda a 1662 cm^{-1} , l'addició de melibiosa al complex H^+ /MelB resulta en un augment considerable de l'orientació, mentre que l'addició de sucre al complex Na^+ /MelB la disminueix. Finalment també s'observa un mínim situat entre 1658 i 1656 cm^{-1} , representant una contribució més elevada d'estructures no orientades respecte a les orientades en aquest interval. Per la posició del mínim de les estructures no orientades en H_2O , es podrien assignar a estructures no ordenades (Goormaghtigh et al., 1994)

4. 6. 4. Efecte dels substrats en l'estructura secundària de la MelB, en el bescanvi H/D i en el angle de les components estructurals orientades

Segons les dades dels angles de la taula 4.IV dels paràmetres d'ordre de la MelB, sembla ser que només els segments transmembrana mostren orientació, o més orientació que la resta d'estructures. Per tal de comprovar-ho i assegurar-nos que la banda a 1654 cm^{-1} no és deguda principalment a estructura no ordenada, utilitzarem l'espectre dicroic el qual ens permet una identificació més clara de les bandes orientades, ja que les no orientades no contribueixen a l'espectre. Així, la desconvolució de l'espectre dicroic de la MelB ens donarà la posició de les components de l'amida I que estan orientades. La figura 4.30A mostra l'espectre de dicroïsme de la MelB en H_2O sense incubació de substrats (per tant, en presència de H^+) desconvulat. L'amida I presenta un màxim principal situat a 1661.8 i una espatlla

a 1654.0 cm^{-1} corresponents a hèlixs α i altres pics menys intensos a 1682.6 , 1673.7 assignades a girs reversos i a 1643.7 cm^{-1} representant hèlixs 3_{10} , llaços oberts, o fins i tot, hèlixs α amb ponts d'hidrogen forts (capítol 4.3). L'amida II mostra només una banda principal a 1544.7 cm^{-1} representant una contribució principalment deguda a estructures hèlixs α i una altra banda a 1516.0 cm^{-1} deguda a les tirosines situades als segments transmembrana (Goormaghtigh et al., 1994). També es pot observar com la regió que uneix l'amida I amb l'amida II (de 1635 a 1560 cm^{-1}) no presenta cap banda, reflectint la inexistència d'altres estructures i aminoàcids orientats, característics d'aquesta regió. L'existència de dos tipus d'hèlixs α trobades anteriorment per FTIR de transmissió queda altre cop reforçada en l'espectre dicroic. La segona banda a 1654.0 cm^{-1} no pot ser deguda a la component petita de la banda a 1661.8 cm^{-1} , ja que les dues bandes mostren intensitats positives. La resta de bandes orientades menys intenses i situades a 1682.6 , 1673.7 i 1643.7 cm^{-1} no poden ser degudes a estructura làmina β orientada, ja que no hi ha senyal d'aquesta ni a l'amida A ni a l'amida II. Encara més, la regió d'absorció típica de l'estructura

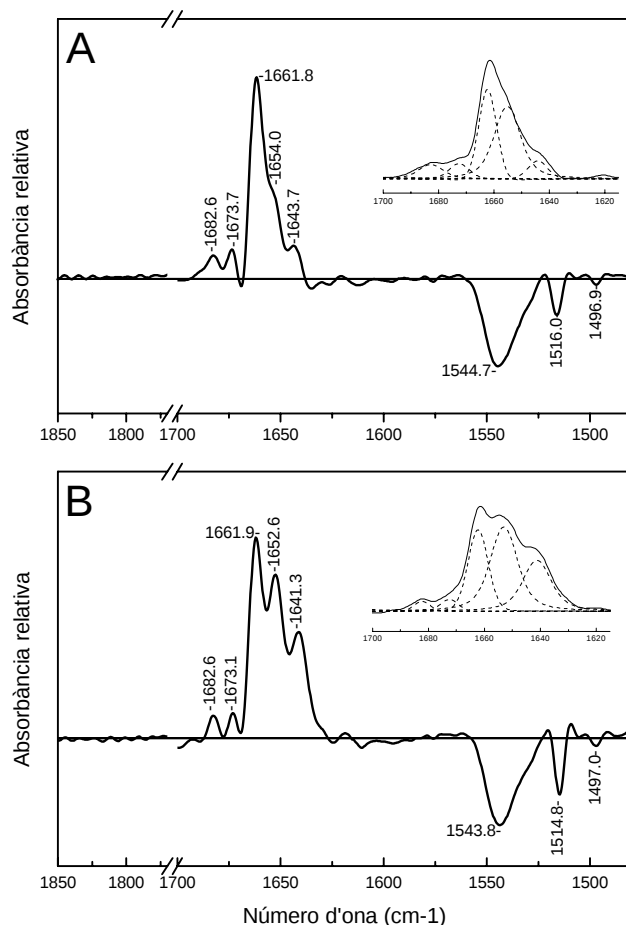


Figura 4.30. Espectres dicroics desconvulats de la MelB sense substrats amb una FWHH de 14 cm^{-1} i una k de 2.6. (A) en tampó amb H_2O . Requadre, espectre de l'amida I de la MelB desconvulat amb una FWHH de 14 cm^{-1} i una k de 2.2 i amb les bandes ajustades. (B) MelB en tampó amb D_2O . Requadre, amida I de la MelB desconvulada amb els mateixos paràmetres que el requadre de A i amb les bandes ajustades.

làmina β de 1640 a 1620 cm^{-1} , no mostra cap banda. Així doncs, aquestes bandes podrien ser degudes a regions dels llaços corresponents als primers aminoàcids que s'uneixen als segment transmembrana (probablement els orientats) els quals poden adoptar estructura de girs reversos (Fabian et al., 1992; Arrondo et al., 1993; Jackson and Mantsch, 1995).

La figura 4.30B mostra l'espectre de dicroïsme desconvulat de la MelB en les mateixes condicions que a la figura 4.30A, però després d'estar sotmesa a una atmosfera saturada de vapor de D_2O durant 900 minuts. En aquest cas, s'observen tres bandes principals a la regió amida I' (superposada amb l'amida I) situades a 1661.9, 1652.6 i 1641.3 cm^{-1} i dos bandes menys intenses a 1682.6 i 1673.1 cm^{-1} . A l'amida II hi apareix una banda principal a 1543.8 cm^{-1} , amb una forma molt similar a l'amida II en H_2O tot i que amb menys intensitat. En aquest cas, l'amida I' s'ha d'interpretar com la superposició de bandes orientades bescanviades i i no bescanviades. Així doncs, la banda a 1662 cm^{-1} de l'amida I' consta principalment de les estructures provinents de la banda a 1662 cm^{-1} de l'amida I que no es bescanvien. La banda a 1654 cm^{-1} de l'amida I' conté part de l'estructura que es bescanvia de la banda a 1662 cm^{-1} i de l'estructura que no es bescanvia de la banda a 1654 cm^{-1} de l'amida I. La banda a 1641 cm^{-1} de l'amida I' consta principalment de l'estructura bescanvia de la banda a 1654 cm^{-1} i de l'estructura que no es bescanvia a 1644 cm^{-1} de l'amida I. D'aquesta manera i quantificant les bandes orientades de la MelB abans de bescanviar (figura 4.30A) i les de després de bescanviar (figura 4.30B) podem estimar el nivell de bescanvi de les diferents estructures orientades.

Per tal de quantificar aquestes bandes es va procedir a l'ajustament de bandes del complex binari H^+/MelB abans i després del bescanvi H/D (Requadres de les figures 4.30A i 4.30B). De les dades obtingudes de la MelB en H_2O , es va obtenir la posició, l'amplada i la relació d'àrea de les bandes a 1662 i 1654 cm^{-1} (Taula 4.V); Essencialment, estem interessats en el bescanvi H/D de les bandes hèlixs α perquè la resta són menys intenses i difícils d'interpretar. Així, comparant aquestes dades amb les dades de la MelB en D_2O , es pot deduir el nivell de bescanvi de les bandes a 1662 i 1654 cm^{-1} . La banda a 1662 cm^{-1} presenta una resistència al bescanvi H/D del 75%, i la banda a 1654 cm^{-1} un 65% de resistència.

Taula 4.V. Posició de les intensitats de les dues bandes hèlixs α i el seu bescanvi H/D de la MelB en diferents condicions de substrats.

Condicions de substrats	H ⁺	Na ⁺	H ⁺ /melibiosa	Na ⁺ /melibiosa
Posició 1 (cm ⁻¹)	1662.3	1661.7	1662.5	1663.1
% Estructura bescanviada	25	15	30	30
Posició 2 (cm ⁻¹)	1655.3	1653.8	1654.2	1655.7
% Estructura bescanviada	35	30	15	20
A ₁ / A ₂	0.7	1.5	2.3	0.9

L'ajust de bandes dels espectres dicroics desconvulats abans i després del bescanvi H/D, també es va aplicar per a la MelB en diferents condicions de substrats (Taula 4.V). Tal com indicava la dependència del paràmetre d'ordre del número d'ona (figura 4.29), existeixen canvis per l'efecte de la unió de substrats, concretament, en la posició i àrea de les bandes, sobretot per la banda situada a 1654 cm⁻¹. A més, també varia la proporció d'àrees (A₁/A₂) de les dues bandes assignades a estructures hèlixs α transmembrana. L'efecte dels substrats en el nivell de bescanvi H/D de les hèlixs α orientades presenta un patró depenent de la presència de catió o de sucre, de manera que la incubació amb sucre independentment de quin sigui el catió unit, mostra la segona banda a 1654 cm⁻¹ més resistent al bescanvi H/D que la banda a 1662 cm⁻¹, efecte totalment contrari quan la MelB està incubada amb H⁺ o Na⁺ solament. Per tant, la unió de melibiosa té com a conseqüència l'augment de protecció de la banda a 1654 cm⁻¹ envers el bescanvi H/D, al mateix temps que desprotegeix la banda a 1662 cm⁻¹. Aquesta última observació torna a corroborar l'existència de dues hèlixs α que es modifiquen de forma diferent en presència o no de sucre. La suma total de les estructures bescanviades i orientades de les bandes a 1662 i 1654 cm⁻¹ ens diu que els estats Na⁺/MelB i H⁺/mel/MelB són els més resistents al bescanvi, el Na⁺/mel/MelB està en una posició intermèdia i el H⁺/MelB és el que més es bescanvia. Comparant amb les dades obtingudes de les cinètiques de bescanvi H/D de la MelB en diferents

condicions de substrats, els resultats són coherents excepte pel complex Na^+/MelB (capítol 4.4). Una possible explicació d'aquesta aparent discrepància, seria que ara estem mesurant l'estructura resistent al bescanvi que està orientada i per tant, no estem comptabilitzant l'àrea corresponent a l'estructura no orientada.

Les dades de la Taula 4.V referents a la relació de les àrees de les bandes a 1662 i 1654 cm^{-1} (A_1/A_2) ens dóna informació sobre la proporció de cada hèlix orientada en diferents condicions de substrats. És difícil discriminar quina és la causa de l'augment o disminució de la raó de les dues bandes. És a dir, quan la relació A_1/A_2 augmenta, pot ser deguda a dues raons: a) que la quantitat d'estructura de la banda a 1662 cm^{-1} (A_1) augmenti respecte a la de 1654 cm^{-1} (A_2), b) que augmenti l'orientació de l'estructura (és a dir, que l'angle vers la normal de la membrana disminueix) de la banda a 1662 cm^{-1} respecte a la de 1654 cm^{-1} o a una combinació dels dos efectes. Molt probablement, el que realment succeeix és una combinació dels dos factors.

Així, a partir de les relacions A_1/A_2 de la Taula 4.V, tenim que el complex binari H^+/MelB té una banda a 1654 cm^{-1} més important que la banda a 1662 cm^{-1} i la addició posterior de melibiosa fa incrementar notablement la proporció de la banda a 1662 respecte a la de 1654 cm^{-1} . Per altre banda, l'addició de Na^+ resulta en un augment significatiu de la banda a 1662 respecte a la de 1654 cm^{-1} , però l'addició de melibiosa reverteix aquest efecte. Aquest patró de comportament en presència del catió Na^+ , recorda al patró de canvi de les dues bandes d'hèlixs α analitzat per FTIR de transmissió en què l'addició de Na^+ comporta l'augment de l'intensitat de la banda a 1660 cm^{-1} alhora d'una disminució de la banda a 1653 cm^{-1} . Una possible explicació d'aquesta correspondència de comportament entre els resultats obtinguts per FTIR i els obtinguts per polarització mitjançant ATR, és que el canvis produïts en l'estructura de les hèlixs α globals (orientades i no orientades) en presència de Na^+ són deguts en gran part als canvis en l'orientació d'aquestes. De fet, tant per espectroscòpia de fluorescència (Mus-Veteau et al., 1995), com per FTIR de transmissió (capítol 4.3) es descriuen canvis conformacionals de les hèlixs α més grans en presència de sodi que de protó, encara que a nivell de bescanvi H/D global, aquest efecte no sigui manifest (capítol 4.4).

4. 6. 5. Espectres de dicroïsme del mutant R141C

De la mateixa manera que per l'estudi del bescanvi H/D, també es va estudiar l'orientació del mutant R141C. Es van restar els espectres de films de mutant amb llum polaritzada paral·lelament dels de llum polaritzada perpendicularment, però en aquest cas es va ajustar el factor de subtracció per a cada experiment individualment fins a obtenir una amida I positiva i una amida II negativa, i una línia base plana (en la regió de 1800-1950 i en la regió entre l'amida I i l'amida II). La figura 4.31A ens

mostra els espectres de dicroïsme del mutant R141C en H_2O i en D_2O , desconvulats, utilitzant els mateixos paràmetres que per la MelB salvatge. Podem observar com la diferència entre els espectres obtinguts en aigua i en deuteri (corresponents a les estructures orientades) és menor que per la MelB salvatge. L'espectre dicroic desconvulat en D_2O ens mostra un augment de les bandes de la regió a 1640-1620 cm^{-1} comparat amb l'espectre en H_2O , indicant la presència de bescanvi de les estructures orientades i un desplaçament d'uns 10 cm^{-1}

cap a valors menors del número d'ona (Goormaghtigh et al., 1999). L'amida II orientada en D_2O no presenta una gran diferència d'àrea comparada amb l'obtinguda en H_2O . En canvi, els espectres d'absorció en D_2O obtinguts sense polarització en l'amida II mostren diferències importants (figura 4.18). Segons aquest resultat,

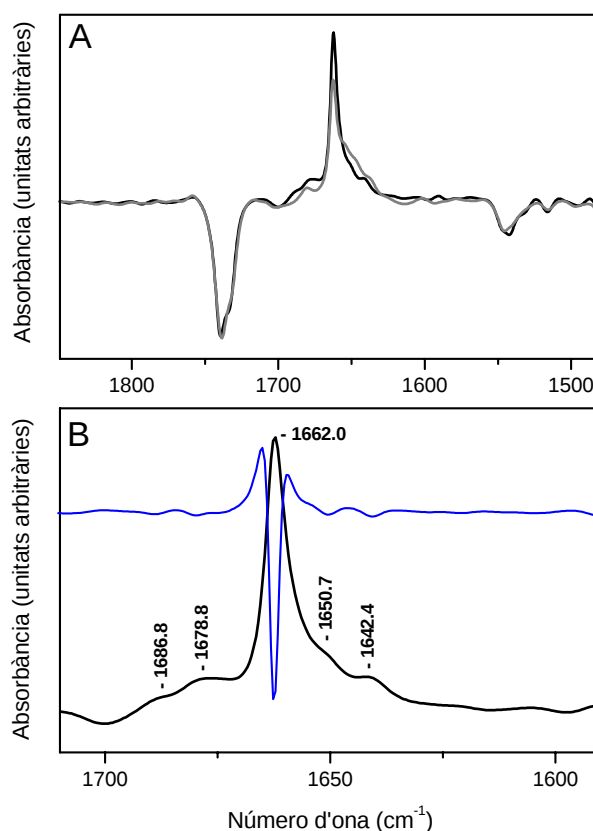


Figura 4.31. (A) Espectres de dicroïsme d'un film prim del mutant R141C a la regió 1850-1450 cm^{-1} en tampó amb H_2O (*negre*) i amb D_2O (*gris*). (B) Intensitats de l'amida I de l'espectre de dicroïsme de A. La segona derivada de l'espectre de dicroïsme es presenta en *blau*.

podríem dir que el bescanvi H/D de l'estructura del mutant, es deu principalment a l'estructura no orientada: l'estructura que està orientada es bescanvia molt poc. L'amida I també ens indica el mateix ja que el màxim de la banda principal α -hèlix només sofreix una disminució de la intensitat no suficient per a desplaçar el màxim de la banda a números d'ona més baixos.

La figura 4.31B presenta la banda amida I en H₂O del mutant R141C amb un màxim molt intens situat a 1662 cm⁻¹ i un altre de molt menys intens al voltant de 1651 cm⁻¹ corresponent a estructures hèlixs α . Comparant amb l'espectre d'absorció desconvulat sense polarització (figura 4.16), s'observa una gran diferència entre aquestes dues bandes corresponents a hèlix α . La causa d'aquesta diferència d'intensitats és deguda a una pèrdua d'orientació (augmenta l'angle respecte la normal de la membrana) del total d'aquesta estructura a 1651 cm⁻¹. Les altres tres bandes situades a 1686.8, 1678.8 i 1642.4 cm⁻¹, són molt menys intenses. En aquesta figura també es mostra la segona derivada, que ajuda a determinar els màxims de l'espectre desconvulat (corresponents als mínims de la segona derivada).

4. 6. 5. 1. Comparació dels espectres de dicroïsme del mutant R141C i la MelB salvatge

La figura 4.32, representa els espectres de dicroïsme dels complexos H⁺/MelB i H⁺/R141C desconvulats pel mètode de desconvolució de màxima entropia (vegeu materials i mètodes). Els espectres d'absorció del mutant R141C amb llum polaritzada paral·lelament i perpendicularment tenen una relació senyal soroll no tant bona com la de la MelB salvatge, i com a conseqüència l'autodesconvolució de Fourier dóna més soroll. Per a solucionar el problema del soroll es va desconvular pel mètode de desconvolució de màxima entropia, el qual minimitza en gran mesura el grau de soroll de l'espectre sense deixar d'aprimar les bandes (Lórenz, 2003) en comparació amb la desconvolució de Fourier. Per tal de comparar amb la MelB salvatge, també es va desconvular l'espectre de dicroïsme de la MelB salvatge sense substrats (H⁺/MelB) pel mateix mètode (figura 4.32). Existeixen diferències importants a nivell d'amida I i amida II. La banda amida I de la MelB salvatge presenta un component principal a 1662 cm⁻¹ i una espatlla a 1653 cm⁻¹. En canvi, el mutant té una component molt important a 1662 cm⁻¹ i una altre molt menys

important a 1651 cm^{-1} . L'àrea de l'estructura orientada de l'amida II és més gran per la MelB salvatge, és a dir, té més quantitat d'estructura orientada o una quantitat

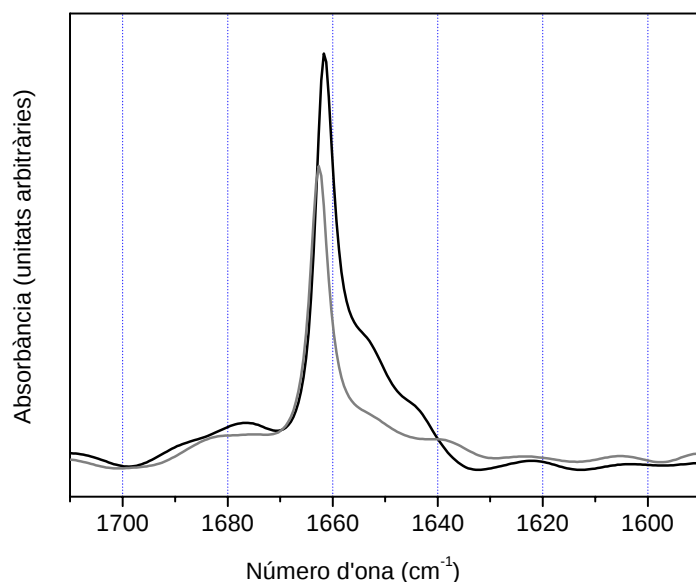


Figura 4.32. Comparació dels espectres de dicroïsme de la banda amida I de la MelB salvatge (*negre*) i del mutant R141C (*gris*).

similar d'estructura orientada que posseeix un grau d'orientació superior que el mutant R141C. En la resta de bandes també existeixen diferències tot i que són menys importants. La mutació en la posició 141 del llaç 4-5 podria resultar en una major mobilitat d'aquest llaç i d'altres que interaccionen amb ell de manera que

podria canviar l'orientació d'estructures com els girs reversos i hèlixs 3_{10} , corresponents a les tres bandes de l'amida I a 1688 , 1678 i 1641 cm^{-1} . Aquest conjunt de resultats seria coherent amb el fet que la mutació produeixi un canvi en l'orientació d'un grup d'hèlixs α o bé provoqui una desordenació d'algunes d'aquestes que abans estaven orientades. Aquests resultats, reafirmen la importància del llaç 4-5 pel funcionament i establiment correcte de la proteïna en la membrana (Abdel Dayem et al., 2003).

Els espectres de dicroïsme del mutant R141C en diferents condicions de substrats mostren canvis en les intensitats de les dues bandes a 1662 i 1651 cm^{-1} degut a la unió de substrats (dades no mostrades). Encara que, segueix sent present una banda molt intensa a 1662 i una de molt menys intensa al voltants de 1651 cm^{-1} . De totes maneres, no es pot realitzar un anàlisi acurat d'aquests canvis produïts per la unió de substrats, ja que estem treballant amb films prims de mutant R141C, i per tant l'aplicació de correccions vertaderes i la posterior interpretació es fa difícil (Axelsen and Citra, 1997; Goormaghtigh et al., 1999).

5. Discussió general

L'objectiu d'aquest treball ha estat essencialment, conèixer la dinàmica estructural del transportador MelB pertanyent a la família dels transportadors sodi/solut. La MelB co-transporta melibiosa i Na^+ aprofitant el gradient de Na^+ . Donat que la purificació i cristal·lització d'aquests transportadors de membrana és difícil, la seva estructura és en general poc coneguda. La MelB però, és una de les poques proteïnes d'aquesta família que s'han pogut purificar i reconstituir en estat actiu i en quantitats suficients per al seu estudi estructural (Pourcher et al., 1995). Així, en absència de la seva estructura tridimensional, la tècnica actualment més idònia que ens permet estudiar la dinàmica de l'estructura de proteïnes grans i de membrana, és l'espectroscòpia FTIR (Cladera et al., 1992; Fabian et al., 1992; Goormaghtigh et al., 1994; le Coutre et al., 1998; Goormaghtigh et al., 1999; Patzlaff et al., 2000). Val a dir, que tot i que existís l'estructura tridimensional de la MelB, la utilització de tècniques espectroscòpiques segueix essent important per estudiar la relació entre l'estructura i la funció de les proteïnes, ja que en estat cristal·litzat, la proteïna està mancada de moviment i per tant no podem obtenir informació dinàmica.

5. 1. Equivalències estructurals i funcionals de la MelB en relació amb altres transportadors

Els espectres obtinguts de la MelB reconstituïda i la solubilitzada per FTIR de transmissió, exhibeixen un patró d'estructura secundària, dominat principalment per l'estructura hèlix α . Això es reflexa per la presència de màxims situats a 1657 (amida I) i a 1545 cm^{-1} (amida II) de l'espectre d'absorció de proteoliposomes de MelB en tampó amb H_2O , i a 1654 (amida I') i 1544 cm^{-1} (amida II) després del bescanvi H/D (Goormaghtigh et al., 1994; Cabiaux et al., 1997). Aquest resultat estaria d'acord amb un contingut elevat d'hèlix α de la MelB, coherent amb una organització en dotze segments transmembrana. Aquesta seria una situació similar a la de molts transportadors integrals de membrana amb segments transmembrana, que posseeixen un alt contingut d'estructura hèlix α (Chin et al., 1986; Arkin et al., 1996; Le Coutre et al., 1997; Patzlaff et al., 1998; le Coutre et al., 2002). Tot i així, també existeixen algunes proteïnes que organitzen els seus dominis transmembrana en

estructura làmina- β , però pertanyen a una altra família de proteïnes, com les proteïnes de la membrana externa de les bactèries (Cowan et al., 1992; Schirmer et al., 1995; Lambert et al., 1999). La quantificació de l'estructura secundària de la MelB dona un 50% aproximat d'hèlixs α , quantitat suficient per a formar els dotze segments transmembrana proposats pel model topològic de Poucher et al. (1996). D'altres proteïnes integrals de membrana com l'aquaporina-1 (Cabiaux et al., 1997), el canal de K^+ de *Streptomyces lividans* (le Coutre et al., 1998) també presenten un 50% d'hèlix α . Aquest resultat contrasta amb la quantificació del 65% hèlixs α que conté el transportador de lactosa d'*Escherichia coli* (Patzlaff et al., 1998), ja que el seu model topològic tot i constar també de 12 segments transmembrana, conté els llaços citoplasmàtics més petits comparat amb la MelB. Per altre banda, el transportador Na^+ /galactosa mostra un 43% d'estructura hèlix α (le Coutre et al., 2002).

Els nostres resultats mostren la presència de dues bandes intenses a la regió 1660-1651 cm^{-1} de la MelB, tant en H_2O com en D_2O , indicant l'existència de dos tipus d'hèlixs α . Tres mètodes diferents d'aprimament de bandes (desconvolució de Fourier, derivació de Fourier i restauració de la probabilitat màxima) dels espectres d'absorció de la MelB reconstituïda en lípids d'*E.coli* i solubilitzada en DM, confirmen la presència d'aquestes dues bandes en l'interval de 1660-1651 cm^{-1} . Així mateix, els espectres de dicroïsme d'infraroig també mostren l'existència de dues bandes a 1662 i 1654 cm^{-1} corresponents a hèlixs α orientades. En canvi, quan la MelB no és funcional (solubilitzada en TX-100 o desnaturalitzada per increment de temperatura) aquestes dues bandes esdevenen una de sola, amb el màxim desplaçat cap a valors menors del número d'ona. La possibilitat que aquestes dues bandes es deguin a la presència de proteïna activa i inactiva, es veu descartada per l'existència de canvis a nivell d'ambdues bandes per la unió de substrats. Molt possiblement doncs, la presència de dos tipus d'hèlixs α és deguda a l'existència de dos tipus de conformacions diferents.

Fins ara, no s'han observat dues bandes d'hèlixs α en d'altres transportadors de membrana (Álvarez et al., 1987; le Coutre et al., 1997; Arkin et al., 1996; le Coutre et al., 2002), encara que sí s'ha observat en d'altres proteïnes de membrana com la bacteriorodopsina (Krimm and Dwivedi; 1982; Cladera et al., 1992; Torres et

al., 1995) i la fosfolipasa A₂ de secreció (Tatulian et al., 1997). Tot i així, el fet que no s'hagin observat dues bandes clares en aquests altres transportadors de membrana, pot ser degut a què aquestes estiguin massa superposades i per tant, no es puguin observar si la desconvolució no té un factor d'aprimament molt alt. En el cas de la MelB aquestes bandes estan suficientment separades per observar-se, cosa que vol dir que les dues bandes tenen característiques pròpies prou diferents l'una de l'altre. Això suggereix que, encara que la MelB és un transportador de membrana amb moltes homologies de seqüència, estructura, i funció amb d'altres transportadors de membrana de la seva família i d'altres famílies (Saier, 2000), conté dos tipus d'hèlixs α diferents possiblement importants per la seva funció. Les causes de l'existència de dos tipus d'hèlixs α són encara merament especulatives, però hom es veu temptat a especular que les diferències estructurals es deuen a la funció o als substrats que transporten. Cal tenir en compte, que aquesta característica funcional és única de la MelB respecte d'altres transportadors de membrana. A més, la MelB ocupa una posició intermèdia dins l'evolució dels transportadors de membrana que passaren de co-transportar amb el protó a fer-ho amb el sodi, els quals representarien els transportadors més evolucionats (Reizer et al., 1994), cosa que justificaria l'existència de diferències respecte dels transportadors catió/solut. Totes aquestes observacions indiquen que la MelB té una estructura arquetipus, la qual és molt interessant d'estudiar per aprofundir en el coneixement de l'evolució dels transportadors i de la dependència de la interacció substrats-estructura.

Diversos estudis d'espectroscòpia de fluorescència, proteòlisi i mutagènesis dirigida de la MelB (Mus-Veteau et al., 1996; Gwizdek et al., 1997; Maehrel et al., 1998; Cordat et al., 1998), indiquen que la unió de melibiosa i/o sodi a la proteïna indueixen canvis conformacionals cooperatius. L'obtenció de canvis en les dues bandes d'hèlixs α dels espectres d'absorció de la MelB deguts a la unió de substrats, indiquen que aquests no només es produeixen a nivell local del triptòfans de la proteïna, sinó a nivell d'estructura secundària. Encara més, els mateixos estudis de fluorescència intrínseca i de FRET troben que aquests canvis es podrien produir a nivell de les hèlixs que delimiten el lloc d'unió del sucre que també interacciona cooperativament amb el lloc d'unió del catió (Mus-Veteau et al., 1995; Cordat et al., 1998; Maehrel et al., 1998). Chin et al. (1987), també van trobar canvis en les hèlixs

α deguts a la interacció de glucosa amb el transportador de glucosa d'eritròcit humà, així com també es van trobar pel transportador de Na^+ /galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* (le Coutre et al., 2002). En canvi, no s'han descrit canvis deguts a la unió de substrats pel transportador de lactosa (le Coutre et al., 1997).

Hem obtingut dues estimacions del bescanvi H/D global de la MelB a les 48 hores. Una, sense corregir la contribució dels aminoàcids, és del 80%. I la segona, corregint la contribució dels aminoàcids, és del 60%. El valor del 80% és similar a l'obtingut per el transportador de glucosa d'eritròcit humà, encara que aquest l'assoleix només en 1 hora (Álvarez et al., 1987). El transportador de lactosa d'*Escherichia coli* és bescanvia un 95% (le Coutre et al., 1997); a més el 85% del total de bescanvi es produeix durant els primers 15 minuts. Així, tot i que la MelB és més accessible que altres proteïnes de membrana com la bacteriorodopsina (Downer et al., 1986), no és tant accessible com altres transportadors homòlegs seus. Presumiblement, en tots aquests casos com no s'ha corregit la contribució de les cadenes laterals, i per tant la comparació directa és factible. S'ha especulat que la possible raó d'aquest major bescanvi H/D de molts transportadors de membrana, és que necessiten tenir una elevada flexibilitat per tal de poder translocar grans sucres hidrofílics (Chin et al., 1986; Alvarez et al., 1987; le Coutre et al., 1997) o perquè són porus o cavitats plens d'aigua (Tatulian et al., 1998). Com a conseqüència d'aquesta hipòtesi cabria esperar que la MelB presentés una accessibilitat similar, però no és així. Podria ser que la major compactació de la MelB però que en canvi permet el transport de molècules voluminoses com la melibiosa, es podria entendre a partir de l'existència de dos tipus de components hèlixs α .

En l'estimació del bescanvi H/D després de corregir per la contribució dels aminoàcids, hem obtingut un valor del 60%. La realització o no de la correcció dels aminoàcids d'una proteïna, és sempre en última instància un intent d'aproximació al valor més real. Si no corregim la contribució de les cadenes laterals, estem sobreestimant el nivell de bescanvi, per contra, si corregim la seva contribució possiblement estem subestimant el valor obtingut perquè segurament no tots els aminoàcids que absorbeixen a la zona amida I i amida II de l'infraroig es bescanvien. Tot i així, la literatura ha demostrat que l'error comès per la no correcció de la contribució dels aminoàcids és més gran que l'error comès per la seva subtracció

(Rahmelow et al., 1998). Això és així, perquè primerament la predisposició intrínseca de les cadenes laterals que absorbeixen a la regió amida I i amida II a bescanviar-se (donat el seu pKa) és més gran i perquè el trencament dels seus ponts d'hidrogen no impliquen una ruptura de l'estructura (Huvidt and Nielsen, 1966; Bai et al., 1993; Englander et al., 1996).

5. 2. Característiques de l'estructura terciària de la MelB

L'estudi de l'accessibilitat de les proteïnes solubles mitjançant l'aplicació de la tècnica de bescanvi H/D a nivell de bescanvi global (amida II) i de cada estructura secundària (amida I) dóna informació sobre les propietats dinàmiques, l'accessibilitat i l'estabilitat, de les seves estructures (de Jongh et al., 1997; de Jongh et al., 1997; Goormaghtigh et al., 1999). Així doncs, cal esperar que l'aplicació d'aquesta mateixa tècnica sobre proteïnes de membrana com la MelB doni el mateix resultat. Encara més, com que l'estudi de l'estructura secundària de la MelB per FTIR mostra canvis deguts a la unió de substrats, s'ha analitzat la cinètica de bescanvi H/D sota diferents condicions de substrats.

L'estudi demostra que existeixen canvis en l'accessibilitat global de la proteïna en diferents condicions de substrats. Encara més, els canvis de la MelB deguts a la unió de substrats que s'observaven a nivell d'estructures hèlixs α resulten en canvis a nivell de l'accessibilitat de la proteïna. Concretament, la comparació dels nivells de bescanvi H/D de la MelB en diferents condicions de substrats, suggereixen fermament que l'addició de sucre redueix significativament l'accessibilitat de la proteïna al solvent. Aquest efecte es produeix principalment a causa d'una reducció i enlentiment significatius de la component ràpida d'hidrògens bescanviables obtinguts per la transformada inversa de Laplace de les dades experimentals. Per tant, podem deduir que la melibiosa actua protegint alguns aminoàcids que abans eren total o parcialment accessibles. Aquest augment de la compactabilitat de la MelB en presència de melibiosa és coherent amb el fet que la proteïna purificada és molt més estable en presència de melibiosa (Pourcher et al., 1995). En absència de sucre, no existeixen diferències a nivell de bescanvi H/D entre el complex $H^+/MelB$ i $Na^+/MelB$, tot i que sí s'observen diferències en la distribució de funcions. També s'observen diferències en la intensitat de cada una de les bandes d'hèlixs α a 1660 i 1653 cm^{-1}

depenent de si la MelB està unida al Na^+ o al H^+ . Totes aquestes dades juntes indicarien que l'addició de Na^+ provoca canvis estructurals incrementant l'hèlix α a 1660 cm^{-1} en detriment de la de 1653 cm^{-1} o a la inversa, però que no resulten en un canvi de l'accessibilitat global de la MelB. Aquests resultats només es poden comparar amb els obtinguts pel transportador de Na^+ /galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* el qual també mostra canvis a nivell d'accessibilitat degut a la unió de substrats (le Coutre et al., 2002). En aquest cas l'addició d'ambdós substrats (Na^+ i galactosa) també resulta en una disminució de l'accessibilitat al voltant del 10%. Per altre banda també s'observa una disminució de l'accessibilitat del 5% en presència del catió Na^+ , cosa que no succeeix per la MelB. Aquesta diferència de comportament podria ser deguda al fet que la MelB sempre està incubada amb un catió co-transportador (que és el protó), i per tant, l'addició de Na^+ només seria una substitució de catió que no donaria canvis en l'accessibilitat global.

L'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D de cada estructura secundària mitjançant les intensitats de l'amida I revela diferències, les quals no es poden apreciar estudiant la regió amida II únicament. En concret, les estructures làmina- β mostren cinètiques clarament diferents depenent del substrat addicionat, essent l'addició de melibiosa (és a dir el complex H^+ /mel/MelB) l'estat menys accessible. Aquest mateix complex ternari també presenta menys accessibilitat al medi aquós a nivell d'estructures hèlixs α més no ordenades. Cal tenir en compte, que en absència de dades quantitatives sobre els canvis en l'estructura secundària no podem saber quin canvi a nivell de bescanvi H/D és el més gran, ja que el total d'estructura hèlix α més no ordenada és de més del 50%. Caldria realitzar un experiment en el qual s'obtingués la MelB totalment accessible, sense haver perdut la seva conformació, per tal d'obtenir el valor màxim de bescanvi H/D de cada estructura secundària. Es van realitzar varis intents incrementant lentament la temperatura de la proteïna però no es va arribar a l'estat desitjat. A més, uns estudis recents realitzats al nostre laboratori indiquen que la temperatura de desnaturalització de la MelB està al voltant dels $75\text{ }^\circ\text{C}$ i en aquest valors apareixen diversos problemes pràctics a l'hora de realitzar l'experiment. Sens dubte però, la quantificació del bescanvi màxim de cada estructura secundària suposaria poder determinar el nombre d'aminoàcids implicats en cada condició.

Tot i que l'error obtingut en l'anàlisi de l'amida I és més gran que l'obtingut per l'amida II, és suficientment petit com per observar canvis en diferents condicions de substrats. La raó principal per aquest augment de l'error en l'anàlisi de l'amida I és perquè en aquest cas mesurem diferències d'intensitat en l'espectre i per tant es produeix més error que al calcular l'àrea de l'amida II. Segurament és per aquesta raó que aquest tipus d'anàlisi només s'ha utilitzat anteriorment en un nombre limitat de proteïnes solubles (de Jongh et al., 1997; de Jongh et al., 1997). Existeixen d'altres mètodes d'anàlisi del bescanvi H/D a nivell d'estructura secundària ajustant les bandes de la segona derivada de l'espectre d'absorció (Dong et al., 2002). Aquest tipus de mètode presenta varis problemes alhora de quantificar; en primer lloc, la posició de la línia base és difícil de decidir, ja que s'ha de tenir en compte que la segona derivada d'una banda lorentziana dóna lòbuls negatius, els quals poden estar subestimats. En segon lloc, la posició d'un màxim es veu afectat per la posició de l'altre i es perd la independència banda a banda que s'aconsegueix amb la desconvolució de l'espectre d'absorció. Així doncs, el mètode d'estudi del bescanvi H/D utilitzat en aquest treball representa una bona eina alhora d'estudiar la dinàmica de la proteïna.

5. 2. 1. Ubicació de l'estructura secundària que intervé en els canvis conformacionals

A falta d'informació estructural directa de la MelB, la localització dels dominis làmina β que canvien de conformació com a conseqüència de la unió de substrats només pot ser especulativa. Les prediccions d'estructura secundària i varis estudis experimentals realitzats resulten en un model topològic del transportador MelB que consisteix en 12 hèlixs transmembrana amb els segments C- i N-terminals a la cara citoplasmàtica de la membrana (Botfield and Wilson, 1989; Pourcher et al., 1990; Botfield et al., 1992; Pourcher et al., 1996; Gwizdek et al., 1997). Dins d'aquesta estructura, cal considerar els llaços 4-5 (connectant les hèlixs IV-V) i 10-11 (connectant les hèlixs X-XI) ja que presenten varies característiques molt importants per l'interès d'aquesta discussió (veure figura 1.5). En efecte, les prediccions d'estructura secundària indiquen que ambdós llaços tenen una alta probabilitat d'adoptar estructura làmina- β (tots dos llaços junts són suficientment grans per donar

la quantitat de dominis làmina- β que perden capacitat de bescanvi H/D en presència de sucre) i per altre banda, s'ha demostrat que alguns residus d'aquests llaços tenen un paper destacat en el mecanisme de transport. En concret, l'Arg 141 del llaç 4-5 és modificada específicament per un anàleg fotoactivable de la melibiosa (Ambroise et al., 2000), i si aquesta arginina és reemplaçada per un residu neutre, s'inhibeix la translocació de substrats (Abdel Dayem et al., 2003). Algunes mutacions en el llaç 10-11 també alteren el transport de sucre, com la neutralització del residu Glu365 que inhibeix el transport de melibiosa (Ding and Wilson, 2000). Un altre estudi més antic de Botfield and Wilson, (1989), ja identificava vàries mutacions puntuals del llaç 10-11 que alteren la funció de transport de la MelB. Encara més, un anàlisi comparatiu de la seqüència d'aminoàcids dels llaços 4-5 i 10-11 de la MelB d'*E.coli*, amb les seqüències homòlogues d'altres transportadors de sucre bacterians ens revela que hi ha una sèrie d'aminoàcids molt conservats. En la figura 5.1A trobem que la seqüència $(P/G)^{132}-(X)_2-(T/S)-X-(D/N/S)-(X_2)-E-R^{141}$ del llaç 4-5 es conserva en quasi bé tots els transportadors. Un treball de Poolman et al. (1996) va trobar que la seqüència $(D^{351}-(X)_2-(E/D)-Y-(G/A)-E-(X)_5-R^{364})$ es conservava en tots aquest transportadors homòlegs (figura 5.1).

Un altre fet que realça la importància d'aquest llaços i la seva possible interacció perquè es produeixi la funció de transport, és que independentment de si la MelB té un lloc d'unió comú o dos de separats per als co-substrats, hi ha indicis que aquest dos llaços estan molt a prop l'un de l'altre (Cordat et al., 2000; Ding et al., 2000). A partir d'aquestes consideracions, és lícit plantejar-se la hipòtesi que aquests dos llaços contenint estructura β siguin mòbils i puguin interaccionar entre ells, de manera que en el mecanisme del transport s'orientarien envers l'interior de la proteïna, entre les hèlixs α transmembrana un cop s'hi unís el sucre en algun lloc entre les hèlixs IV i XI (Mus-Veteau and Leblanc, 1996; Cordat et al., 1998; Ding and Wilson, 2000). De fet, el moviment d'aquest llaços podria ser un element essencial en el procés de transport, amb la interacció amb la molècula de melibiosa i la canalització d'aquesta cap a una zona de la proteïna en què l'espai entre les hèlixs tingués característiques hidrofíliques.

	127	150
		
melb_ecoli	FWSLVPTITLDKREREQLVYPYPRF	
melb_salty	FWSLVPTITLDKREREQLVPFPRF	
melb_klepn	FWSLVPTITLDKREREQLVYPYPRF	
melb_entae	FWSLVPTITLDKREREQLVYPYPRF	
lacr_staxy	YWSWLPNLTHDPREREELSVIPRF	
yagg_ecoli	YCAMPGVITADPKERHALQSWRFF	
xylp_lacpe	ITSILPSLTSPQERVTLSTIRQF	
lacy_lacde	FWAMIPALSLDSREKSTSTFARV	
yicj_ecoli	YCALGCVITNDPTQRISLQSWRFV	
lacy_leula	YWGMVPAISEDSEKRGIFTSLGSF	
rafp_pedpe	FWSMLPSLTDSREKSTSTFARV	
guta_bacsu	VNSLTGRMTNSVEERTVLTTRMI	
lacy_strtr	FWSMIPALSLDSHERKMATFARI	

A

	347	378
		
melb_ecoli	IMVADIVDYGEYKLHVRCESIAYSVQTMVVK	
melb_salty	IMVADTVDYGEFKLNIRCESIAYSVQTMVVK	
melb_klepn	IMVADTVDYGEYTMNIRCESIAYSVQTLVVKA	
melb_entae	IMVADTVDYGEYTMNIRCESIAYSVQTLVVKA	
yihp_ecoli	ALVSDTVYGEWRTGVRSEGTVYTGFTRFRKV	
uidb_ecoli	---ADTVYGEYLTGVRIEGLTYSLSFTRKC	
yjmb_bacsu	--VSDIIDYGEWKSGERKEATTYSLFNFSRKL	
yiho_ecoli	ALVPDTVDYGEWKTGIRAEGSVYTGTYFFRKI	
guta_bacsu	GMVADCVDYAEWKTGIRADGVVSSMSFINKL	
lacr_staxy	VSLADVIDYGEVKFGQRNESIITSTNTFLT	
ycr3_erwhe	---ADVADYGEWSQGRMDGIIFSTFLAVLKL	
xylp_lacpe	VMLADSVDYGEWKNGVRAEGIVTSFSSFSK	
yicj_ecoli	---SDTVDYGEWCNGKRLTGISFAGTLFVLKL	

B

Figura 5.1. Comparació de les seqüències d'aminoàcids corresponents als bucles IV - V (A) i X - XI (B) de la permeasa de melibiosa d'*E. coli*, amb les corresponents a proteïnes homòlogues: permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium* (melb_salty), *Klebsiella pneumoniae* (melb_klepn) i *Enterobacter aerogenes* (melb_entae); permeasa de lactosa de *Staphylococcus xylosus* (lacr_staxy), *Lactobacillus delbrueckii* (lacy_lacde), *Leuconostoc lactis* (lacy_leula) i *Streptococcus thermophilus* (lacy_strtr); YAGG d'*E. coli* (yagg_ecoli), transportador de xylosa de *Lactobacillus pentosus* (xylp_lacpe), permeasa de rafinosa de *Pediococcus pentosaceus* (rafp_pedpe), YICJ d'*E. coli* (yicj_ecoli), transportador de glucitol de *Bacillus subtilis* (guta_bacsu), simporters d'*E. coli* (yihp_ecoli), (yiho_ecoli) i *Bacillus subtilis* (yjmb_bacsu), transportador de glucuronide d'*E. coli* (uidb_ecoli) i la proteïna 29.9 kDa (ycr3_erwhe). La numeració segueix la seqüència d'aminoàcids de la permeasa de melibiosa d'*E. coli*.

L'observació que el sucre de la MelB protegeix el llaç 4-5 de forma cooperativa de la proteòlisi o que el llaç 10-11 és particularment resistent als talls proteolítics (Gwizdek et al., 1997) és consistent amb aquesta hipòtesi. Per altra banda, la possibilitat de que aquests llaços siguin llaços de tipus dinàmic, és una hipòtesi molt atractiva provinent de la recent demostració de l'existència de llaços re-entrants tant en transportadors procariotes com eucariotes, concretament els transportadors de glutamat (Slotboom et al., 2001). Totes aquestes dades conjuntament, emfatitzen la importància de l'estructura i funció d'aquests llaços amb alt contingut de làmina- β pel transport de sucre de la MelB.

5. 3. Canvis produïts en l'estructura terciària de la proteïna deguts a una mutació puntual

L'estudi de la cinètica de bescanvi H/D de la MelB salvatge ha revelat canvis a nivell d'accessibilitat global i d'estructura secundària sota diferents condicions de substrats. Per aquesta raó, l'estudi del mutant R141C (el qual uneix però no transporta substrats) mitjançant la mateixa tècnica és molt interessant per a l'estudi de les propietats de la unió de substrats únicament. Tal com mostra la figura 5.1A, la mutació es localitza al llaç 4-5, essent l'Arg 141 un dels aminoàcids que es conserva en diferents transportadors catió/solut. Tal com s'ha descrit en l'apartat anterior aquest llaç és molt important per al reconeixement del sucre (Cordat et al., 2000; Ambroise et al., 2000) i també té un paper crucial per a la funció de simport de la MelB (Abdel Dayem et al., 2003).

En primer lloc, el mutant sense substrats (és a dir, $H^+/R141C$) presenta un 10% més d'accessibilitat al medi aquós que la MelB salvatge. Encara que sembli increïble que una sola mutació produeixi aquests canvis en la dinàmica de part de l'estructura de la proteïna és a dir, d'uns 47 aminoàcids, existeix un altre treball sobre la glicoproteïna-P en la qual una mutació puntual provoca també canvis a nivell d'estructura terciària, que correspon a uns 40 aminoàcids (Vigano et al., 2003). Aquest augment de l'accessibilitat correspon a una conformació d'estructura més oberta, segurament deguda a la pèrdua d'interaccions provocades per l'eliminació de la càrrega positiva de la posició 141. A més, la comparació de les estructures secundàries del mutant R141C i de la MelB salvatge indiquen canvis a nivell de la

banda hèlix α a 1653 cm^{-1} i de les estructures làmina β . Si considerem que el llaç 4-5 és estructura β , es podrien interpretar els resultats com que es perd interacció d'aquest llaç amb un tipus d'hèlix α , degut a la pèrdua d'una càrrega positiva. De fet, ja existeixen altres indicis en aquest treball (apartat 4.4) i en d'altres treballs (Cordat et al., 2000; Ambroise et al., 2001) sobre la interacció del llaç 4-5 i alguns segments transmembrana.

Tal com passava amb la MelB salvatge, el mutant R141C també mostra diferent accessibilitat global al bescanvi H/D degut a la unió de substrats. En aquest cas però, el patró d'accessibilitat i d'intensitat de canvi mesurat a l'amida II degut a la unió de substrats, és diferent. Aquest resultat, no és del tot estrany perquè tot i que el mutant R141C no transloca substrats, sí que els uneix (Abdel Dayem et al., 2003) i per tant es podran observar canvis únicament deguts a la interacció amb aquest substrats, en una sola cara de la membrana. En el cas del mutant, l'addició de melibiosa en presència del catió Na^+ confereix més protecció envers el bescanvi H/D en comparació amb les altres condicions de substrats. En última instància però, es confirma que l'addició de melibiosa, tant pel que fa als processos d'unió solament com als d'unió i translocació de substrats de la MelB, confereix més protecció envers el bescanvi H/D.

L'explicació de l'augment del 10% en l'accessibilitat al solvent aquós del complex $\text{H}^+/\text{R141C}$ respecte al H^+/MelB , pot raure en diferències intrínseques en l'estructura secundària i/o al fet que en el cas del mutant, la unió dels protons considerats com a substrats té lloc en un sol costat de la membrana. Segurament es deu als dos efectes conjuntament, ja que l'anàlisi comparatiu de l'estructura secundària dels complexos $\text{H}^+/\text{R141C}$ i H^+/MelB (veure figura 4.16), revela diferències en les intensitats de les bandes corresponents a les estructures hèlixs α més no ordenades i també de les làmines β , que es poden relacionar amb un augment de l'accessibilitat al bescanvi H/D degut a una major contribució d'estructura no ordenada. Encara més, la comparació dels valors dels salts obtinguts de les cinètiques de bescanvi H/D dels complexos $\text{H}^+/\text{R141C}$ i H^+/MelB (Taula 5.I), indiquen que l'augment d'accessibilitat al solvent del mutant R141C es deu a estructures hèlixs α més no ordenades i a làmina- β , fet que coincideix amb les diferències observades a nivell d'estructura secundària.

Taula 5.I. Comparació del nivell de bescanvi H/D entre el moment inicial i als 630 min després d'iniciar-se el flux de D₂O de les estructures secundàries del mutant R141C i la MelB salvatge

Tipus d'estructura secundària	Valor del salt de nivell de bescanvi H/D (630 min)	
	MelB	R141C
Girs reversos	0.466 ± 0.006	0.432 ± 0.010
Hèlix α + no ordenda	0.239 ± 0.002	0.276 ± 0.002
Làmina β	1.673 ± 0.027	2.189 ± 0.122

En el transportador de lactosa (Lac Y) d'*Escherichia coli*, la neutralització de la càrrega positiva de l'Arg144 per una Cys situada en la interfase de l'hèlix V, és determinant per al reconeixement i translocació del substrat (Frillingos et al., 1997). S'ha suggerit que l'Arg144 i el Glu 126 (hèlix IV) formen un pont salí entre ells de manera que mantenen la posició de les hèlixs idònia per a la interacció amb el substrat (Kaback, 1997; Guan et al., 2002). Tot i que aquesta mutació no causa exactament el mateix efecte que la mutació R141C de la MelB, sí que hi ha un cert grau d'homologia en la ubicació i el funcionament. I per tant, molt possiblement l'abolició de la càrrega positiva de l'Arg 141 de la MelB fa perdre la interacció amb un Glu o Asp, resultant en un llaç 4-5 més mòbil i obert. La comparació dels resultats de les cinètiques de bescanvi H/D a nivell de làmina β de la MelB salvatge i el mutant R141C, ens diuen que aquesta estructura és molt més accessible en la proteïna mutant per a tots els complexos, menys pel complex H⁺/mel/R141C. Això, refermaria la predicció d'estructura secundària anterior, sobre un alt contingut d'estructura làmina β almenys en el llaç 4-5. El fet que el complex ternari H⁺/mel/R141C mostri l'estructura làmina β més protegida envers el bescanvi H/D que per la MelB salvatge, es podria explicar suposant que, existeixi alguna altra zona d'estructura β diferent del llaç 4-5 molt més protegida pel fet d'estar unida al catió H⁺ en comptes del Na⁺.

La ubicació d'aquest Glu o Asp interaccionant amb l'Arg141, només potser especulativa a hores d'ara, però tenint en compte el model proposat per Cordat et al. (2000) (veure figura 1.8) molt possiblement estaria localitzat en el llaç 10-11 el qual

és important per al reconeixement del sucre i s'ha suggerit que interacciona amb el llaç 4-5. Encara més, l'anàlisi comparatiu de la seqüència d'aminoàcids del llaç hipotètic 10-11 de la MelB d'*E.coli* amb seqüències homòlogues d'altres transportadors bacterians, ens revela que l'Asp365, l'Asp357, el Glu354 i el Glu351 es conserven en gairebé tots els transportadors analitzats (figura 5.1). Per dilucidar la qüestió de la ubicació del aminoàcid acídic que pot fer parella amb l'Arg141, es podrien construir dobles mutants de l'Arg 141 i algun d'aquests Glu o Asp mitjançant mutagènesis dirigida.

5. 4. Orientació de l'estructura de la MelB salvatge

L'estudi de l'orientació de proteïnes solubles i de membrana mitjançant ATR-FTIR és una tècnica bastant emprada degut al seu rendiment (Axelsen and Citra, 1996). Aquesta tècnica presenta moltes avantatges per la informació que se'n pot extreure i per la seva relativa senzillesa en la posta a punt experimental. Tot i així, és una tècnica marcadament complexa pels càlculs a realitzar en el seu anàlisi, ja que encara no existeix una teoria definitiva que englobi totes les variables experimentals (Goormaghtigh et al., 1999).

5. 4. 1. Consideracions sobre la preparació dels films de proteoliposomes

En primer lloc, cal tenir en compte que l'estat de la superfície de l'IRE determinarà la correcta preparació de la mostra. Per tant, s'ha de tenir molta cura alhora de preservar el seu estat i les seves propietats. L'IRE utilitzat en aquest treball, és un cristall de Ge, el qual és inherentment hidrofílic degut a l'oxidació espontània de la seva superfície. Aquesta característica dificulta la correcta extensió del film, ja que la mostra de proteoliposomes és essencialment hidrofòbica i per tal d'evitar aquest problema, s'ha tingut que netejar i assecar insistentment per tal de disminuir el seu caràcter hidrofílic. Tot i que existeixen tractaments per evitar-ho, com el tractament amb acil-silan, que també fa augmentar l'hidrofobicitat de la superfície del cristall (Axelsen et al., 1995), una neteja correcta presenta una alternativa viable (vegeu materials i mètodes, secció 3.5.1.1). Per altre banda, la neteja també ha de ser delicada perquè qualsevol irregularitat de la superfície pot

contribuir al desordre molecular (Axelsen and Citra, 1996; Goormaghtigh et al., 1999).

Així, una vegada tenim la superfície de Ge ben neta, l'altre pas determinant per al desenvolupament correcte de l'experiment, és l'obtenció d'un film orientat i gruixut (Goormaghtigh et al., 1999). L'obtenció de films orientats, és un pas relativament senzill perquè es dona espontàniament si s'estén correctament la mostra sobre el cristall de Ge (Fringeli and Günthard, 1981). Existeixen tres tipus de preparació de films per a la realització d'experiments de FTIR-ATR. En el primer tipus (figura 5.2A), s'estén sobre la superfície de l'IRE, una suspensió de vesícules de lípid en H_2O o bé de lípids dissolts en dissolvent orgànic, s'evapora el dissolvent i es formen multibicapes altament organitzades i orientades paral·lelament a la superfície de suport (Ludlam et al., 1996; Axelsen and Citra, 1996). A partir d'aquí les mostres es poden re-hidratar amb vapor de H_2O o D_2O . Aquest tipus de preparacions són avantatjoses per la seva fàcil preparació i la seva versatilitat. Tot i així, s'ha de tenir en compte que per tal que es formin les bicapes lipídiques s'ha de deshidratar la mostra durant la formació del film i això podria comportar com a conseqüència, que la interacció del polipèptid o proteïna i el lípid fos difícilment extrapolable a les condicions biològiques. A més, tampoc es pot assegurar que el polipèptid només interaccioni amb una sola bicapa o que hi hagi aigua suficient per que el polipèptid s'organitzi correctament (Axelsen and Citra et al., 1996). Un segon tipus de preparació (figura 5.2B), es basa en l'addició de miscel·les i/o vesícules en una superfície d'IRE hidrofílica que espontàniament es transformen en una sola bicapa per absorció (Axelsen and Citra et al., 1996). Aquest tipus de preparacions són senzilles de fer i eviten els problemes que es produeixen en els films multibicapa. Per altre banda, és difícil comprovar que la membrana que es forma en cada experiment, és una bicapa única, uniforme i contínua. Un tercer tipus de preparació, és l'addició d'una monocapa de fosfolípids (figura 5.2C). El grau de reproductibilitat dels films de mostra obtinguts en cada experiment és molt més alta que en els altres dos tipus de preparacions però no és un model vàlid per a proteïnes grans que necessitin incorporar-se a una bicapa (Axelsen and Citra, 1996).

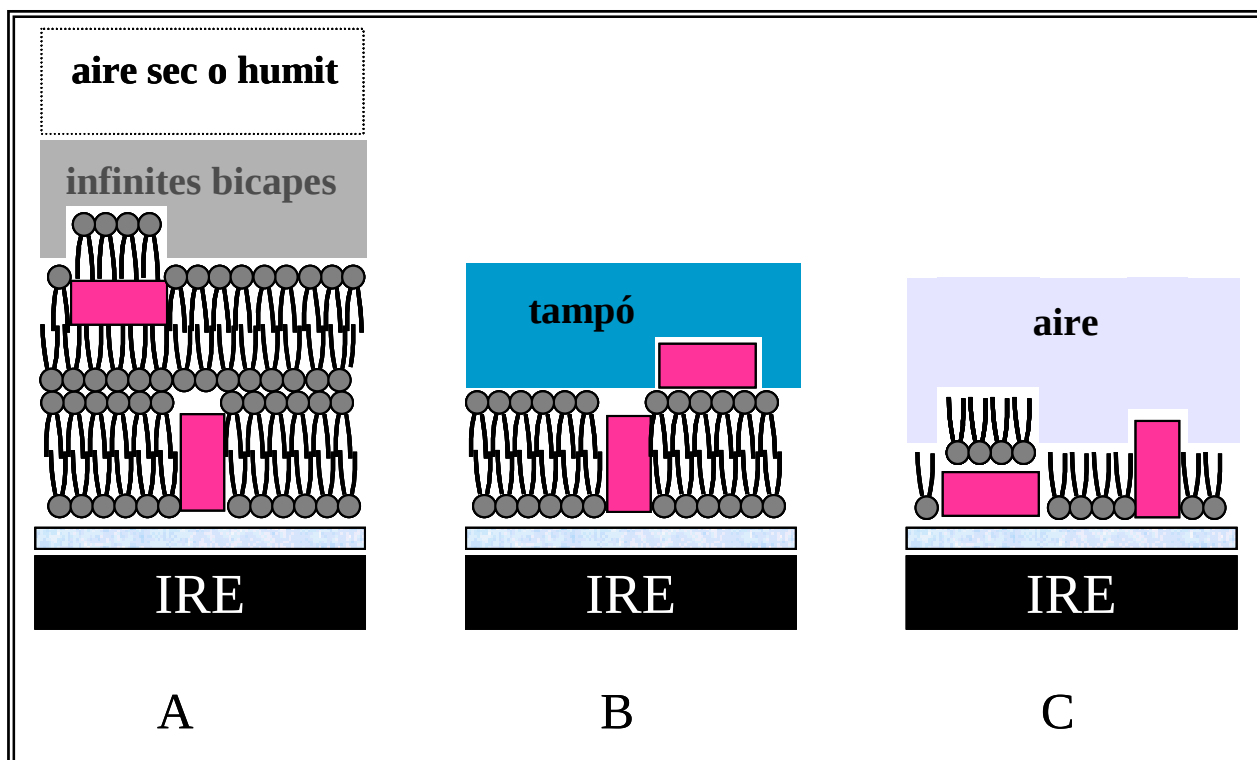


Figura 5.2. Esquema dels diferents tipus de films de proteoliposomes: multicapa (a), bicapa (b) i monocapa (c).

En aquest treball, els films s'han preparat segons el tipus multicapa (figura 5.2A). El problema principal d'aquest tipus de preparació s'evita en el nostre cas, ja que la nostra proteïna és massa gran perquè es posicioni incorrectament. Per exemple, no es podria situar en una sola monocapa tal com mostra la figura. A més, al ser hidrofòbica en un 70%, seria difícil que es disposés transversalment sobre els caps hidrofílics dels lípids. Per altre banda, els resultats indiquen que podem estar segurs que existeixen molècules d'aigua suficients en el film com perquè la MelB sigui funcional.

Un aspecte important sobre l'estat de la mostra que hem de saber clarament, és conèixer si estem treballant en condicions de film prim, intermedi o gruixut. Treballar amb films gruixuts (el gruix del film ha de ser més gran que la d_p o que la R^{ISO} sigui 1.93 en el nostre cas experimental) simplifica molt els càlculs, ja que la raó dicròica (R^{ATR}) i el paràmetre d'ordre (P_ϕ) no depenen de l'índex de refracció de la fase posterior a la mostra n_3 , és a dir, $n_2=n_3$ (vegeu mètodes experimentals, secció 3.

6. 2. 1. 1). Per altre banda, treballar amb films prim o intermedis, dificulta molt més el càlcul de P_ϕ , a més de comportar d'altres complicacions conceptuals (Citra and axelsen, 1996; Goormaghtigh et al., 1999). En un estudi realitzat per Axelsen and Citra (1996) sobre films monocapa de polímers hèlixs α de poli- γ -benzil-L-glutamat i poli- β -benzil-L-aspartat, trobaren que els resultats obtinguts mitjançant les equacions de film prim no tenien significat físic.

Els experiments de polarització del mutant R141C, s'han fet amb films de 0.30 a 0.45 μm de gruix en l'amida I, aproximadament. La d_p en la zona amida I és de 0.40 μm , i per tant, estem en condicions de film intermedi. El fet que s'hagin obtingut films de fins a 0.45 μm de gruix, i que no es puguin analitzar segons les expressions del film gruixut (Goormaghtigh et al., 1999), indica que el gruix del film ha de superar en més de 0.05 μm la d_p . Com que aquests càlculs sobre el gruix del film són aproximats, en última instància la comprovació definitiva de si estem treballant amb un film prim/intermedi o gruixut, és el càlcul de la R^{ISO} . Pel fet de no haver pogut formar un film gruixut, no s'ha volgut aprofundir en l'estudi de l'orientació del mutant R141C, ni en el càlcul de l'angle de les seves estructures. Amb tot, es podrien realitzar algunes correccions a les expressions matemàtiques de les condicions de film prim per tal d'obtenir el P_ϕ del mutant, però s'haurien de comprovar amb almenys algun experiment del R141C en film gruixut. Encara que no tinguem els P_ϕ del R141C però, els espectres dicroics del mutant R141C mostren l'amida I i l'amida II orientades. La desconvolució de l'espectre dicroic del complex $\text{H}^+/\text{R141C}$ revela un màxim molt intens a 1662 cm^{-1} i una espatlla molt poc intensa a 1651 cm^{-1} corresponent majoritàriament a estructures hèlixs α (no mostrat). Comparant amb l'estructura secundària sense polaritzar (figura 4.16), trobem que la banda a 1651 cm^{-1} està molt poc orientada. Per altre banda, si comparem amb l'espectre dicroic de la MelB en H_2O (figura 4.30) observem que el primer màxim a 1662 cm^{-1} coincideix amb la MelB salvatge, tot i que és molt menys intens, però no passa el mateix amb la intensitat i la posició del segon a 1651 cm^{-1} . Encara més, la comparació de l'estructura secundària sense polaritzar del mutant R141C i la MelB salvatge, tampoc presenta diferències en la posició i intensitat de la banda a 1662 cm^{-1} però sí que n'hi ha amb les bandes a 1653 i 1644 cm^{-1} . Tots aquests resultats, indicarien que les diferències d'estructura secundària entre la MelB salvatge i el mutant R141C són

bàsicament degudes a un tipus d'hèlixs α (a 1653 cm^{-1}) i a la major contribució d'altres estructures (possiblement, estructures no ordenades, a 1653 i 1644 cm^{-1}) del mutant R141C.

5. 4. 2. Orientació dels segments transmembrana de la MelB

Els resultats dels experiments d'orientació de la MelB en H_2O i en D_2O indiquen que el paràmetre d'ordre de l'estructura de la proteïna ve determinat essencialment per l'orientació de les hèlixs α transmembrana, que representen el 50% de l'estructura secundària de la MelB. Això es conclou perquè la correcció del $p_{1/2}$ aplicada a l'amida I i I', dóna el mateix valor que l'obtingut per l'amida A⁽¹⁾. L'angle β que formen les hèlixs α amb la perpendicular al pla de les bicapes lipídiques corresponent al complex binari H^+/MelB és de 26° . Comparant amb altres proteïnes de membrana, trobem que tant el complex H^+/LacY com el canal de K^+ tetramèric de *Streptomyces lividans* mostren un angle de $\beta=33^\circ$ (le Coutre et al., 1997; le Coutre et al., 1998). En canvi, el transportador EmrE té un valor similar a l'obtingut per la MelB, 27° (Arkin et al., 1996). Per altra banda, La MelB també ha mostrat modificació de l'orientació de les hèlixs α a causa de la unió amb diferents substrats, cosa que no s'ha detectat pel transportador LacY (le Coutre et al., 1997). En canvi, el transportador $\text{Na}^+/\text{galactosa}$ de *Vibrio parahaemolyticus* augmenta l'orientació de la seva estructura (disminueix l'angle entre l'estructura i la normal de la membrana) degut a la unió de Na^+ (le Coutre et al., 2002), contrastant amb la disminució de l'orientació del complex Na^+/MelB .

Els espectre de dicroïsme desconvulats en H_2O i en D_2O , indiquen que l'angle β és el resultat de les orientacions dels dos tipus d'hèlixs α suficientment diferents com per mostrar dues bandes intenses i ben resoltes a 1662 (tipus I) i 1653 cm^{-1} (tipus II),. La figura 5.3 mostra un model d'orientació de les hèlixs α en diferents condicions de substrats, que resumeix els resultats obtinguts a l'apartat 4.6 de resultats i discussió (taula 4.IV, taula 4.V i figura 4.29). Cada grup d'hèlixs α , canvia la seva orientació de forma diferent depenent del substrat que s'hi uneix. En primer lloc, independentment del grau d'orientació de cada grup d'hèlixs α quan la melibiosa

⁽¹⁾ La correcció del $p_{1/2}$ suposa que el 50% de la proteïna, corresponent als segments transmembrana, està orientada (veure apartat 4.6.3).

s'uneix a la proteïna, les hèlixs α tipus II estan més protegides envers el bescanvi H/D que les tipus I. En canvi, la incubació amb Na^+ o H^+ comporta una major protecció de les tipus I. La comparació d'aquests resultats amb els obtinguts en la cinètica de bescanvi H/D de les hèlixs α (secció 4.4), on la condició $\text{H}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ mostra més protecció envers el bescanvi H/D, ens suggereix que la protecció d'aquesta estructura depèn en gran part de les hèlixs α tipus II. Tot i que el bescanvi H/D de les hèlixs α del complex $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ aparentment no reflecteixi el mateix comportament, es podria explicar pel fet que encara que les tipus II estiguin més protegides, la resta de segments transmembrana s'hagin desprotegit més i per tant el bescanvi H/D resultant es mantingui. En qualsevol cas, el seguiment del bescanvi H/D de les estructures orientades (Vigano et al., 2000) ens ajudarien a dilucidar aquesta incertesa.

En segon lloc, la figura 5.3 ens manifesta un comportament similar de les hèlixs α de tipus I i tipus II en presència de Na^+ o H^+ , i de la mateixa manera passa amb el complex terciari $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$. És a dir, els tres estats mostren més orientació de les hèlixs tipus I. Tot i així, el complex H^+/MelB presenta més orientació de les hèlixs α tipus II que el Na^+/MelB . Aquesta diferència d'orientacions de les hèlixs quan la MelB està incubada amb Na^+ o H^+ constata que no hi ha relació entre el grau d'accessibilitat al solvent aquós i l'orientació dels segments transmembrana de la proteïna. Per altre banda, quan adicionem sucre a l'estat H^+/MelB es redistribueix l'orientació de les hèlixs α , invertint-se l'ordre d'orientacions, donant un angle β molt similar entre ells. En canvi, quan s'incuba melibiosa al complex Na^+/MelB les hèlixs α tipus I segueixen igual d'orientades i les tipus II s'orienten més, resultant en un angle d'orientació global, β intermedi entre els complexes amb protó i/o melibiosa i el que conté sodi. És a dir, la distribució d'orientacions dels tipus I i II de les hèlixs α de la MelB amb melibiosa, és justament contrària depenent del tipus de catió.

Aquest model d'orientacions de les hèlixs α , ens suggereix que el mecanisme de transport de la MelB és diferent depenent del catió que s'hi uneix. Ambdós cations s'uneixen al costat N-terminal, concretament als aminoàcids Asp de la cara citoplasmàtica i hidrofílica de les hèlixs α (figura 5.4) i el sucre s'uneix al costat C-terminal amb cooperació del costat N-terminal (Cordat et al., 2000). Un possible model de transport que explicaria aquesta diferència d'orientacions de les hèlixs

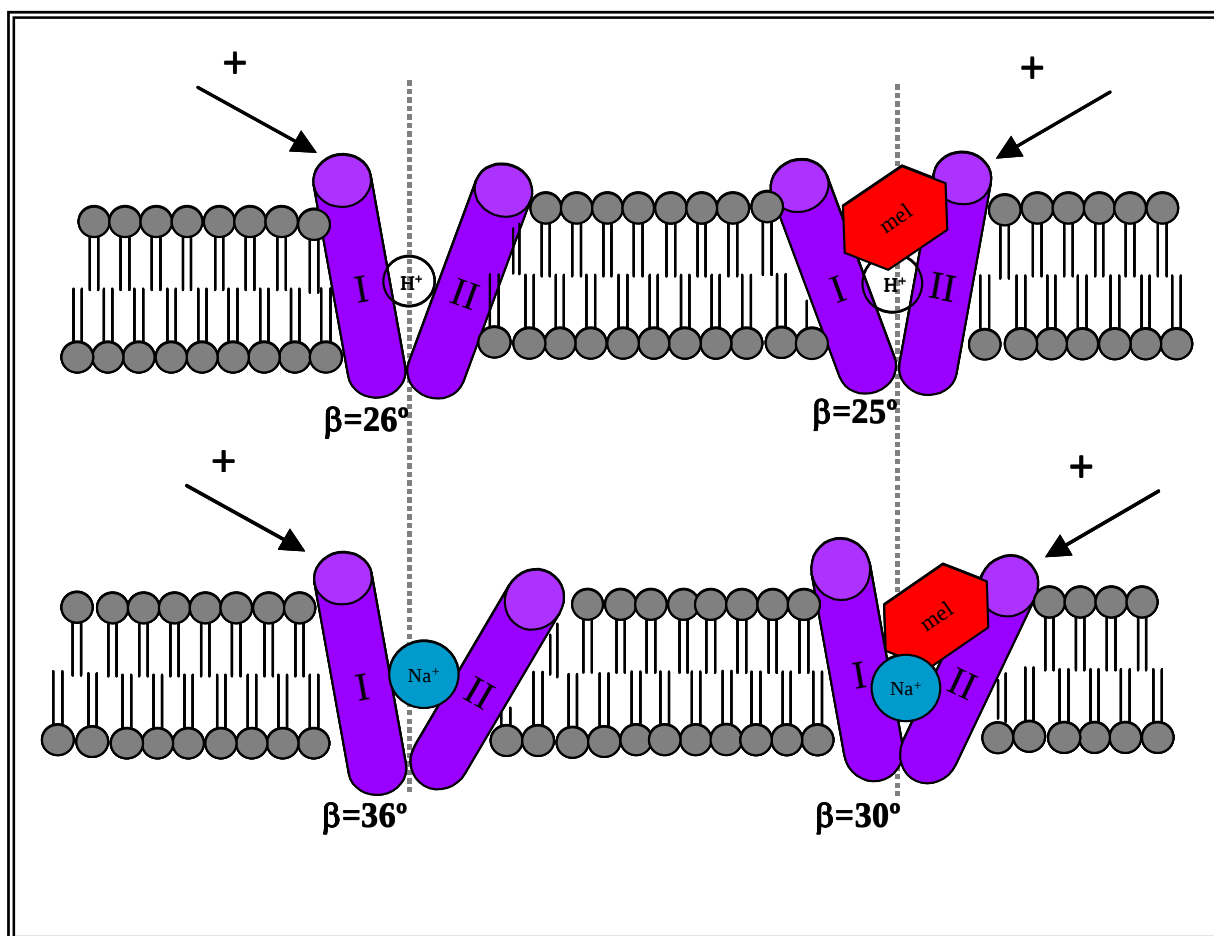


Figura 5.3. Model de les orientacions de les hèlixs α tipus I i II de la MelB en diferents condicions de substrats. ($\rightarrow^+$) Indica una major protecció del tipus d'hèlix indicat en comparació amb l'altra. Per tal de simplificar l'esquema només s'han representat les hèlixs obertes cap a un costat de la bicapa, però en la realitat caldria parlar d'una barreja d'orientacions cap a dins i cap a fora. El càlcul de l'orientació de cada grup d'hèlixs, s'ha obtingut de la relació $\alpha \cdot \varepsilon C_1 \cdot I = \alpha \cdot \varepsilon C_2 \cdot p_\phi$ entre l'absorció de les bandes sense polaritzar i les polaritzades, respectivament.

seria que quan s'uneix el Na^+ (el qual té més afinitat per la proteïna que el H^+), fa que s'ajuntin més la part terminal de les hèlixs per on ha interaccionat el catió. És a dir, la part citoplasmàtica de les hèlixs s'ajunten més, i al mateix temps les de la part periplasmàtica es separen, donant lloc a una disminució de l'orientació dels segments transmembrana i deixant més accessible el lloc d'unió del sucre (figura 5.3). El H^+ actuaria de la mateixa manera que el Na^+ , però com que té menys afinitat per la MelB, resultaria en unes hèlixs α menys separades per la part periplasmàtica i com a conseqüència deixaria menys al descobert el lloc d'unió del sucre. La interacció del sucre al costat C-terminal de la proteïna quan aquesta està incubada

amb Na^+ resultaria en un augment de l'orientació d'unes hèlixs, que correspondrien a les tipus II. La unió dels sucre al complex H^+/MelB també comporta un augment de les hèlixs tipus II, cosa que ens suggereix que les hèlixs tipus II corresponen en gran part als segments transmembrana del costat C-terminal.

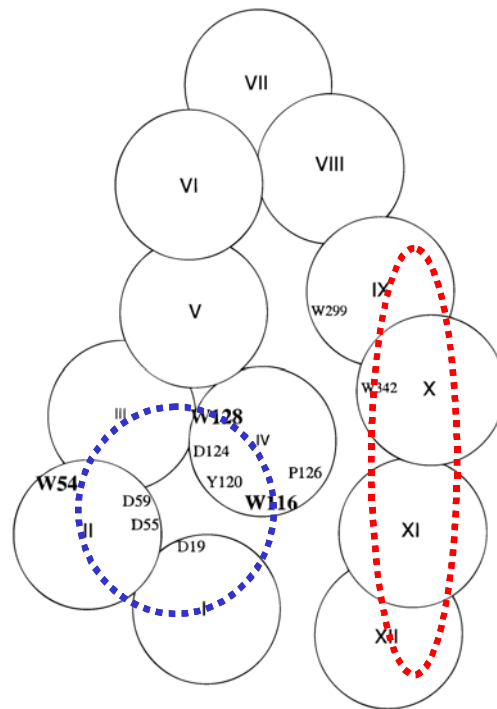


Figura 5.4. Model bidimensional de disposició de les hèlixs α de la MelB proposat per Cordat et al. (2000). El cercle vermell ubica les hèlixs del costat C-terminal i el cercle blau, les del costat N-terminal.

Cal tenir en compte que l'angle β de les hèlixs α de la MelB reflexa la mitja de les orientacions que tenim quan la MelB està transportant. És a dir, quan uneix substrats a una cara i l'altre de la membrana i quan els transloca. Així, l'estudi de l'orientació del mutant R141C ens aclariria l'orientació de les hèlixs α en l'estat en què s'hi uneixen els substrats, sense que hi contribueixi el procés de translocació. També, seria molt interessant arribar a calcular l'angle β de cada grup d'hèlixs α , tot i que és complex, ja que el càlcul de la raó dicroica de cada banda s'ha de fer

calculant l'àrea de cada banda a l'espectre $\parallel$ i $\perp$, la qual tindrà condicions d'hèlix α , estructures no ordenades i de girs reversos no orientats.

Tot i que obtenir l'estructura tridimensional de la MelB és un pas essencial per al coneixement total de la seva estructura molecular, s'ha pogut comprovar al llarg d'aquest treball, que les tècniques de bescanvi H/D i de polarització per espectroscòpia ATR-FTIR, són capaces de subministrar-nos informació sobre la identitat de les estructures que sofreixen canvis conformationals durant el seu funcionament. La majoria d'aquest canvis involucren un nombre limitat d'aminoàcids, que tot i així són detectats per espectroscòpia FTIR. La posterior caracterització del diferents estats de transport, mitjançant l'aplicació d'aquestes tècniques i la seva combinació sobre la MelB salvatge i el mutant R141C, ens donaran més informació quantitativa i qualitativa sobre el procés d'unió i translocació d'aquest transportador de membrana.

6. Conclusions

1. L'estructura secundària de la MelB està dominada per components hèlixs α en un 50%, un 20 % d'estructura làmina β i un 30% assignat a girs reversos, hèlixs 3_{10} i estructures no ordenades. En condicions de funcionalitat, les hèlixs α es distribueixen en dos tipus en la regió de $1660\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, que és on típicament absorbeixen aquest tipus d'estructura en proteïnes transmembrana. En canvi, en condicions no funcionals només mostra una sola banda.
2. L'estructura secundària de la MelB sofreix canvis conformacionals deguts a la unió dels substrats. Aquests canvis conformacionals es manifesten sobretot en les dues bandes assignades a hèlixs α , a 1660 i 1653 cm^{-1} .
3. La MelB mostra un 60% d'accessibilitat al solvent aquós si es corregeix la contribució de les cadenes laterals, les quals representen un 20% d'accessibilitat.
4. L'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D de la amida II de la MelB ens demostra que la incubació del sucre melibiosa incrementa la compactació de la proteïna al solvent aquós en un 8% en presència de H^+ i en un 5% en presència de Na^+ .
5. L'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D de l'amida I de la MelB revela clarament que els substrats afecten les estructures làmina β , essent el complex $\text{H}^+/\text{mel}/\text{MelB}$ l'estat més protegit envers el bescanvi H/D i seguit del complex $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{MelB}$. També s'ha detectat canvis a nivell d'estructures hèlixs α més estructures no ordenades encara que de menor magnitud. Per altre banda no s'han observat canvis per l'addició de substrats en els girs reversos. L'augment de compactació induït per la unió de sucre pot incloure els llaços citoplasmàtics 4-5 i 10-11.
6. La neutralització de la càrrega positiva a la posició 141 de la proteïna sense substrats addicionats (mutant R141C), resulta en una disminució del 10% de la compactació de la proteïna envers el bescanvi H/D comparat amb H^+/MelB salvatge.

Encara més, el mutant R141C és menys compacte que la MelB salvatge en totes les diferents condicions de substrats.

7. De la mateixa manera que per la MelB salvatge, l'anàlisi del bescanvi H/D de l'amida II del mutant R141C mostra diferències de compactació al solvent aquós degut a la unió de substrats, essent en aquest cas l'estat menys accessible el $\text{Na}^+/\text{mel}/\text{R141C}$, seguit del $\text{H}^+/\text{mel}/\text{R141C}$. És a dir, la unió del sucre augmenta la compactació de l'estructura del mutant R141C igual que passava amb la MelB salvatge.

8. L'anàlisi de la cinètica de bescanvi H/D de l'amida I del mutant R141C revela diferències d'accessibilitat al solvent aquós per a cada component de l'estructura secundària del mutant R141C. És a dir, l'addició de melibiosa segueix protegint les estructures làmina β envers el bescanvi H/D, igual que per la MelB salvatge. En canvi, disminueix la protecció dels girs reversos i les estructures hèlixs α més estructures no ordenades, en comparació amb la resta de condicions de substrats.

9. L'anàlisi de l'estructura secundària del mutant R141C mostra diferències en la intensitat i el número d'ona de la banda a 1653 cm^{-1} de l'estructura hèlix α més estructura no ordenada, com també en les làmines β , respecte a la MelB salvatge. Aquest fet coincideix amb què aquestes mateixes estructures són els components d'estructura secundària més accessibles al bescanvi H/D en el mutant R141C que en la MelB salvatge.

10. L'anàlisi dels espectres de dicroïsmes indiquen que tant la MelB salvatge com el mutant R141C mostren orientació de les estructures secundàries. El paràmetre d'ordre de les bandes amida I, I' i A són coincidents. Així, podem dir que l'estructura secundària orientada responsable en la MelB salvatge són les hèlixs α situades en els segments transmembrana de la proteïna.

11. La MelB en presència només de protons (H^+ /MelB), o amb melibiosa afegida (H^+ /mel/MelB), mostra una orientació de 25-26° de les hèlixs α . En presència de Na^+ hi ha una disminució de l'orientació, obtenint-se per Na^+ /MelB un angle de 36° i per Na^+ /mel/MelB un angle de 30°.

12. El valor de l'orientació global de la MelB, que és l'angle β , és el resultat de dos tipus d'orientacions diferents de les hèlixs α , la tipus I (1662 cm^{-1}) i la tipus II (1653 cm^{-1}). Aquest dos tipus d'hèlixs α s'orienten de forma diferent depenent del substrat addicionat. Independentment de l'orientació de les hèlixs α tipus I i II de la MelB, l'addició de melibiosa confereix més protecció envers el bescanvi H/D de les tipus II. És a dir, la protecció envers el solvent aquós és independent de l'orientació dels segments transmembrana i ve determinat per l'acció del sucre.

7. Bibliografia

A

- Abdel dayem, M., Basquin, C., Pourcher, T., Cordat, E., Leblanc, G. (2003) Cytoplasmic loop connecting helices IV and V of the melibiose permease from *Escherichia coli* is involved in the process of Na(+)-coupled sugar translocation. *J Biol Chem*, **278**, 1518-1524.
- Alvarez, J., Lee, D.C., Baldwin, S.A. and Chapman, D. (1987) Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter. *J Biol Chem*, **262**, 3502-3509.
- Ambroise, Y., Leblanc, G. and Rousseau, B. (2000) Active-site-directed photolabeling of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **39**, 1338-1345.
- Arkin, I.T., Russ, W.P., Lebendiker, M. and Schuldiner, S. (1996) Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle. *Biochemistry*, **35**, 7233-7238.
- Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J. and Goni, F.M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, **59**, 23-56.
- Axelsen, P.H., Kaufman, B.K., McElhaney, R.N. and Lewis, R.N. (1995) The infrared dichroism of transmembrane helical polypeptides. *Biophys J*, **69**, 2770-2781.
- Axelsen, P.H. and Citra, M.J. (1996) Orientational order determination by internal reflection infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, **66**, 227-253.

B

- Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L. and Englander, S.W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins*, **17**, 75-86.
- Bassilana, M., Damiano-Forano, E. and Leblanc, G. (1985) Effect of membrane potential on the kinetic parameters of the Na⁺ or H⁺ melibiose symport in Escherichia coli membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, **129**, 626-631.
- Bassilana, M., Pourcher, T. and Leblanc, G. (1987) Facilitated diffusion properties of melibiose permease in Escherichia coli membrane vesicles. Release of co-substrates is rate limiting for permease cycling. *J Biol Chem*, **262**, 16865-16870.
- Bassilana, M., Pourcher, T. and Leblanc, G. (1988) Melibiose permease of Escherichia coli. Characteristics of co-substrates release during facilitated diffusion reactions. *J Biol Chem*, **263**, 9663-9667.
- Bechinger, B., Ruysschaert, J.M. and Goormaghtigh, E. (1999) Membrane helix orientation from linear dichroism of infrared attenuated total reflection spectra. *Biophys J*, **76**, 552-563.
- Blow, D.M., Birktoft, J.J. and Hartley, B.S. (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, **221**, 337-340.
- Behr, J. P., Lehn, J. M., Dock, A. C. and Moras, D. (1982) Crystal structure of polyfunctional macrocyclic K⁺ complex provides a solid state model of K⁺ channel. *Nature*, **295**, 526-527.
- Botfield, M.C. and Wilson, T.H. (1988) Mutations that simultaneously alter both sugar and cation specificity in the melibiose carrier of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **263**, 12909-12915.

Botfield, M.C. and Wilson, T.H. (1989) Carboxyl-terminal truncations of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **264**, 11643-11648.

Botfield, M.C. and Wilson, T.H. (1989) Peptide-specific antibody for the melibiose carrier of *Escherichia coli* localizes the carboxyl terminus to the cytoplasmic face of the membrane. *J Biol Chem*, **264**, 11649-11652.

Botfield, M.C., Wilson, D.M. and Wilson, T.H. (1990) The melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **141**, 328-331.

Botfield, M.C., Naguchi, K., Tsuchiya, T. and Wilson, T.H. (1992) Membrane topology of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267**, 1818-1822.

Brandolin, G., Doussiere, J., Gulik, A., Gulik-Krzywicki, T., Lauquin, G.J. and Vignais, P.V. (1980) Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **592**, 592-614.

Brooker, R. J. (1990) The lactose permease of *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **141**, 309-315.

Byler, D.M. and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **25**, 469-487.

C

Cabiaux, V., Oberg, K.A., Pancoska, P., Walz, T., Agre, P. and Engel, A. (1997) Secondary structures comparison of aquaporin-1 and bacteriorhodopsin: a Fourier transform infrared spectroscopy study of two-dimensional membrane crystals. *Biophys J*, **73**, 406-417.

- Chin, J.J., Jung, E.K.J. and Jung, C.Y. (1986) Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted vesicles. *J Biol Chem*, **261**, 7101-7104.
- Chirgadze, Y.N., Fedorov, O.V. and Trushina, N.P. (1975) Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers*, **14**, 679-694.
- Citra, M.J. and Axelsen, P.H. (1996) Determination of molecular order in supported lipid membranes by internal reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys J*, **71**, 1796-1805.
- Cladera, J., Sabes, M. and Padros, E. (1992) Fourier transform infrared analysis of bacteriorhodopsin secondary structure. *Biochemistry*, **31**, 12363-12368.
- Clark, A.H., Saunderson, D.H.P. and Suggett, A. (1981) Infrared and laser Raman spectroscopic studies of thermally induced globular protein gels. *Int J Pept Protein Res*, **17**, 353-364.
- Clarke, J., Itzhaki, L.S. and Fersht, A.R. (1997) Hydrogen exchange at equilibrium: a short cut for analysing protein-folding pathways? *Trends Biochem Sci*, **22**, 284-287.
- Clarke, J. and Itzhaki, L.S. (1998) Hydrogen exchange and protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 112-118.
- Cohn, D.E. and Kaback, H.R. (1980) Mechanism of the melibiose porter in membrane vesicles of Escherichia coli. *Biochemistry*, **19**, 4237-4243.
- Cordat, E., Mus-Veteau, I. and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of Escherichia coli by fluorescence resonance energy transfer. II.

Identification of the tryptophan residues acting as energy donors. *J Biol Chem*, **273**, 33198-33202.

Cordat, E., Leblanc, G. and Mus-Veteau, I. (2000) Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of Escherichia coli melibiose permease. *Biochemistry*, **39**, 4493-4499.

Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. and Rosenbusch, J.P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*, **358**, 727-733.

Craig, I.J.D. and Brown, J.C. (1986) In inverse problems in astronomy. A guide to inversion strategies for remotely sensed data. (Hilger A., Ed), Adam Hilger LTD, Bristol., Chap 6.

D

Damiano-Forano, E., Bassilana, M. and Leblanc, G. (1986) Sugar binding properties of the melibiose permease in Escherichia coli membrane vesicles. Effects of Na⁺ and H⁺ concentrations. *J Biol Chem*, **261**, 6893-6899.

Dave, N., Troullier, A., Mus-Veteau, I., Dunach, M., Leblanc, G. and Padros, E. (2000) Secondary structure components and properties of the melibiose permease from Escherichia coli: a fourier transform infrared spectroscopy analysis. *Biophys J*, **79**, 747-755.

Dave, N. (2001) Estudis de fluorescència del transportador de melibiosa d'*Escherichia coli*.

Dave, N., Lorenz-Fonfria, V.A., Villaverde, J., Lemonnier, R., Leblanc, G. and Padros, E. (2002) Study of amide-proton exchange of Escherichia coli melibiose permease by attenuated total reflection-Fourier transform infrared

- spectroscopy: evidence of structure modulation by substrate binding. *J Biol Chem*, **277**, 3380-3387.
- de Jongh, H.H., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (1996) The different molar absorptivities of the secondary structure types in the amide I region: an attenuated total reflection infrared study on globular proteins. *Anal Biochem*, **242**, 95-103.
- de Jongh, H.H., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (1997) Amide-proton exchange of water-soluble proteins of different structural classes studied at the submolecular level by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **36**, 13603-13610.
- de Jongh, H.H., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (1997) Monitoring structural stability of trypsin inhibitor at the submolecular level by amide-proton exchange using Fourier transform infrared spectroscopy: a test case for more general application. *Biochemistry*, **36**, 13593-13602.
- de Noyer, L.K. and Dodd, J.G. (1991) Maximum likelihood restoration of noisy data. *Am Lab*, **23**, D24.
- Dempsey, C.E. and Butler, G.S. (1992) Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis in situ. *Biochemistry*, **31**, 11973-11977.
- Ding, P.Z., Botfield, M.C. and Wilson, T.H. (2000) Sugar recognition mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*: possible structural information concerning the arrangement of membrane-bound helices and sugar/cation recognition site. *Biochim Biophys Acta*, **1509**, 123-130.
- Ding, P.Z. and Wilson, T.H. (2000) The melibiose carrier of *Escherichia coli*: cysteine substitutions for individual residues in helix XI. *J Membr Biol*, **174**, 135-140.

- Ding, P.Z. and Wilson, T.H. (2000) Physiological evidence for an interaction between helix XI and helices I, II, and V in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 409-413.
- Ding, P.Z., Weissborn, A.C. and Wilson, T.H. (2001) Cysteine substitutions for individual residues in helix VI of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Membr Biol*, **183**, 33-38.
- Ding, P.Z. and Wilson, T.H. (2001) Cysteine mutagenesis of the amino acid residues of transmembrane helix I in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **40**, 5506-5510.
- Ding, P.Z. and Wilson, T.H. (2001) The effect of modifications of the charged residues in the transmembrane helices on the transport activity of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 348-354.
- Ding, P.Z. and Wilson, T.H. (2001) The proximity between helix I and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli* as determined by cross-linking. *Biochim Biophys Acta*, **1514**, 230-238.
- Ding, F.-X., Xie, H., Arshava, B., Becker, J.M. and Naider, F. (2001) ATR-FTIR study of the structure and orientation of transmembrane domains of the *Sacharomyces cerevisiae* α -mating factor receptor in phospholipids. *Biochemistry*, **40**, 8945-8954.
- Dong, A., Malecki, J.M., Lee, L., Carpenter, J.F. and Lee, J.C. (2002) Ligand-induced conformational and structural dynamics changes in *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Biochemistry*, **41**, 6660-6667.

Downer, N.W., Bruchman, T.J. and Hazzard, J.H. (1986) Infrared spectroscopic study of photoreceptor membrane and purple membrane. Protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange. *J Biol Chem*, **261**, 3640-3647.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and Mackinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 730-732.

Dumas, F., Tocanne, J.F., Leblanc, G. and Lebrun, M.C. (2000) Consequences of hydrophobic mismatch between lipids and melibiose permease on melibiose transport. *Biochemistry*, **39**, 4846-4854.

E

Englander, S.W., Sosnick, T.R., Englander, J.J. and Mayne, L. (1996) Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 18-23.

F

Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O., Gerlach, D., Welfe, H. (1992) Secondary structure of streptokinase in aqueous solution: a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry*, **31**, 6532-6538.

Franco, P.J. and Wilson, T.H. (1999) Arg-52 in the melibiose carrier of *Escherichia coli* is important for cation-coupled sugar transport and participates in an intrahelical salt bridge. *J Bacteriol*, **181**, 6377-6386.

Franco, P.J., Jena, A.B. and Wilson, T.H. (2001) Physiological evidence for an interaction between helices II and XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1510**, 231-242.

Frillingos, S., Gonzalez, A. and Kaback, H.R. (1997) Cysteine-scanning mutagenesis of helix IV and the adjoining loops in the lactose permease of *Escherichia coli*: Glu126 and Arg144 are essential. *Biochemistry*, **36**, 14284-14290.

Fringeli, U.P. and Gunthard, H.H. (1981) Infrared membrane spectroscopy. *Mol Biol Biochem Biophys*, **31**, 270-332.

G

Ganea, C., Pourcher, T., Leblanc, G. and Fendler, K. (2001) Evidence for intraprotein charge transfer during the transport activity of the melibiose permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **40**, 13744-13752.

Glusker, J.P. (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chem*, **42**, 1-76.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.M. (1994a) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell Biochem*, **23**, 329-362.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.M. (1994b) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. *Subcell Biochem*, **23**, 363-403.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.M. (1994c) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem*, **23**, 405-450.

Goormaghtigh, E., Raussens, V. and Ruyschaert, J.M. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1422**, 105-185.

Gregory, R.B. and Lumry, R. (1985) Hydrogen-exchange evidence for distinct structural classes in globular proteins. *Biopolymers*, **24**, 301-326.

- Gregory, R.B. and Rosenberg, A. (1986) Protein conformational dynamics measured by hydrogen isotope exchange techniques. *Methods Enzymol*, **131**, 448-508.
- Griffiths, B.R. and Haseth, J.A. (1986) Fourier transform infrared spectroscopy. *Ed. Jon Wiley and sons*.
- Grimard, V., Vigano, C., Margolles, A., Wattiez, R., van Veen, H.W., Konings, W.N., Ruysschaert, J.M. and Goormaghtigh, E. (2001) Structure and dynamics of the membrane-embedded domain of LmrA investigated by coupling polarized ATR-FTIR spectroscopy and (1)H/(2)H exchange. *Biochemistry*, **40**, 11876-11886.
- Guan, L., Sahin-Toth, M. and Kaback, H.R. (2002) Changing the lactose permease of *Escherichia coli* into a galactose-specific symporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6613-6618.
- Gwizdek, C., Leblanc, G. and Bassilana, M. (1997) Proteolytic mapping and substrate protection of the *Escherichia coli* melibiose permease. *Biochemistry*, **36**, 8522-8529.

H

- Hacksell, I., Rigaud, J.L., Purhonen, P., Pourcher, T., Hebert, H. and Leblanc, G. (2002) Projection structure at 8 Å resolution of the melibiose permease, an Na-sugar co-transporter from *Escherichia coli*. *Embo J*, **21**, 3569-3574.
- Hama, H. and Wilson, T.H. (1993) Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The amino-terminal portion is crucial for Na⁺ recognition in melibiose transport. *J Biol Chem*, **268**, 10060-10065.
- Hama, H. and Wilson, T.H. (1994) Replacement of alanine 58 by asparagine enables the melibiose carrier of *Klebsiella pneumoniae* to couple sugar transport to Na⁺. *J Biol Chem*, **269**, 1063-1067.

Henderson, P.J. and Maiden, M.C. (1990) Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **326**, 391-410.

Henderson PJ, Roberts PE, Martin GE, Seamon KB, Walmsley AR, Rutherford NG, Varela MF, Griffith JK. (1993) Homologous sugar-transport proteins in microbes and man. *Biochem Soc Trans*, **21**, 1002-1006.

Holloway, P.W., Mantsch, H.H. (1989) Structure of cytochrome b5 in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **28**, 931-935.

Hübner, W. and Mantsch, H.H. (1991) Orientation of specifically $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phosphatidylcholine multilayers from polarized attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. *Biophys J*, **59**, 1261-1272.

Huvidt, A. And Nielsen, S.O. (1966) Hydrogen exchange in proteins. *Advan Prot Chem*, **21**, 287-386.

J

Jackson, M. and Mantsch, H.H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **30**, 95-120.

Jolliet-Riant, P. and Tillement, J.P. (1999) Mechanisms of nutrient and drug transfer through the blood-brain barrier and their pharmacological changes. *Encephale*, **25**, 135-145.

Jursky, F. and Nelson, N. (1999) Developmental expression of the neurotransmitter transporter NTT4. *J Neurosci Res*, **55**, 24-35.

K

- Kaback, H.R. (1997) A molecular mechanism for energy coupling in a membrane transport protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 5539-5543.
- Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J., Mantsch, H.H. and Cameron, D.G. (1981) Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl. Spectrosc.*, **35**, 271-276.
- Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J., Mantsch, H.H. and Cameron, D.G. (1981) Fourier transforms in the computation self-deconvolved and first-order derivative spectra of overlapped band contours. *Anal Chem*, **53**, 1454-1457.
- Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J., Cameron, D.G. and Mantsch, H.H. (1981) noise in Fourier self-deconvolution. *Appl Opt*, **20**, 1866-1879.
- Kawakami, T., Akizawa, Y., Ishikawa, T., Shimamoto, T., Tsuda, M. and Tsuchiya, T. (1988) Amino acid substitutions and alteration in cation specificity in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **263**, 14276-14280.
- Klepper, J., Wang, D., Fischbarg, J., Vera, J.C., Jarjour, I.T., O'Driscoll, K.R. and De Vivo, D.C. (1999) Defective glucose transport across brain tissue barriers: a newly recognized neurological syndrome. *Neurochem Res*, **24**, 587-594.
- Knox, D.G. and Rosenberg, A. (1980) Fluctuations of protein structure as expressed in the distribution of hydrogen exchange rate constants. *Biopolymers*, **19**, 1049-1068.
- Krimm, S. and Dwivedi, A.M. (1982) Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism. *Science*, **216**, 407-408.

L

- Lacapere, J.J., Stokes, D.L., Mosser, G., Ranck, J.L., Leblanc, G. and Rigaud, J.L. (1997) Two-dimensional crystal formation from solubilized membrane proteins using Bio-Beads to remove detergent. *Ann N Y Acad Sci*, **834**, 9-18.
- Lafrance, C.P., Blochet, J.E. and Pezolet, M. (1997) N-acylphosphatidylethanolamines: effect of the N-acyl chain length on its orientation. *Biophys J*, **72**, 2559-2568.
- Lambert, O., Moeck, G.S., Levy, D., Plancon, L., Letellier, L. and Rigaud, J.L. (1999) An 8-A projected structure of FhuA, A "ligand-gated" channel of Escherichia coli outer membrane. *J Struct Biol*, **126**, 144-155.
- le Coutre, J., Narasimhan, L.R., Patel, C.K. and Kaback, H.R. (1997) The lipid bilayer determines helical tilt angle and function in lactose permease of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10167-10171.
- le Coutre, J., Kaback, H.R., Patel, C.K., Heginbotham, L. and Miller, C. (1998) Fourier transform infrared spectroscopy reveals a rigid alpha-helical assembly for the tetrameric Streptomyces lividans K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6114-6117.
- le Coutre, J., Turk, E., Kaback, H.R. and Wright, E.M. (2002) Ligand-induced differences in secondary structure of the Vibrio parahaemolyticus Na⁺/galactose cotransporter. *Biochemistry*, **41**, 8082-8086.
- Leblanc, G., Pourcher, T. and Bassilana, M. (1989) Molecular biology and bacterial secondary transporters. *Biochimie*, **71**, 969-979.
- Lorenz, V.A., Villaverde, J., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Brandolin, G. and Padros, E. (2001) The secondary structure of the inhibited mitochondrial ADP/ATP

transporter from yeast analyzed by FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, **40**, 8821-8833.

Lórenz, V.A. (2003) Análisis de la estructura del transportador ADP/ATP por espectroscopia de infrarrojo utilizando métodos matemáticos de estrechamiento y ajuste de bandas. *Tesi doctoral*.

Ludlam, C.F., Arkin, I.T., Liu, X.M., Rothman, M.S., Rath, P., Aimoto, S., Smith, S.O., Engelman, D.M. and Rothschild, K.J. (1996) Fourier transform infrared spectroscopy and site-directed isotope labeling as a probe of local secondary structure in the transmembrane domain of phospholamban. *Biophys J*, **70**, 1728-1736.

M

Maehrel, C., Cordat, E., Mus-Veteau, I. and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer. I. Evidence for ion-induced conformational change. *J Biol Chem*, **273**, 33192-33197.

Mantsch, H.H., Moffatt, D.J. and Casal, H. (1988) Fourier transform methods for spectral resolution enhancement. *J. Mol. Struct.*, **173**, 285-298.

Marsh, D., Muller, M. and Schmitt, F.J. (2000) Orientation of the infrared transition moments for an alpha-helix. *Biophys J*, **78**, 2499-2510.

Marsh, D. and Pali, T. (2001) Infrared dichroism from the X-ray structure of bacteriorhodopsin. *Biophys J*, **80**, 305-312.

Marshall, A.G. and Verdun, F.R. (1990) Fourier transform in NMR, optical, and mass spectrometry. A user's handbook. *Elsevier Science Publishers B. V. The Netherlands*.

- Matsuzaki, S., Weissborn, A.C., Tamai, E., Tsuchiya, T. and Wilson, T.H. (1999) Melibiose carrier of *Escherichia coli*: use of cysteine mutagenesis to identify the amino acids on the hydrophilic face of transmembrane helix 2. *Biochim Biophys Acta*, **1420**, 63-72.
- Menezes, M.E., Roepe, P.D. and Kaback, H.R. (1990) Design of a membrane transport protein for fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1638-1642.
- Mitra, A.K., van Hoeck, A.N., Wiener, M.C., Verkman, A.S. and Yeager, M. (1995) The CHIP28 water channel visualized in ice by electron crystallography. *Nature Struct Biol*, **2**, 726-729.
- Mus-Veteau, I., Pourcher, T. and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 6775-6783.
- Mus-Veteau, I. and Leblanc, G. (1996) Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of cosubstrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses. *Biochemistry*, **35**, 12053-12060.

N

- Niiya, S., Yamasaki, K., Wilson, T.H. and Tsuchiya, T. (1982) Altered cation coupling to melibiose transport in mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **257**, 8902-8906.

P

- Pacholczyk, T., Blakely, R.D. and Amara, S.G. (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*, **350**, 350-354.

- Patzlaff, J., Moeller JA, Barry BA, Brooker RJ. (1998) Fourier transform infrared analysis of purified lactose permease: a monodisperse lactose permease preparation is stably folded, alpha-helical, and highly accessible to deuterium exchange. *Biochemistry*, **37**, 15363-15375.
- Patzlaff, J.S., Brooker, R.J. and Barry, B.A. (2000) A reaction-induced fourier transform-infrared spectroscopic study of the lactose permease. A transmembrane potential perturbs carboxylic acid residues. *J Biol Chem*, **275**, 28695-28700.
- Poolman, B. and Konings, W.N. (1993) Secondary solute transport in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1183**, 5-39.
- Poolman, B., Knol, J., van der Does, C., Henderson, P.J., Liang, W.J., Leblanc, G., Pourcher, T. and Mus-Veteau, I. (1996) Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Mol Microbiol*, **19**, 911-922.
- Pourcher, T., Bassilana, M., Sarkar, H.K., Kaback, H.R. and Leblanc, G. (1990) Melibiose permease and alpha-galactosidase of Escherichia coli: identification by selective labeling using a T7 RNA polymerase/promoter expression system. *Biochemistry*, **29**, 690-696.
- Pourcher, T., Bassilana, M., Sarkar, H.K., Kaback, H.R. and Leblanc, G. (1990) The melibiose/Na⁺ symporter of Escherichia coli: kinetic and molecular properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **326**, 411-423.
- Pourcher, T., Sarkar, H.K., Bassilana, M., Kaback, H.R. and Leblanc, G. (1990) Histidine-94 is the only important histidine residue in the melibiose permease of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 468-472.

- Pourcher, T., Bassilana, M., Sarkar, H.K., Kaback, H.R. and Leblanc, G. (1992) Melibiose permease of *Escherichia coli*: mutation of histidine-94 alters expression and stability rather than catalytic activity. *Biochemistry*, **31**, 5225-5231.
- Pourcher, T., Zani, M.L. and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. I. Effect on Na(+)-dependent transport and binding properties. *J Biol Chem*, **268**, 3209-3215.
- Pourcher, T., Leclercq, S., Brandolin, G. and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: large scale purification and evidence that H⁺, Na⁺, and Li⁺ sugar symport is catalyzed by a single polypeptide. *Biochemistry*, **34**, 4412-4420.
- Pourcher, T., Bibi, E., Kaback, H.R. and Leblanc, G. (1996) Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis. *Biochemistry*, **35**, 4161-4168.
- Press, W.H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992) Numerical recipes in C: The art of scientific computing. *Cambridge University Press, Cambridge-New York-Melbourne*, 788-825.
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, T., Arakawa, T. and Carpenter, J.F. (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J*, **65**, 661-671.

R

- Rahmelow, K., Hübner, W., Ackermann, Th. (1998) Infrared absorbance of protein side chains. *Anal Biochem*, **257**, 1-11.

Rath, P., DeGrip, W.J. and Rothschild, K.J. (1998) Photoactivation of rhodopsin causes an increased hydrogen-deuterium exchange of buried peptide groups. *Biophys J*, **74**, 192-198.

Reizer, J., Reizer, A. and Saier, M.H., Jr. (1994) A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta*, **1197**, 133-166.

Rigaud, J.L., Paternostre, M.T. and Bluzat, A. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **27**, 2677-2688.

S

Saba, R.I., Ruyschaert, J.M., Herchuelz, A. and Goormaghtigh, E. (1999) Fourier transform infrared spectroscopy study of the secondary and tertiary structure of the reconstituted Na⁺/Ca²⁺ exchanger 70-kDa polypeptide. *J Biol Chem*, **274**, 15510-15518.

Saier, M.H., Jr. (1992) Mechanisms of carbohydrate transport in bacteria and comparisons with those in eukaryotes. *The structure of biological membranes. Philip Yeagle. CRC Press.*

Saier, M.H., Jr. (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol Microbiol*, **35**, 699-710.

Saier, M.H., Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 354-411.

Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672.

- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. and Rosenbuch, J.P. (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science*, **267**, 512-514.
- Slotboom, D.J., Konings, W.N., Lolkema, J.S. (2001) The structure of glutamate transporters show channel-like features. *FEBS Lett*, **492**, 183-186.
- Stephenson, D.S. (1988) Linear prediction and maximum entropy methods in NMR spectroscopy. In progress.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H. H. (1988) New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta*, **952**, 115-130.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H. H., Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, **32**, 389-394.
- Susi, H., Timasheff, S.N. and Stevens, L. (1967) Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. I. The amide I band in water and deuterium oxide solutions. *J Biol Chem*, **242**, 5460-5466.
- Susi, H., Byler, D.M. (1986) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods in enzymology*, **130**, 290-311.

T

- Tamm, L.K. and Tatulian, S.A. (1993) Orientation of functional and nonfunctional PTS permease signal sequences in lipid bilayers. A polarized attenuated total reflection infrared study. *BIOCHEMISTRY*, **32**, 7720-7726.

- Tate, C.G., Whiteley, E. and Betenbaugh, M.J. (1999) Molecular chaperones stimulate the functional expression of the cocaine-sensitive serotonin transporter. *J Biol Chem*, **274**, 17551-17558.
- Tatulian, S.A., Biltonen, R.L. and Tamm, L.K. (1997) Structural changes in a secretory phospholipase A2 induced by membrane binding: a clue to interfacial activation? *J Mol Biol*, **268**, 809-815.
- Tatulian, S.A., Cortes, D.M. and Perozo, E. (1998) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): secondary structure characterization from FTIR spectroscopy. *FEBS Lett*, **423**, 205-212.
- Tazebay, U.H., Wapnir, I.L., Levy, O., Dohan, O., Zuckier, L.S., Zhao, Q.H., Deng, H.F., Amenta, P.S., Fineberg, S., Pestell, R.G. and Carrasco, N. (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med*, **6**, 871-878.
- Teather, R.M., Muller-Hill, B., Abrutsch, U., Aichele, G. and Overath, P. (1978) Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol Gen Genet*, **159**, 239-248.
- Timasheff, S.N., Susi, H. and Stevens, L. (1967) Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. II. Survey of globular proteins. *J Biol Chem*, **242**, 5467-5473.
- Torres, J., Sepulcre, F. and Padros, E. (1995) Conformational changes in bacteriorhodopsin associated with protein-protein interactions: a functional alpha I-alpha II helix switch? *Biochemistry*, **34**, 16320-16326.

U

- Uhl, G.R. (1992) Neurotransmitter transporters (plus): a promising new gene family. *Trends Neurosci*, **15**, 265-268.

V

Van Thienen, G.M., Postma, P.W., Van Dam, K. (1978) Na(+)-Dependent methyl beta-thiogalactoside transport in *Salmonella typhimurium*. *Biochim Biophys Acta*, **513**, 395-400.

Venyaminov, S. and Kalnin, N.N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers*, **30**, 1243-1257.

Vigano, C., Manciu, L., Buyse, F., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (2000) Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure, orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins. *Biopolymers*, **55**, 373-380.

Vigano, C., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (2003) Detection of structural and functional asymmetries in P-glycoprotein by combining mutagenesis and H/D exchange measurements. *Chem Phys Lipids*, **122**, 121-135.

Vogel, R. and Siebert, F. (2000) Vibrational spectroscopy as a tool for probing protein function. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 518-523.

W

Walz, T., Typke, D., Smith, B.L., Agre, P. and Engel, A. (1995) Projection map of aquaporin-1 determined by electron crystallography. *Nature*, **2**.

Weissborn, A.C., Botfield, M.C., Kuroda, M., Tsuchiya, T. and Wilson, T.H. (1997) The construction of a cysteine-less melibiose carrier from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1329**, 237-244.

Williams, K.A. (2000) Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, **403**, 112-115.

Wilson, D.M. and Wilson, T.H. (1987) Cation specificity for sugar substrates of the melibiose carrier in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **904**, 191-200.

Wilson, D.M. and Wilson, T.H. (1992) Asp-51 and Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier. *J Bacteriol*, **174**, 3083-3086.

Wilson, D.M., Hama, H. and Wilson, T.H. (1995) GLY113-->ASP can restore activity to the ASP51-->SER mutant in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 242-249.

Wilson, T.H., Wilson, D. M. (1998) Evidence for a close association between helix IV and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1374**, 77-82.

Y

Yazyu, H., Shiota-Niyya, S., Shimamoto, T., Kanazawa, H., Futai, M. and Tsuchiya, T. (1984) Nucleotide sequence of the melB gene and characteristics of deduced amino acid sequence of the melibiose carrier in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **259**, 4320-4326.

Z

Zani, M.L., Pourcher, T. and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties. *J Biol Chem*, **268**, 3216-3221.

Zani, M.L., Pourcher, T. and Leblanc, G. (1994) Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH₂-terminal domains of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**, 24883-24889.