

TESI DOCTORAL

**INFLUENCIA ESTRUCTURAL I FUNCIONAL DE
MUTACIONS EXTRACEL·LULARS DE LA
BACTERIODOPSINA: EFECTES LOCALS
I A LLARGA DISTÀNCIA**

MERCEDES MÁRQUEZ MARTÍNEZ

ABREVIATURES

A	Absorbància
aas	Aminoàcids
ADP	Adenosil-5'-difosfat
AFM	Microscòpia de força atòmica
Amp	Ampicilina
ANTSA	Àcid 1-aminonaftaleno-3,6,8-trisulfònic
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
ARNr	ARN ribosòmic
ATP	Adenosil-5'-trifosfat
bO	Bacteriopsina
<i>bop</i>	Gen de la bacteriorodopsina
bR	Bacteriorodopsina
bR _a	bR púrpura àcida
BS	Base de Schiff
c	Concentració
CAP	Complex alliberador del protó
C _p	Capacitat calorífica a pressió constant
CP	Citoplasmàtic
C _p ^{ap}	Capacitat calorífica aparent, a pressió constant
DA	Forma adaptada a la foscor
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DSC	Calorimetria diferencial de rastreig
dsDNA	DNA de doble cadena
ε	Coefficient d'extinció molar
EC	Extracel·lular
EDTA	Etilendiaminotetraacetat, sal disòdica
EPR	Ressonància paramagnètica de spin
EXAFS	“Extended X-ray absorption fine structure”
FTIR	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier
<i>Fup</i>	“Forward universal primer”

hR	Halorodospina
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranósido
IR	Infraroig
IS	Seqüència d'inserció
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LA	Forma adaptada a la llum
λ	Longitud d'ona
M ₁	Primer component d'M
M ₂	Segon component d'M
MO	1-mono-oleïna-rac-glicerol
MP	Membrana Púrpura
ND:YAG	“Neodymium:Ytrium Aluminum Garnet”
NMR	Ressonància magnètica nuclear
Nov	Novobiocina
OG	Octilglucòsid
p _i	Fosfat inorgànic
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pK _a ap	pK _a aparent
pS	Rodospina sensorial II o Foborodopsina
q.s.p.	Quantitat suficient per
Rev	“Reverse universal primer”
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RNasa	Ribonucleasa A
r.p.m.	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
sR	Rodopsina sensorial I
τ	Temps de vida associat a una corba exponencial
T	Temperatura
t _{1/2}	Temps de vida mitja
TAE	EDTA-tris-acetato

Abreviatures

TE	Tampó tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tet	Tetraciclina
T _m	Temperatura del màxim d'un pic calorimètric
Tris	Tris(hidroximetil)-amino-metà
UV	Ultraviolat
v	Volum
Vis	Visible
X	Grup desconegut expulsor del prot
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
Y	Grup desconegut recaptador del protó
ΔC _p	Capacitat calorífica a pressió constant en excés

I. INTRODUCCIÓ

I.1. Introducció històrica

La presència de vida en ambients extrems ha estat sempre una temàtica de gran interès en la comunitat científica. Entre aquests ambients es troben els entorns hipersalins, com són les salines o llacs salats, on la vida és pràcticament impossible degut a l'extrema toxicitat de les sals a tan elevades concentracions. L'observació del color vermell-púrpura que presenten alguns d'aquests hàbitats (figura I.1 A i B) es va associar, a principis dels anys 60, amb la presència, entre d'altres, de l'arqueobacteri hal·lòfil *Halobacterium salinarum*. Això va determinar la fita d'estudiar tant l'origen de la seva coloració, com la seva capacitat de supervivència en condicions tan extremes.

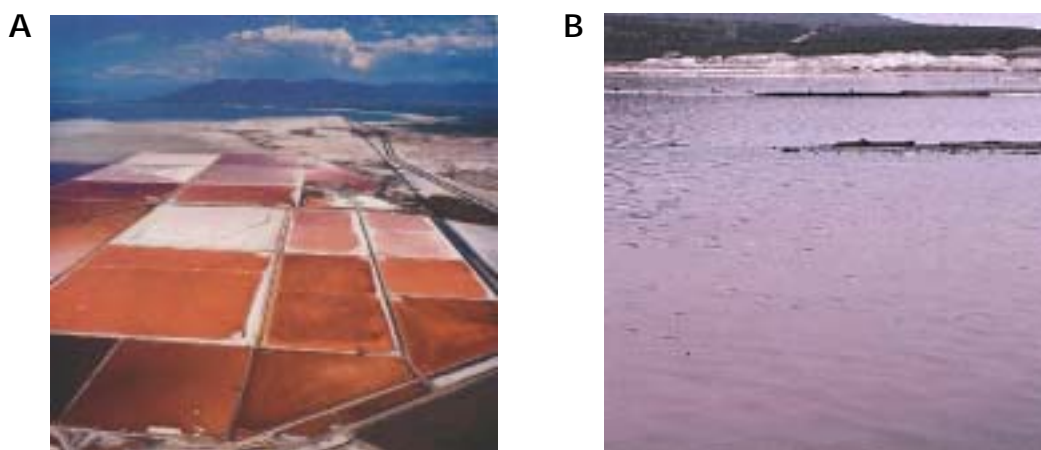


Figura I.1. (A) Fotografia d'una planta salina solar dels Estats Units. A la imatge es pot apreciar clarament la coloració vermella-púrpura. (B) Fotografia d'un llac salí a San Quintín, Baixa Califòrnia. En aquest cas s'observa una predominància del color púrpura.

En aïllar l'*H.salinarum* el primer fet que es va observar va ser que en posar en contacte el bacteri amb aigua destil·lada es produïa la disgregació de les cèl·lules com a conseqüència d'un xoc osmòtic. La fragmentació de la membrana cel·lular del bacteri va donar lloc a una sèrie de fragments de membrana diferenciats de la membrana citoplasmàtica que, degut a que presenten una coloració púrpura, va ser anomenada membrana púrpura (MP). Es va descobrir que la MP estava constituïda per una única proteïna transmembranal i que tenia una molècula de retinal unida (Oesterhelt et al., 1971).

En analitzar més en profunditat la membrana púrpura es va comprovar que tenia un màxim d'absorbància al visible de 560 nm. Aquest màxim variava quan la MP era

il·luminada amb diferents longituds d'ona, intuïent que la proteïna podia actuar com a fotoreceptor. Aquest comportament junt amb el fet de que la proteïna tingués una molècula de retinal unida, feien que la proteïna de la MP tingués molta similitud amb la rodopsina visual. Es per aquest motiu que a aquesta proteïna se la va anomenar Bacteriorodopsina (bR) (Oesterhelt et al., 1971).

Estudis més acurats van revelar que la il·luminació de la bacteriorodopsina donava lloc al canvi reversible d'absorbància des de 560 a 415 nm (Oesterhelt et al., 1973a). Es va comprovar que aquest fet provocava al mateix temps un canvi en el pH del medi. Estudis amb cèl·lules senceres i vesícules van demostrar que aquest canvi de pH era degut al moviment de protons des d'un costat de la membrana cap a l'altre, fet que va suggerir que la bR era una proteïna bombejadora de protons. Així doncs la il·luminació de la bR produïa un transport de protons des del citoplasma a l'espai extracel·lular generant-se un gradient electroquímic de protons. Es va observar (figura I.2) que aquest gradient era aprofitat per ATPsintases que amb mecanisme antiport introduïen un protó a la cèl·lula i expulsaven dos Na^+ cap a l'exterior generant-se així ATP a partir d'ADP, (Oesterhelt ., 1973a).

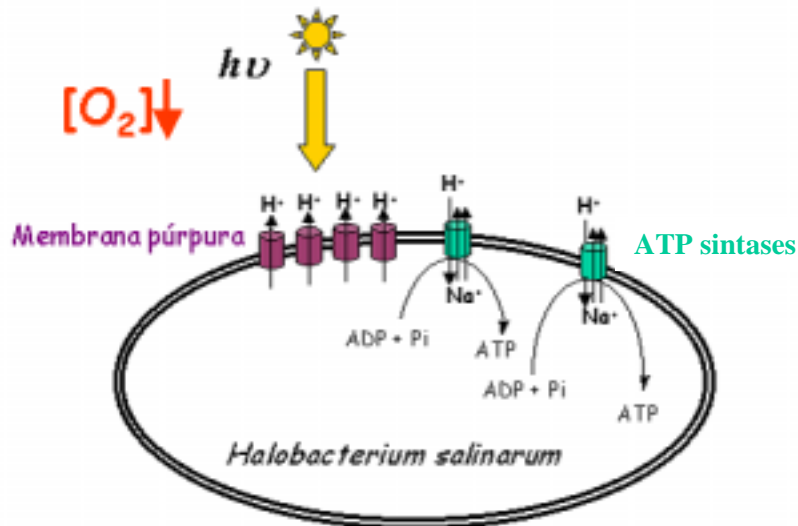


Figura I.2. Esquema del procés d'obtenció d'energia química a partir de l'energia lumínica a *H.salinarum*.

Aquest mecanisme de producció d'ATP es va veure que no era l'habitual del bacteri sinó que es tractava d'un mecanisme d'emergència que desenvolupava l'organisme quan hi havia limitació d'oxigen al medi, ja que *H.salinarum* és un bacteri

aerobi que normalment obté l'energia de la fosforilació oxidativa dels aminoàcids. Així doncs, en absència de quantitats suficients d'O₂ s'atura el creixement del bacteri i es posen en marxa una sèrie de mecanismes per a sintetitzar la MP i poder transformar l'energia de la llum en ATP. L'ATP aconseguir sota aquestes condicions, però, només permet la subsistència del bacteri fins que les condicions tornin a ser favorables, és a dir, és un mecanisme de resistència (Oesterhelt et al., 1973a).

L'única dada estructural de la bR que es tenia fins el moment era que es tractava d'una proteïna transmembranal. No va ser fins l'any 1975 que Henderson et al. (1975a), amb una resolució de 7 Å, van observar mitjançant difracció d'electrons que la bR constava de 7 estructures, segurament hèlices α , perpendiculars a l'eix de la membrana i que tenia unes dimensions de 25 x 35 x 45 Å. Estudis posteriors van corroborar aquesta hipòtesi (Unwin et al., 1975; Ovchinnikov et al., 1979). Henderson et al. (1990) van obtenir l'estructura amb millor resolució de l'època (3,5 Å) observant-se més detalls de l'estructura de la bR. Amb l'obtenció de cristalls de bR (figura I.3) es varen obtenir més detalls de l'estructura de la proteïna, que, en anar-se'n millorant la tècnica d'elaboració dels cristalls s'han anat obtenint estructures de major resolució (Pebay-Peyroula et al., 1997).

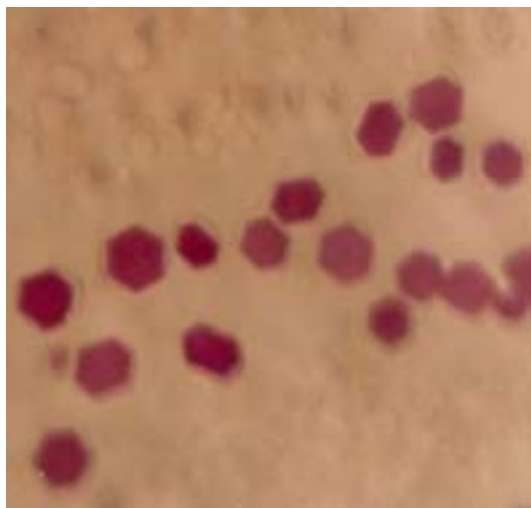


Figura I.3. Imatge per microscopi òptic invertit de cristalls de bR elaborats recentment al nostre laboratori.

Fins al moment els mecanismes de producció d'energia química a partir de l'energia lluminosa que es coneixien a la natura consistien en una complexa cadena de transport d'electrons con és la fotosíntesi. El descobriment d'un sistema tan simple i

diferent com el que es duu a terme en *H.salinarum* va despertar la curiositat del món científic i va repercutir en l'aparició i desenvolupament de molts grups d'investigació arreu del món que van dedicar els seus esforços a l'estudi de la bR i el seu mecanisme de bombeig de protons. L'enrenou que va produir el descobriment de la bR, junt amb el fet de que s'obtingui fàcilment i en gran quantitats, ha fet que la bR sigui la proteïna transportadora amb la funció i estructura més coneguda. Per altra banda, la bacteriorodopsina ha servit com a model d'estudi per altres proteïnes transmembranals com la rodopsina (Hoflack et al., 1994; Neumüller et al., 1996; Riek et al., 2000).

La bR però, no solament és interessant com a model d'estudi pel coneixement d'altres proteïnes, sinó també com a base per a possibles aplicacions en el món de la microelectrònica, memòria hologràfica (Hampp et al., 1990; Birge et al., 1999), memòria òptica (Hampp et al., 2000), potabilització d'aigües salines (Oesterhelt et al., 1976), sondes de pH (Padrós et al., 2001), obtenció d'energia química a partir de llum per alimentar micro sistemes (Lanyi et al., 2001; Pohorille et al., 2002); microxips informàtics (Birge et al; 1995), etc. A més la bR s'ha fet servir com a eina per l'estudi d'altres molècules com ha sigut la seva utilització per a orientar proteïnes i poder-les estudiar per ressonància magnètica nuclear (Bernadó et al., 2002), o per estudiar bucles de la rodopsina per microscòpia de força atòmica (AFM) (Heymann et al., 2000).

Malgrat que s'ha avançat molt en el coneixement de l'estructura i funció de la bacteriorodopsina encara hi ha molts dubtes en quant a la implicació de molts aminoàcids en el bombeig de protons i el manteniment de l'estructura. Per tal d'esclarir aquests dubtes en aquest treball es planteja l'estudi de l'efecte de diferents mutacions sobre aquestes característiques.

1.2. Halobacterium salinarum

Halobacterium salinarum forma part de la família *Halobacteriaceae*, que consta de 10 gèneres, dels quals solament 4 contenen alguna proteïna associada a retinal (Ihara et al., 1998). Cal destacar que en alguns dels articles referenciats es parla de *H.halobium* en comptes de *H.salinarum*; això és degut a que en un principi hi va haver una confusió en quant a la identitat de l'organisme.

H.salinarum és un arqueobacteri hal·lòfil que s'ha adaptat de tal forma a viure en ambients d'extrema salinitat, de l'ordre de 4M, (figura I.1) que l'elevada concentració de sal s'ha fet indispensable per a la seva supervivència (Oesterhelt et al., 1971). Tant a

les cèl·lules eucariotes com procariotes el catió acumulat intracel·lularment és el Na^+ . En el cas d'*Halobacterium*, però, s'acumula K^+ , altament tòxic per a la resta d'organismes (Lanyi., 1979). Aquesta acumulació es dona tant per contrarestar l'elevada salinitat del medi com per mantenir la funcionalitat de la cèl·lula, ja que la majoria dels seus enzims al igual que els seus ribosomes són depenents de sal (Oosterhelt et al., 1974a; Van de Vossenbergh et al., 1999). L'ambient salí on es desenvolupa *H.salinarum* sol anar acompanyat d'elevades temperatures, fet que ha provocat que el bacteri pugui créixer a altes temperatures, amb un òptim de 57°C (Oosterhelt et al., 1974a).



Figura I.4. Imatge d'*H.salinarum* adquirida per microscòpia electrònica. A la imatge s'aprecia clarament la forma de bacil de l'arqueobacteri.

Com a característiques generals de l'arqueobacteri, cal destacar que les cèl·lules tenen forma de bastó, un tamany de $0,5-1,2 \mu\text{m} \times 1,0-6,0 \mu\text{m}$ (figura I.4), son mòbils gràcies a varis flagels polars i es tenyeixen com gram negatius. Tenen vacuoles gasíferes que s'han eliminat a la soca R_1 per tal de facilitar l'extracció de la membrana púrpura. El seu genoma és ric en G/C (66-71 %), tenen un codi genètic comú però un ús de codó especial amb un 81 % de codons acabats en C o G (Dunn et al., 1981). Formen colònies birefringents i de coloració vermella o púrpura. Són quimiorganotrofs i aerobis estrictes, i el seu mecanisme de resistència és la MP ja que no formen espores.

El creixement en cultiu de l'arqueobacteri ha sigut possible gràcies a l'elaboració de medis rics en aminoàcids i sals. Pel seu creixement és necessari una bona aireació i mantenir la temperatura al voltant del 40°C . Sota aquestes condicions de

creixement el temps de duplicació del bacteri és de 8-10 hores (Oesterhelt et al., 1974a), molt llarg comparat amb els 20 minuts d'*Escherichia coli*.

La composició de la membrana citoplasmàtica és especial ja que està formada per fosfatidilglicerolfosfats (70 %), glicolípidsulfats (20 %) i esqualè (10 %); en comptes dels tradicionals fosfolípids. Aquests lípids a més no posseeixen enllaços èster sinó èter (Kates et al., 1982). La paret cel·lular del bacteri està constituïda principalment per proteïna amb petites proporcions de carbohidrats; no hi ha peptidoglicans, lípids ni àcids teitoics com a la resta de bacteris (Oesterhelt et al., 1974a).

A la cèl·lula coexisteixen amb la bacteriorodopsina diferents pigments (Stoeckenius et al., 1982):

-Bacterioruberina: pigment transmembranal β -carotenoide que té com a funció protegir el bacteri front la intensa il·luminació existent al seu nínxol ecològic. Aquest pigment és el responsable de la coloració vermella del bacteri (Oesterhelt et al., 1971; Oesterhelt et al., 1974a).

-Halorodopsina (hR): proteïna transmembranal que a l'igual que la bR té unida una molècula de retinal i està ordenada trimèricament, i que, activada per la llum, bombeja ions clor des de l'espai extracel·lular al citoplasma per tal de mantenir el balanç osmòtic durant el creixement del bacteri. La seva estructura va ser obtinguda a 1,8 Å de resolució per Kolbe et al. (2000).

-Rodopsina sensorial I (sR): proteïna transmembranal amb retinal unit i que actua com a fotoreceptor atraient (Spudich et al., 1988; Spudich., 1994).

-Rodopsina sensorial II (pR): anomenada també foborodopsina, també és transmembranal i té unit retinal, actua com a fotoreceptor repelent la radiació blava-verda (Spudich et al., 1988; Spudich et al., 1994). Les dues rodopsines sensorials actuen direccionant el bacteri cap a intensitats de llum adients per la funcionalitat de l'organisme, fugint de la llum ultravioleta i migrant cap a regions d'elevada intensitat de llum taronja. Aquest fenomen és l'anomenat fototaxis.

L'aliniament de seqüències de les quatre arqueorodopsines (bR, hR, sR, pR) de diferents espècies mostra que hi ha 16 aminoàcids completament conservats, deu dels quals es troben localitzats a la butxaca d'unió del retinal. Estudis filogenètics usant l'ARNr 16S com a cronòmetre, mostren que aquestes quatre arqueorodopsines probablement deriven d'una mateixa rodopsina ancestral via duplicacions gèniques. En

una de les primeres duplicacions es va produir la diversificació en dos grups, un format pel parell bR-hR i l'altre per sR-pR (Ihara et al., 1998) a partir dels quals es van obtenir les arqueorodospines actuals.

I.3. Membrana púrpura

I.3.1 Característiques

Els fragments de MP es reparteixen homogèniament a la membrana citoplasmàtica del bacteri i poden arribar a ocupar fins el 50 % de la superfície total (figura I.5) (Oesterhelt et al., 1973a).

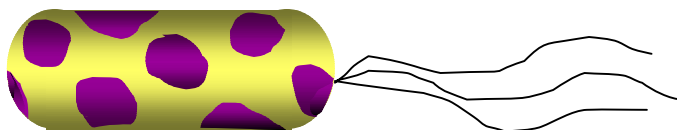


Figura I.5. Esquema d'*H. salinarum* on es pot apreciar la presència dels flagels unipolars i les taques de membrana púrpura distribuïdes per la membrana citoplasmàtica del bacteri.

Les taques de MP tenen forma regular i per microscòpia electrònica es va observar que tenen un diàmetre d'uns 0,5-1 μm (Oesterhelt et al., 1974a; Henderson et al., 1975b) i 45 Å de gruix (Henderson et al., 1975b). Un anàlisi més en profunditat d'aquests fragments va revelar que la MP posseeix una estructura paracristal·lina consistent en una xarxa hexagonal perfecta (Blaurock et al., 1971) de trímers de bR, (figura I.6). Els espais entre les proteïnes estan ocupats per lípids en una proporció de 75 % de proteïna i un 25 % de lípid en pes (Henderson et al., 1975b). Cada monòmer està envoltant entre unes 6 (Kates et al., 1982) i 10 molècules lipídiques (Grigorieff et al., 1996).

Els monòmers no es troben aïllats els uns dels altres ja que mantenen interaccions de caràcter hidrofòbic-hidrofòbic entre les hèlices transmembrana, necessàries per mantenir l'estabilitat del trímer. Aquestes interaccions no es produeixen a l'atzar sinó que es donen entre l'hèlix B d'un monòmer i les hèlices C i E del següent (Fujiyoshi., 1999). L'ordenació de la bR en trímers sembla tenir una importància funcional ja que, encara que els monòmers transporten protons, ho fan de manera menys eficient que la bR trimèrica (Dencher et al., 1979). La forma trimèrica a més d'assegurar la correcta estructura de les hèlices en conformació α_{II} característic de la bR (Torres et al., 1995)

(veure secció I.4), també confereix una major estabilitat a la bacteriorodopsina front elevades temperatures (Brouillette et al., 1987), segurament degut a la major compactació de les hèlices existent als trímers (Subramaniam et al., 1991). L'ordenació en trímers no solament afecta les propietats de la proteïna, sinó que també de les formes isomèriques del retinal (Scherrer et al., 1989) (veure secció I.5.2).

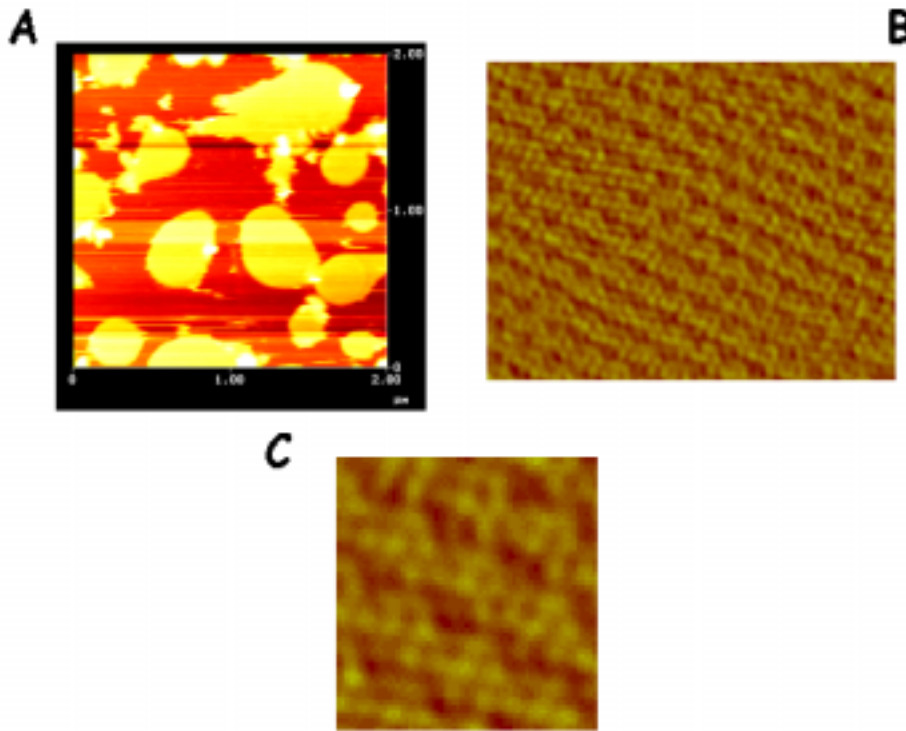


Figura I.6. (A) Imatge de varis fragments de membrana púrpura. (B) Imatge de la membrana púrpura obtinguda per microscòpia de força atòmica. S'observa clarament una ordenació hexagonal de trímers. (C) Ampliació d'un hexàmer. Imatges obtingudes pel nostre grup.

I.3.2. Síntesi

La Bacterioopsina (bO), és la part proteica de la bR en absència de retinal; el seu gen és l'anomenat *bop* (Betlach et al., 1986). L'expressió d'aquests gen ve activada per la unió del sensor d'oxigen Nifl al gen *brp*, gen que forma part del clúster on està inclòs el gen *bop*. Aquest sensor s'uneix únicament quan existeixen condicions de microanaerobiosi en l'entorn i es fa necessària la formació de MP (Peck et al., 2001).

L'expressió del gen *bop* dona lloc a un ARN missatger (ARNm) que és traduït a un precursor de la bO que presenta 13 aminoàcids addicionals a l'extrem N-terminal i un aspàrtic al C-terminal. Aquests elements són tallats abans de que la bO s'inserti a la membrana de manera que són absents a la bR (Dunn et al., 1981). En un principi es va

pensar que aquesta seqüència feia la funció de pèptid senyal per ancorar la bO a la membrana citoplasmàtica, però Xu et al. (1995), van demostrar que aquests 13 aminoàcids no eren necessaris per a la proteïna sinó que en realitat eren el producte de la traducció d'una seqüència de nucleòtids de la regió 5' del ARNm necessaris per formar un bucle. Aquest bucle es forma gràcies a la presència d'una repetició de 9 nucleòtids i la seva formació és necessària perquè es pugui unir el ribosoma a l'ARN (Dunn et al., 1981).

Aquest ARNm no és solament característic per presentar aquest bucle sinó que ho és també per presentar solament 2 nucleòtids a l'extrem 5' abans del codó d'inici de traducció comparat amb els 26 nucleòtids de la resta d'organismes (Dunn et al., 1981; DasSarma et al., 1984). A més en aquest ARN els llocs d'unió del ribosoma es troben *down-stream* dels codó d'inici en comptes de *up-stream*.

La bO obtinguda de la traducció del ARNm s'inserta en una zona de la membrana citoplasmàtica anomenada membrana bruna on es disposa de manera desordenada sense formar l'estructura paracristal·lina típica de la membrana púrpura. Al mateix temps, la síntesi de bO indueix la ciclació del licopé a β -caroté que donarà lloc al retinal, el qual s'unirà a la bO ja inserida a la membrana bruna. Un cop realitzada aquesta unió entre la bO i el retinal, es comença a produir l'ordenació de la bR (Sumper et al., 1976).

1.4. Bacteriorodopsina

La bR és una proteïna de 248 aminoàcids que té un pes molecular de 26 KDa (Ovchinnikov et al., 1979; Dunn et al., 1981) on cal destacar l'absència d'histidines i cisteïnes i la gran abundància en aminoàcids hidrofòbics i aromàtics. L'estructura de la bR consisteix en 7 hèlices α anomenades de la A a la G connectades entre sí per bucles citoplasmàtics i extracel·lulars amb l'extrem N-terminal al costat extracel·lular i l'extrem C-terminal al costat citoplasmàtic (Ovchinnikov et al., 1979). En moltes ocasions es parla de costat extracel·lular, però s'ha de tenir en compte que en realitat és l'espai periplasmàtic. Cap a la meitat de la proteïna, i quasi perpendicular a l'eix de les hèlices, es trobava unida la molècula de retinal (figura I.7), mitjançant una Base de Schiff (BS) protonada.

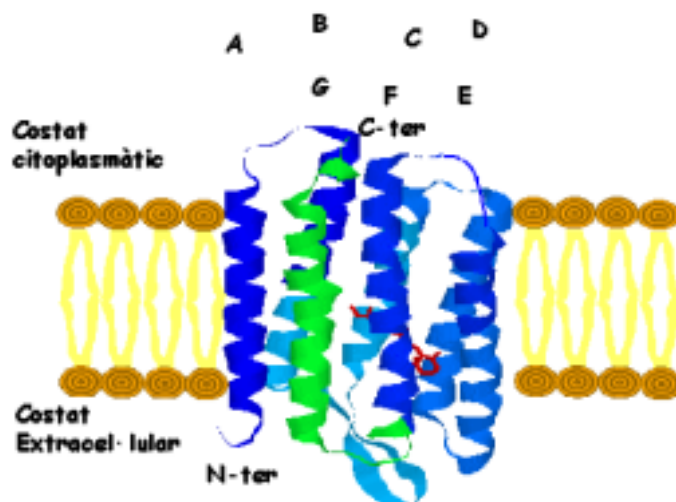


Figura I.7. Model de la bacteriorodopsina obtingut a partir de l'estructura resolta per Luecke et al. (1999a). Les lletres indicades a la part superior donen nom a les set hèlixs α , sent la G la que té unida la molècula de retinal.

Les hèlixs de la bR no es troben totalment en conformació α_I com succeeix a la majoria de proteïnes, sinó en una barreja d' α_I i α_{II} (Krimm et al., 1982). Aquesta varietat d'hèlix α es caracteritza sobre tot per presentar una hèlix menys compacta. Les principals diferències entre les dues formes es troben resumides a la taula I.1.

Taula I.1. Característiques generals de l'estructura de les hèlixs α_I i α_{II} .

Característiques	α_I	α_{II}
Plà de l'enllaç peptídic	Paral·lel a l'eix de la hèlix	L'enllaç N-H apunta cap a l'eix
Longitud del pont d'hidrogen C=O...H-N	2,86 Å	3 Å
Freqüència de vibració del pont d'hidrogen	Menor	Major
Força dels enllaços C=O i N-H	Menor	Major

El fet de que presenti aquesta configuració inusual de les hèlixs sembla que és degut a que l'estructura α_{II} permet una major estabilitat del retinal en la seva conformació *13-cis*, necessària pel correcte funcionament de la bR (Veure secció I.6.2).

I.5. Retinal

I.5.1. Característiques

Cap a la meitat de la bR la molècula de retinal es troba unida covalentment, mitjançant una Base de Schiff protonada (Oesterhelt et al., 1971), amb la lisina 216 (Seiff et al., 1985). El retinal és el cromòfor responsable de l'absorció de la llum i d'iniciar els canvis necessaris perquè la bR bombegi protons, i de que la bacteriorodopsina presenti una coloració púrpura (Lewis et al., 1974). El retinal està compost d'un anell β -ionona i una cadena poliènica de 16 carbonis amb dobles enllaços conjugats. El cromòfor es troba ancorat a la bR formant un angle de 20° respecte al pla de la membrana citoplasmàtica (Heyn et al., 1977) dividint així la proteïna en dues parts, la part citoplasmàtica i l'extracel·lular.

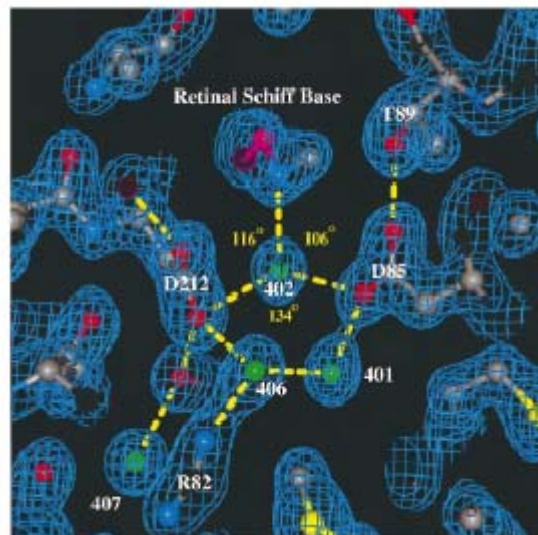


Figura I.8. Mapa de densitat electrònica de la regió circumdant de la Base de Schiff a 1,55 Å de resolució. A la imatge s'aprecia un complex format per la molècula d'aigua 402 unida mitjançant ponts d'hidrogen per un costat amb la BS i per l'altre als aspàrtics 85 i 212. Aquests aspàrtics es troben connectats amb l'arginina 82 mitjançant les aigües 401 i 406. Aquest complex seria el contraïo de la Base de Schiff (Luecke et al., 1999a).

El retinal té la capacitat d'absorbir llum presentant un màxim d'absorbància depenent del seu entorn, així doncs, quan el retinal es troba dissolt en etanol el seu màxim es troba a 380 nm. Quan el retinal però, es troba unit a la proteïna, la càrrega positiva de la BS que s'ha format s'estabilitza mitjançant ponts d'hidrogen directes o indirectes, amb el contraïo format pel aspàrtics 85, 212, la arginina 82 i molècules

d'aigua (figura I.8). (Grigorieff et al., 1996; Kimura et al., 1997; Luecke et al., 1998; Mitsouka et al., 1999; Edman et al., 1999). El microambient generat per aquests residus afecta de manera important la densitat electrònica del retinal fent que el seu màxim d'absorbància es trobi a 558 nm (Tajkhorshid et al., 1999).

El retinal, però, no solament és responsable de l'absorció de llum i d'iniciar el bombeig de protons (secció I.6), sinó que a més té un paper important en la compactació de les hèlices i per tant en l'estabilitat de l'estructura de la bR (Cladera et al., 1996; Ludlam et al., 1997)

I.5.2. Adaptació llum-fosc

La bR presenta dos estats anomenats forma adaptada a la foscor (DA) i forma adaptada a la llum (LA) (Oesterhelt et al., 1973a). Aquestes dues formes es diferencien clarament per presentar un màxim d'absorbància en el visible característic, sent de 558 nm per la forma DA i 568 nm per la LA. L'estudi d'aquestes formes va mostrar que hi havia diferents formes isomèriques del retinal.

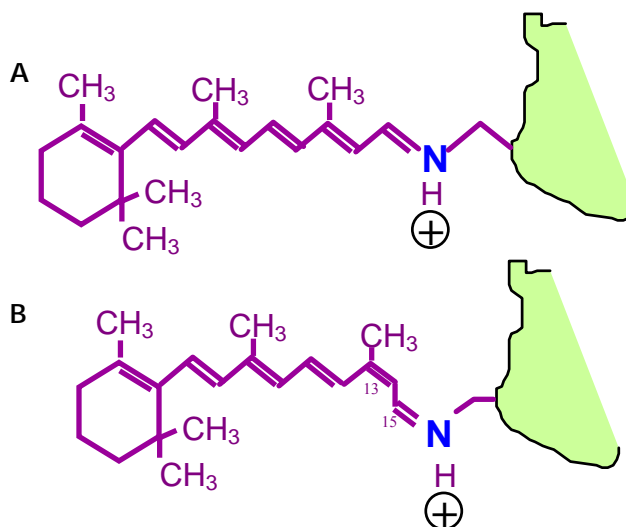


Figura I.9. (A) Estructura de la molècula de retinal en conformació *tot-trans* formant una Base de Schiff protonada amb la proteïna. (B) Molècula de retinal en conformació *13-cis, 15-syn*.

En la forma LA el retinal es troba en quasi el 100 % en configuració *tot-trans* (Ohno et al., 1977; Dencher et al., 1982; Steinberg et al., 1991); en DA, però, en un principi es va pensar que hi havia una proporció 1:1 de *13-cis, 15-syn* : *tot-trans*, (figura I.9.A i B) (Ohno et al., 1977; Dencher et al., 1982), però estudis més acurats van revelar que en realitat la proporció és de 2:1 (Scherrer et al., 1989; Steinberg et al., 1991). El

sentit de que hi hagi aquesta proporció dels isòmers és un tema encara no resolt. Scherrer et al. (1989) van suggerir la possibilitat de que en un trímer hi hagués dos monòmers amb configuració *13-cis* i un amb *tot-trans*, però també cap la possibilitat de que hi hagués unes proporcions a l'atzar als trímers i que els isòmers s'anessin intercanviant.

Les proporcions dels dos isòmers pot variar depenent de les característiques de la bR, de manera que en formes monomèriques de la bR per exemple s'ha observat que hi ha una major proporció de *13-cis* a la forma DA (72 %) que en els trímers (66 %). Aquest fet mostra el paper que juguen els trímers en estabilitzar la forma *tot-trans* indicant així, que la forma *13-cis* és l'isòmer energèticament més estable (Scherrer et al., 1989). Aquest fet suggeriria que l'organització en trímers de la bR seria necessària per mantenir una proporció isomèrica del retinal adient per la funció de la bR. A més s'ha observat que els monòmers s'adapten a la foscor un ordre de magnitud més ràpid que els trímers indicant que la presència de retinal en un monòmer influencia el cromòfor veí (Ebrey et al., 1977; Hartsel et al., 1988). Per altra banda, Rehorek et al. (1979) van determinar que la unió de retinal a la bO es produeix de manera cooperativa.

La forma LA s'obté per il·luminació de la bR DA durant uns minuts amb llum blanca. Per tornar a la forma DA la bR s'ha de mantenir a les fosques durant un temps mínim de 20 minuts a 35° C, depenent del pH (Oesterhelt et al., 1973a; Ohno et al., 1977). La velocitat d'adaptació a la foscor depèn de la temperatura, de manera que quan més elevada és la temperatura el temps necessari per l'adaptació és menor i viceversa, per exemple, a 4° C el temps necessari és de 30 hores (Ohno et al., 1977). Scherrer et al. (1989) van detectar que en augmentar la temperatura, a partir de 40° C, a més de disminuir el temps d'adaptació a la foscor, es produïa un increment en el nombre de molècules de retinal en conformació *tot-trans*. Així les propietats de les formes DA i LA no són solament depenents de la bR sinó que també de les característiques del medi com és en aquest cas la temperatura.

L'adaptació a la foscor depèn del pH, de manera que a valors del pH per sota de 7 es produeix una disminució del temps d'adaptació; entre pH 7 i 8,5 hi ha una invariabilitat en la velocitat d'adaptació, i a pH per sobre de 8,5 aquest temps augmenta (Ohno et al., 1977). A pH àcid a més va disminuint la proporció de *tot-trans* de la forma LA de manera que a pH 2 es té només un 55 % de *tot-trans*, un 35 % de *13-cis*, 7 % de *11-cis* i 3 % de *9-cis*. En la forma DA, però, en baixar el pH per sota de 4 es produeix

un lleuger increment en la proporció de *tot-trans*, tenint a pH 2 un 58 % de *tot-trans*, i 42 % de *13-cis*. Quan s'incrementa el pH per sobre de 10 en la forma LA es produeix una disminució en la quantitat de *tot-trans* fins un 82 % amb un 4 % de *13-cis* i un 14 % de *11-cis*. A la forma DA no es produeixen canvis significatius a pH bàsic (Koyama et al., 1993).

Balashov et al. (1996), van detectar que la velocitat d'adaptació a la foscor es proporcional a la quantitat de la forma blava i que és per aquest motiu que quan més

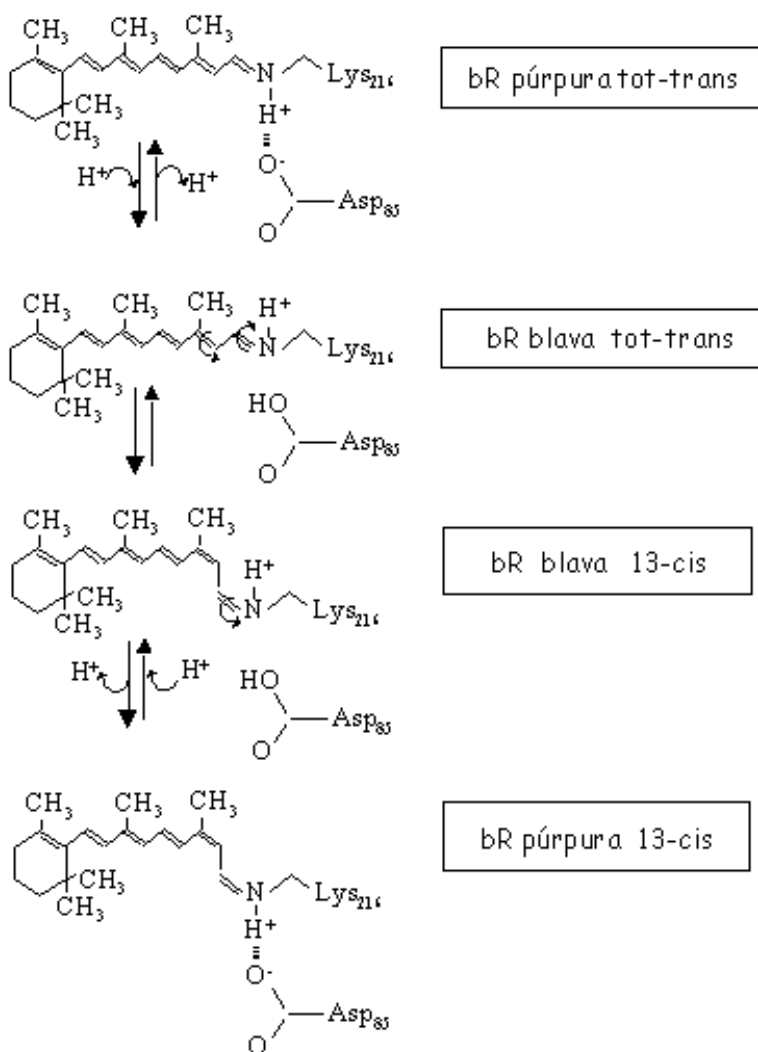


Figura I.10. Representació esquemàtica del mecanisme de adaptació a la foscor en la bR. Les transicions entre *tot-trans* i *13-cis* es produeixen via protonació transitòria de l'Asp 85. Esquema basat en Balashov et al. (1996).

residia en l'adaptació de la bR de dues formes diferents en quant a la seva funcionalitat. La forma DA es va veure que havia perdut la capacitat de bombeig de protons comparat amb la forma LA, de manera que la forma DA seria una forma inactiva de la bR on el

baix és el pH més ràpida és l'adaptació a la foscor. Arriben més enllà i proposen que el mecanisme d'adaptació a la foscor es produeix via protonació transitòria de l'Asp 85 (figura I.10) a qualsevol pH. En protonar-se aquest grup es trencaria el seu pont d'hidrogen amb la Base de Schiff augmentant la deslocalització dels electrons del retinal i alliberant la BS; d'aquesta manera es podria produir la isomerització.

Ohno et al. (1977) van determinar que el sentit de l'existència d'aquestes dues formes de la bR

retinal es troba en una conformació energèticament més estable i menys actiu comparat amb la forma LA. Així doncs, la forma DA seria un estat de relaxació de la bR de manera que és necessari la il·luminació d'aquest per obtenir la forma LA ja plenament activa.

I.6. Fotocicle

I.6.1. Introducció

S'anomena fotocicle a l'encadenament de canvis estructurals en la bR que es produeixen com a conseqüència de l'absorció d'un fotó pel retinal, donant com a resultat final l'expulsió d'un protó des del costat citoplasmàtic al costat extracel·lular.

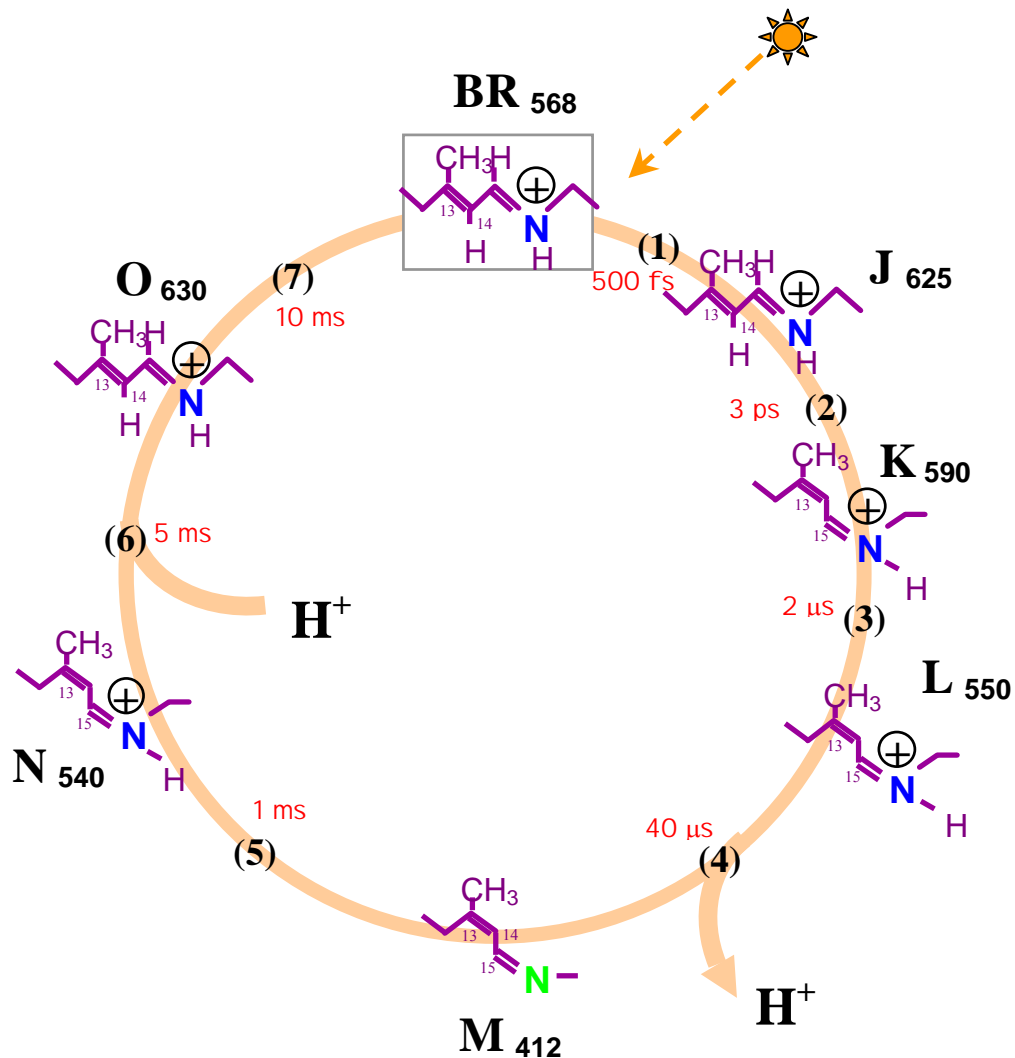


Figura I.11. Esquema del fotocicle de la bR. Cadascun dels intermediaris es troba representat mitjançant una lletra i un número corresponent al seu màxim d'absorbència al visible. En vermell estan indicats els temps de formació de cadascun dels intermediaris. Entre parèntesi es troben els passos representats en la figura I.12.

Per a que la bR dugui a terme el fotocicle és necessari que primerament la proteïna es trobi en la seva forma activa, es a dir, adaptada a la llum on la totalitat dels retinals es troben en conformació *tot-trans* (I.5.2). A cadascun dels estats pels que es troba la bR durant el fotocicle se l'anomena intermediari, fàcilment identificables per tenir cadascun d'ells un màxim d'absorbència característic (Lozier et al., 1975). A la figura I.11 està representat l'ordre temporal de cadascun dels intermediaris del fotocicle, on els principals moviments de protons estan reflexats a la figura I.12.

S'anomena fotocicle degut a que els canvis que es produeixen en absorbir un fotó el retinal són de caràcter cíclic. El temps que triga la bR en complir tot un cicle és d'uns 10 ms, que es torna a reprendre si continuen les condicions d'il·luminació.

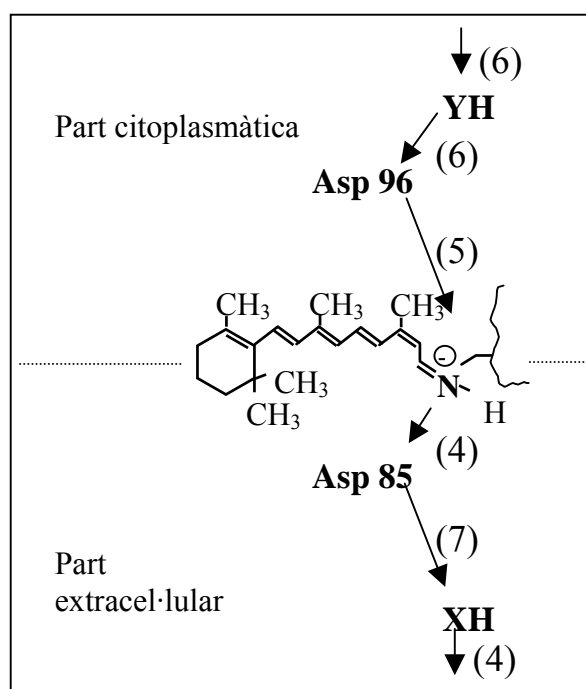


Figura I.12. Esquema dels moviments dels protons que tenen lloc durant el fotocicle de la bR. Els números entre parèntesi assenyalen l'ordre dels aconeteixements i es correlacionen amb els indicats a la figura I.11.

I.6.2. Intermediaris

Els processos importants que es produeixen durant cadascun dels intermediaris es mostren en més detall en la figura I.15.A.

BR: Estat basal de la proteïna abans de començar el fotocicle. El retinal es troba en conformació *tot-trans* ja que primerament la bR haurà estat activada il·luminant-la

durant uns minuts per que s'adapti a la llum. En aquest estat la BS es troba protonada (Siebert et al., 1983; Earnest et al., 1986)

J: Aquest intermediari s'obté als 500 fs després de que el retinal absorbeixi un fotó; aquest és un intermediari difícilment detectable degut a la seva rapidesa. El retinal segueix en conformació *tot-trans* on l'entorn de la BS és similar a l'obtingut a BR, però es produeix una reorganització de la densitat electrònica al retinal entre els enllaços C=C i C-C. Sembla ser que durant aquest intermediari hi hauria una certa torsió de la cadena poliènica del retinal (Atkinson et al., 2000).

K: En el pas de J a K es produeix la isomerització del retinal des de *tot-trans* a *13-cis*, *15-anti* (Kuschmitz et al., 1982; Polland et al., 1984; Mathies et al., 1991; Weidlich et al., 1997; Atkinson et al., 2000; Schobert et al., 2002) diferent de la forma *13-cis*, *15-syn* de la forma adaptada a la foscor (veure secció I.5.2). Aquest és el primer intermediari clarament detectable on la BS continua estant protonada. Durant aquest intermediari es produeixen canvis en la distribució d'electrons al retinal com a conseqüència de la seva isomerització (Siebert et al., 1983; Rothschild et al., 1992).

L: En aquest intermediari es poden veure canvis en l'entorn de l'aspàrtic 96 (Maeda et al., 1992; Le Coutre et al., 1995) que en un principi es va considerar com una desprotonació transitòria d'aquest grup (Briman et al., 1988; Briman et al., 1991, Ormos et al., 1992). Yamazaki et al. (1995) van detectar però, que aquest canvi d'entorn de l'Asp 96 és degut al moviment de molècules d'aigua en l'espai existent entre aquest grup i la BS en isomeritzar-se el retinal. Aquest moviments consisteixen en la relaxació de les hèlices per donar cabuda al nou estat conformacional del retinal (Hayashi et al., 2002).

M: El fenomen més important que té lloc durant aquest intermediari és la desprotonació de la BS (Rotschild et al., 1979; Briman et al., 1987). Mitjançant estudis de fotòlisi de llampec, Siebert et al. (1982) ja van detectar que durant el fotocicle es produïa la protonació/desprotonació de dos grups carboxílics. Com a candidats van proposar l'Asp 85, Asp 96, Asp 212 i el Glu 204. Dollinger et al. (1986) es van apropar més als fenòmens que tenien lloc durant l'intermediari M, indicant que durant aquest

intermediari es protonava un aspàrtic i que a més hi havia involucrat un glutàmic. Va ser més endavant quan es va determinar que el grup que agafava el protó de la BS era l'Asp 85 (Braiman et al., 1988; Stern et al., 1989; Braiman et al., 1991; Fahmy et al., 1992). Metz et al. (1992) van demostrar que l'únic aspàrtic que es protonava durant l'intermediari M era l'Asp 85 negant així la possible protonació de l'Asp 212 que sostenien alguns grups (Ormos et al., 1992; Bousché et al., 1992). L'estudi de l'evolució d'aquest intermediari per la tècnica de fotòlisi de llampec mostra que l'aparició d'aquest intermediari és bifàsica, i és per aquesta raó que es comença a parlar de dos subgrups de M anomenats de diverses maneres: M_{closed} o M_1 per la primera espècie i M_{open} o M_2 per la segona (Váró et al., 1990; Takei et al., 1993) amb uns màxims d'absorbància de 411 nm per l' M_1 i 404 nm per l' M_2 (Zimányi et al., 1992a).

M_1 : Es produeix el primer moviment de protons on la Base de Schiff es desprotona cedint el seu protó a l'aspàrtic 85, fenomen que indueix l'alliberació d'un protó cap a la part extracel·lular (Siebert et al., 1982; Fodor et al., 1988; Ames et al., 1990; Váró et al. 1991a; Braiman et al., 1991) per un grup X (veure secció I.7). La BS es desprotona com a conseqüència de la disminució del seu pK_a des de 12 a 7-8 en passar de L a M que, junt amb l'augment del pK_a de l'Asp 85 des de 2,7 a 7-8, provocaria el traspàs del protó des de la BS a l'Asp 85 (Zimányi et al., 1992b). El model de canvi d'hidratació proposat recentment per Tanimoto et al. (2003) postula que l'aigua 402, que es troba unida simètricament mitjançant pont d'hidrogen, amb l'Asp 85 i 212 a l'estat BR (figura I.14.A), en el pas de L a M passaria a formar un pont d'hidrogen només amb l'Asp 212 provocant un augment en el pK_a de l'Asp 85 i provocant així la seva protonació des de la BS. Aquest model doncs, proposa l'aspàrtic 212 com a grup important per que es pugui donar la protonació de l'Asp 85.

M_2 : El retinal canvia la seva accessibilitat des del costat extracel·lular al costat citoplasmàtic (Váró et al., 1991a; Zimányi et al., 1992a; Subramaniam et al., 1999). Ja Fodor et al. (1988) van proposar el model C-T on un cop es desprotonava la BS aquesta canviava la seva accessibilitat cap al costat citoplasmàtic per tal de poder protonar-se en el pas de M a N. A més d'aquest canvi d'orientació de la BS també es produeixen canvis estructurals (Dencher et

al., 1989; Stern et al., 1989; Koch et al., 1991; Rothschild et al., 1993; Kikukawa et al., 1995). Lazarova et al. (1996) van concretar que aquests canvis es produïen a les hèlices α , els girs reversos i aminoàcids aromàtics. Aquests canvis però, consisteixen més concretament en l'obertura del canal citoplasmàtic que permet l'entrada d'aigües que provoquen la disminució del pK_a de l'Asp 96 en l'intermediari N (Radionov et al., 1996; Radionov et al., 1997; Kamikubo et al., 1997; Vonk et al., 2000; Oka et al., 2002). Els canvis estructurals es va veure que involucraven el moviment dels bucles citoplasmàtics E-F i/o C-D (Steinhoff et al., 1994; Thorgeirsson et al., 1997) Estudis més avançats van determinar que l'obertura es devia a una torsió en les hèlices F i G (Luecke et al., 1999a; Sass et al., 2000; Oka et al., 2000; Oka et al., 2002). Xiao et al. (2000) a més d'aquestes torsions postulen que també hi hauria una rotació de l'hèlix F en el sentit contrari de les agulles del rellotge.

Recentment Lanyi et al. (2002), han establert que efectivament de L a M_1 es produeix la desprotonació de la BS, que de M_1 a M_2 la BS es reorienta cap al costat citoplasmàtic, i estableix un nou subintermediari M_2' en el que s'allibera el protó a l'espai extracel·lular i es produeix una relaxació del retinal exposant-se la BS més cap a la zona citoplasmàtica (figura I.15.A).

N: En el pas de l'intermediari M_2 a N es produeix la reprotonació de la BS a partir de l'Asp 96 (Holz et al., 1989; Butt et al., 1989; Otto et al., 1989; Braiman et al., 1991; Bouché et al., 1991). La desprotonació de l'Asp 96 es produeix gràcies a la disminució del seu pK_a que té lloc quan hi ha una entrada de molècules d'aigua en obrir-se les hèlices a la part citoplasmàtica durant M_2 . Per altra banda la desprotonació del grup X durant M induïx una disminució del pK_a de la BS. Aquests dos fenòmens originen el pas del protó des de l'Asp 96 fins a la BS.

La reprotonació de la BS ve donada per la formació transitiòria d'una xarxa de ponts d'hidrogen entre l'Asp 96 i la BS (Cao et al., 1991; Bouché et al., 1992; Le Coutre et al., 1995; Luecke et al., 1999a; Sass et al., 2000)

O: En el pas de N a O el retinal es reisomeritza per obtenir de nou la conformació *tot-trans* (Smith et al., 1983), i és en aquest moment quan l'Asp 96 es reprotona (Otto et al., 1989; Ames et al., 1990; Bouché et al., 1991) agafant el protó d'un grup Y la identitat

del qual no es troba encara aclarida. Aquest grup s'ha postulat que seria l'Asp 38 localitzat al costat citoplasmàtic (Riesle et al., 1996), encara que altres treballs postulen que els Asp 36, 38, 102 i 104 actuarien com a antena per atreure els protons i que seria l'Asp 36 el que donaria el protó a l'Asp 96 (Brown et al., 1999).

Durant aquest intermediari l'Asp 85 continua protonat (Zscerp et al., 1997), i en el pas de l'intermediari O a l'estat BR l'Asp es desprotona cedint el seu protó al grup X (Bousché et al., 1992).

El pas d'un intermediari a un altre es troba en equilibri com qualsevol altre reacció bioquímica. En el cas del fotocicle, estudis termodinàmics i de fotòlisi de llampec indicarien que tots els passos es trobarien en equilibri excepte pel pas M₁-M₂ i BR-O on la pèrdua de 17 KJ/mol i 11,4 KJ/mol respectivament, fa que siguin uns passos irreversibles (Váró et al., 1991a; Váró et al., 1991b; Friedman et al., 1994). En aquest últim treball proposen també la irreversibilitat del pas BR- K.

1.7. Alliberació del protó

1.7.1. Acoblament de l'Asp 85 i el grup X

Balashov et al. (1995, 1996), van deduir l'existència d'un acoblament entre el pK_a de l'Asp 85 i d'un grup X' a l'estat basal (figura I.13), que podria ser el mateix grup X alliberador del protó. Segons aquest model l'estat de protonació de l'Asp 85 influeix en el pK_a de grup X' i viceversa.

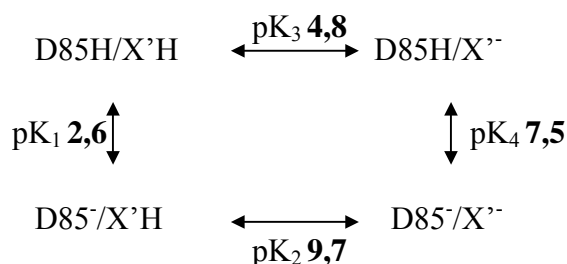


Figura I.13. Esquema del model d'acoblament entre el pK_a de l'Asp 85 i el grup X'H a l'estat basal proposat per Balashov et al. (1995).

El fet de que en el pas de l'intermediari L a M en protonar-se l'Asp 85 es produeixi al mateix temps la desprotonació del grup X fa entreveure que l'acoblament dels pK_a observat a l'estat basal també es produiria durant el fotocicle. De manera que la protonació de l'Asp 85 provocaria la disminució del pK_a del grup X des de 9 a 5,8

(Zimányi et al., 1992b) produint-se la seva desprotonació i la conseqüent alliberació del protó al medi extern. Al mateix temps, la desprotonació del grup X produiria un augment en el pK_a de l'Asp 85 assegurant-se així el seu estat protonat fins al final del fotocicle.

Però, com és possible que residus tan llunyans presentin una relació tan estreta? Estudis de difracció de neutrons (Papadopoulos et al., 1990) i difracció d'electrons (Fischer et al., 1994) van detectar la presència d'alguna molècula d'aigua prop de la BS i aquests autors van suggerir que aquestes podien participar activament en la translocació de protons. Amb la posterior obtenció d'estructures d'elevada resolució es va detectar que la BS es troba connectada amb la part extracel·lular de la proteïna mitjançant una complexa xarxa de ponts d'hidrogen on s'hi troben involucrades varies molècules d'aigua (Kimura et al., 1997; Luecke et al., 1998; Mitsouka et al., 1999; Luecke et al., 1999a; Lanyi et al., 2002) (figura I.14.A).

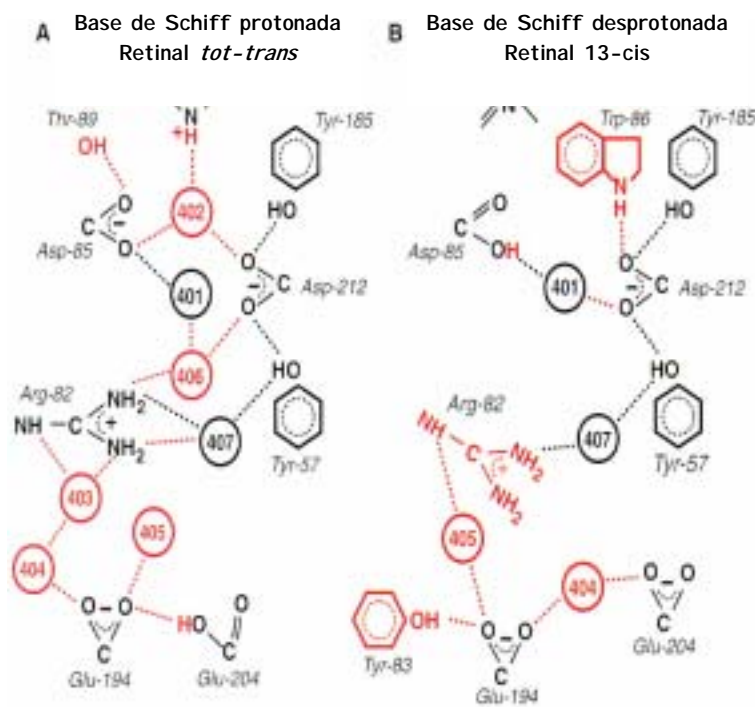


Figura I.14. Representació esquemàtica de la xarxa de ponts d'hidrogen formada per grups i molècules d'aigua, en la part extracel·lular de la bR, en l'estat basal BR (A) i en l'intermediari M (B) (Luecke et al., 1999b). La bR utilitzada ha estat el mutant D96N per tal de poder resoldre l'estructura de l'intermediari M, que en aquest cas es tractaria de l'intermediari M_2 . En vermell es troben marcades aquelles estructures que canvien en els dos intermediaris, per contra, en negre estan indicades les estructures que es mantenen invariables.

Aquesta xarxa seria vital per mantenir la comunicació entre l'Asp 85 i el grup X durant el fotocicle. Belrhali et al. (1999) ja van determinar que la isomerització del retinal des de *tot-trans* a *13-cis* produïa un canvi en el entorn de la BS alterant la xarxa d'aigües que connecten la BS amb la part extracel·lular produint la desprotonació de X. Un parell de mesos més tard es va publicar el treball de Luecke et al. (1999b) on es va obtenir l'estructura del mutant D96N, que en tenir un intermediari M molt llarg permetia el seu estudi per raigs X. D'aquesta manera Luecke et al. (1999b) van estudiar la xarxa de ponts d'hidrogen de la part extracel·lular en l'estat basal de la bR (figura I.14 A), i en l'intermediari M adquirit en el mutant D96N (figura I.14 B). A l'estat basal es pot apreciar com la BS es troba connectada amb els glutàmics 194 i 204 mitjançant una sèrie de molècules d'aigua que junt amb diferents grups forma una complexa xarxa de ponts d'hidrogen.

Una vegada que es desprotona la BS cedint el seu protó a l'Asp 85 en M, l'aigua 402 desapareix i hi ha una reorganització de les molècules d'aigua i dels ponts d'hidrogen produint-se un moviment de l'arginina 82 cap a l'extrem extracel·lular (Gennis et al., 1999) que ja va ser intuït per Brown et al. (1995). L'apropament de l'Arg a l'extrem extracel·lular produiria una disminució en el pK_a del grup X produint-se l'alliberació del protó al medi extern.

Sass et al. (2000) arriben més enllà indicant que l'apropament de l'arginina 82 produiria un canvi conformacional del Glutàmic 204 induint una separació entre els glutàmics i aspàrtics i un canvi en el pK_a del Glu, provocant la seva desprotonació.

1.7.2. Identificació del grup X

Quan s'estudia el procés d'alliberació del protó a un valor de pH del medi entre 5 i 9 es veu que el procés de bombeig és normal, és a dir, primer s'expulsa el protó al costat extracel·lular en M i es capta el protó des del costat citoplasmàtic en el pas de l'intermediari N a O (figura I.15.A). Quan el pH del medi però, es troba entre 5 i 3, el grup X no pot desprotonar-se durant M ja que el medi es troba a un pH per sota del seu pK_a , 5,8. En aquest cas s'observa una inversió en l'ordre d'entrada i sortida del protó, produint-se la sortida del protó en el pas d'O a bR, però no alliberant-se des del grup X sinó directament des de l'Asp 85 (Zimányi et al., 1992b; Govindjee et al., 1996; Balashov et al., 1996) (figura I.15.B). El pK_a del grup X a l'estat basal es troba al voltant de 9, de manera que a pH per sobre de 9 el grup X es trobaria desprotonat i

tampoc podria alliberar el protó durant el fotocicle i l'alliberament del protó també tindria lloc directament des de l'Asp 85 (Govindjee et al., 1996). A pH per sota de 3 no es produeix bombeig de protons com a conseqüència de la formació de membrana blava (Mowery et al., 1979) (veure secció I.8.3).

Aquest fenomen d'inversió en el procés d'entrada i sortida del protó també s'hauria d'observar quan s'inhabilités el grup X. Per exemple, quan es va estudiar aquest procés en mutants de la bR on s'abolia la càrrega positiva de l'Arg 82 es va observar que es produïa una inversió del procés. És per aquest motiu que alguns investigadors van considerar en un principi aquesta arginina com grup X (Mathies et al., 1991; Balashov et al., 1993; Govindjee et al., 1996).

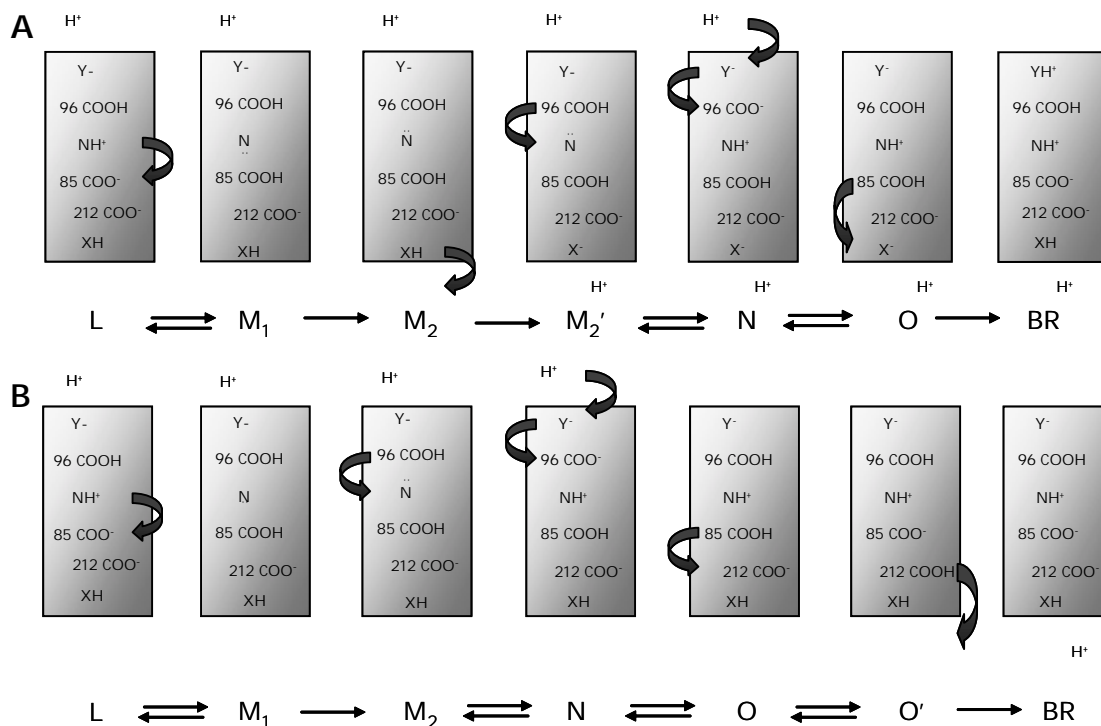


Figura I.15. (A) Esquema del fotocicle de la bR silvestre a pH neutre. (B) Esquema del fotocicle de la bR silvestre a pH àcid. En aquests esquemes es té en compte principalment els estats de protonació/desprotonació del grup Y, l'Asp 96, la Base de Schiff, l'Asp 85, l'Asp 212 i el grup X, els quals són representats en forma de Y⁻, 96 COOH, NH⁺, 85 COO⁻, 212 COO⁻ i XH respectivament. En l'esquema B també hi tindria cabuda el fotocicle que tindria lloc en els mutants dels Glutàmics 194 i/o 204 i de l'arginina 82. Esquema inspirat en Zimányi et al. (1999b).

Més endavant es va observar que quan s'abolia la càrrega negativa del glutàmic 204 també es produïa una inversió en l'expulsió i captació del protó, i per això es va considerar que era el glutàmic 204 el responsable d'alliberar el protó (Brown et al., 1995; Richter et al., 1996; Govindjee et al., 1996). Posteriorment es va veure que

mutacions en el glutàmic 194 també produïen el mateix efecte (Balashov et al., 1997; Dioumaev et al., 1998; Luecke et al., 1998) indicant que el glutàmic 194 també podia ser el grup alliberador o bé una conjugació dels dos glutàmics.

La determinació de l'existència de la xarxa de molècules d'aigua que connecten la BS amb els glutàmics 194 i 204 via arginina 82 ha suggerit que el grup alliberador del protó és una molècula d'aigua d'aquesta xarxa (Rammelsberg et al., 1998; Zscherp et al., 1999; Spassov et al., 2001). Per altra banda, el fet de que la mutació de tants grups produeixi l'efecte d'invertir el procés ha fet que el model més acceptat sigui la consideració de que el grup X no sigui cap grup en concret, sinó un complex compost pels glutàmics 194, 204 i una molècula d'aigua coordinat entre ambdós glutàmics. Es per aquest motiu que el grup X ha passat a anomenar-se CAP, complex alliberador del protó.

La mutació de l'arginina 82, tot i produir la mateixa inversió que els glutàmics 194 i 204, no es troba inclosa dintre del CAP. L'explicació és que en abolir la càrrega positiva de l'Arg 82 es produeix un trencament en la continuïtat de la xarxa de ponts d'hidrogen interrompint així la comunicació entre l'Asp 85 i el CAP (Tanio et al., 1999a). A més, en el cas de que es produïssin ponts d'hidrogen alternatius mantenint-se una correcta comunicació, l'absència de la càrrega positiva de l'Arg 82 no permetria la disminució del pK_a del CAP, ja que és l'apropament d'aquesta càrrega cap al CAP el que produeix la baixada del seu pK_a (Luecke et al., 1999b).

En inhabilitar el CAP no solament es produeix una inversió en la sortida i captació del protó sinó que Zscherp et al. (1997) van observar per FTIR que en mutants del glutàmic 204 es produïa la protonació transitòria d'algun glutàmic o aspàrtic en l'intermediari O com demostrava l'aparició d'una banda positiva a 1713 cm^{-1} . Estudis recents d'infraroig mostren que aquesta banda que apareix tant al mutant E194Q com al E204Q prové de la protonació transitòria de l'Asp 212 des del l'Asp 85 al final del fotocicle (Dioumaev et al., 1999; Zscherp et al., 2001). A la bR silvestre també s'observa aquest fenomen a pH àcids (Zscherp et al., 1997). Així doncs, aquestes dades mostrarien que, en les mostres en que s'ha inhabilitat el CAP, l'alliberació del protó no es donaria directament des de l'Asp 85 sinó que des d'aquest residu es passaria el protó a l'Asp 212 i d'aquí a l'exterior. Aquesta nova espècie amb l'Asp 212 protonat i Asp 85 desprotonat ha sigut anomenat O' (Dioumaev et al., 1999). Estudis recents del nostre grup (Lazarova et al., 2002) mostren que la formació de l'intermediari O' als mutants

E194Q i E204Q depèn de Cl^- , ja que quan hi ha absència d'aquest ió al medi no es produeix l'O', postulant-se que aquest ió podria actuar unint-se al contraió de la BS en aquests mutants.

1.8. Cations i forma blava.

1.8.1. Presència de cations a la bacteriorodopsina

Per mol de bR hi ha units 3-4 mols de Mg^{2+} i 1 mol de Ca^{2+} a pH 6 (Chang et al., 1985), els quals són importants tant per mantenir la funció (Chang et al., 1984; Váró et al., 1989) com l'estructura de la proteïna (Duñach et al., 1989; Heyes et al., 2001).

La presència de cations units a la membrana púrpura es un fet que és amplament acceptat però la localització i l'especificitat d'unió d'aquests és un tema encara no resolt. Una de les teories manté que la unió dels cations a la MP és inespecífica, atrets electrostàticament per les càrregues negatives dels grups superficials de la bR i dels lípids (Szundi et al., 1989; Taneva et al., 1994; Váró et al., 1999). Així doncs encara que a 150 mM de KCl hi ha força quantitat de càrregues negatives apantallades s'ha demostrat que el pK_a intrínsec de la transició púrpura-blau és 1,5-2 (Szundi et al., 1989) comparat amb el valor del pK_a aparent de 2,7 (veure secció I.8.3).

Hi ha moltes evidències però, de que els cations es trobarien units específicament a la bR com són estudis de ressonància paramagnètica de spin (EPR) on es mostra que hi ha 5 llocs d'alta i mitjana afinitat i 5 de baixa afinitat (Duñach et al., 1987). Els llocs de baixa afinitat es trobarien bàsicament a l'extrem C-terminal de la bR ja que experiments de hidròlisi d'aquest extrem amb papaïna mostren la pèrdua d'aquest llocs d'unió (Duñach et al., 1987; Zhang et al., 1993a). La localització dels altres llocs d'unió no es troba resolt. Experiments en els que es fa reaccionar la bR amb ANTSA, molècula que reacciona amb els grups carboxílics inhabilitant-los i afegint tres SO_3^- , mostren que es produeix una disminució en la quantitat de cations units, desapareixent dos llocs d'unió. Aquest fet mostraria que hi ha grups carboxílics involucrats en la unió dels cations (Chang et al., 1986) ja que el fet de que no augmenti el nombre de cations en tractar la bR amb ANTSA indica que aquesta unió no és deu principalment a un efecte electrostàtic ja que el tractament produeix un augment en el nombre de càrregues negatives.

Una altra evidència d'unió específica radica en el fet de que la bO encara i tenir el mateix potencial superficial que la bR, solament té 1-1,5 cations units. Aquest fet

indica que la unió és específica, ja que en el cas contrari en haver-hi el mateix nombre de càrregues negatives s'uniria el mateix nombre de cations (Chang et al., 1986; Duñach et al., 1986; Yang et al., 1995).

Ara bé, estudis realitzats en MP delipidada parcialment, mostren una menor unió de cations a la bR (Griffiths et al., 1996), i aixó podria ser considerat com una evidència de que els cations estarien units als lípids, però aquests autors no ho consideren així ja que mantenen que la delipidació podria produir canvis estructurals a la bR que podria afectar els seus llocs d'unió.

Dades d'EXAFS mostren per altra banda, que al menys el catió de màxima afinitat es trobaria unit a la proteïna i no als lípids ja que el primer radi d'unió del catió mostra la presència d'oxigen i al segon radi es segur que no es detecta cap presència d'àtoms fòsfor o sulfat presents als lípids (Sepulcre et al., 1996).

El fet de que la regeneració de la bR desionitzada amb diferents cations produeixi una diferent estabilitat de la bR front temperatures elevades també reforça la idea d'una unió específica dels cations a la bR (Heyes et al., 2002).

1.8.2. Localització extracel·lular dels cations

La identitat dels grups carboxílics implicats en la unió de cations no es troba encara aclarit. Estudis de NMR però, mostren que al voltant de l'Ala 196 hi hauria localitzat un d'aquest cations (Satoru et al., 1999), tenint com a possible lligand el glutàmic 194, al costat extracel·lular. Estudis d'EPR amb mutants mostren que hi hauria un lloc d'unió de cations proper (a 9,8 Å) al glutàmic 74 localitzat al bucle B-C (Eliash et al., 2001). Estudis recents al nostre laboratori on s'han realitzat experiments d'unió de cations sobre mutants extracel·lulars mostren que hi hauria d'un a dos llocs d'unió a la part extracel·lular a on estarien involucrats els glutàmics 194, 204 per una banda i possiblement el 9 (Sanz et al., 2001).

Tot i tenir evidències importants de la unió específica de cations a la bR, la seva presència no ha sigut resolta en cap de les estructures obtingudes fins la data. El fet de que s'utilitzi detergent per l'elaboració dels cristalls, junt amb el fet de que als cristalls es produeixin interaccions entre els bucles citoplasmàtics i extracel·lulars de diferents bR que no existeixen en l'estat normal, segurament contribueixen a una pèrdua o deslocalització d'aquests cations. En l'elaboració dels cristalls a més s'utilitzen cations

monovalents com el Na^+ i K^+ en comptes de divalents, quedant així més dèbilment units a la bR contribuint també en la dificultat de la seva visualització per raigs X.

1.8.3. Forma blava

La forma blava de la bR s'obté a partir de la bR púrpura on l'aspàrtic 85 es troba desprotonat a l'estat basal (Metz et al., 1992), acidificant el medi. La disminució del pH desplaça el màxim d'absorbància de la bR des de 558 nm a 603, degut a la protonació de l'aspàrtic 85. El pK_a aparent d'aquest grup en 150 mM de KCl és de 2,7, de manera que a valors de pH per sota 3 es va obtenint la forma blava. Aquesta forma presenta un fotocicle alterat amb l'absència de l'intermediari M ja que l'Asp 85 ja es troba protonat. A més la bR blava perd la seva capacitat de bombejar protons (Mowery et al., 1979).

La forma blava i els cations són dos conceptes estretament relacionats, ja que en obtenir-se la bR blava per disminució del pH del medi, els cations units a la proteïna es desplacen produint-se la protonació de l'aspàrtic 85. Quan aquests cations s'extrauen de la proteïna mitjançant desionització (veure secció IV.2.2.2), es produeix un increment en el pK_a de l'Asp 85 des de 2,7 en 150 mM de KCl fins a 5,5. La forma blava obtinguda per la disminució del pH o per desionització de la bR a valors de pH menors de 5,5 s'ha demostrat que són la mateixa espècie (Satoru et al., 1999). La causa de l'increment del pK_a de l'Asp 85 en desionitzar la bR també és un tema encara no aclarit del tot, postulant-se dues hipòtesis. Una d'elles atribueix l'augment del pK_a a un efecte electrostàtic, de manera que en treure els cations es desapantallen les càrregues negatives de la bR augmentant la càrrega superficial negativa de la MP atraient així més els protons i disminuint el seu pH superficial. Així doncs el pH del medi mesurat amb l'elèctrode de pH seria més elevat que el pH real al voltant de la bR (Chang et al., 1986). L'altre hipòtesi manté que els cations tindrien un efecte directe de manera que un d'ells interaccionaria directament amb el contraió de la BS o els seus voltants, o amb la xarxa de molècules d'aigua, regulant el color de la bR (Ariki et al., 1986; Duñach et al., 1986; Jonas et al., 1991; Zhang et al., 1992). Molt probablement, els dos mecanismes actuarien simultàniament.

La formació de la bR blava és un procés reversible ja que quan s'afegeixen cations sobre mostres desionitzades es recobra el color púrpura, encara que depenent del catió amb el qual es produeix la regeneració les característiques funcionals de la bR poden canviar. Els cations Na^+ i K^+ tenen aquesta capacitat de regenerar la bR púrpura amb canvis mínims en la funcionalitat de la proteïna encara que s'ha d'afegir de 50 a

100 vegades més quantitat d'aquest cations que de cations divalents per restaurar la forma púrpura (Kimura et al., 1984, Chang et al., 1985). Aquest fet també indicaria que la unió de cations no es deu solament a un efecte electrostàtic ja que en aquest cas només seria necessari duplicar el nombre de cations monovalents per igualar el nombre de càrregues positives que quan s'afegeixen els divalents. A més, els cations monovalents es troben més dèbilment units ja que només rentant la bR amb aigua destil·lada tres o quatre vegades s'obté bR blava.

Si es tractés simplement d'un efecte electrostàtic, qualsevol catió hauria de tenir el mateix efecte, però això no és així ja que quan s'addiciona Hg^{2+} o Pt^{4+} sobre bR blava no es pot restaurar la forma púrpura. Fins i tot quan s'afegeixen ions Hg^{2+} a la membrana púrpura aquesta es va tornant blava com a conseqüència del desplaçament d'alguns ions Ca^{2+} i/o Mg^{2+} dels seus llocs d'unió. Aquest efecte es deu a que dels 7 llocs de baixa afinitat d'unió que té el mercuri a la bR, només comparteix 3 amb el calci i/o magnesi on es donaria competència d'unió (Duñach et al., 1988). Entre aquest tres llocs d'unió es troba el lloc o llocs que controlen el color de la bR, però un cop s'ha unit el mercuri no es torna púrpura la proteïna. Aquest fet podria ser degut que el mercuri tindria un complex d'unió diferent a l'octaèdrica, present en els cations regeneradors (Ariki et al., 1986).

1.9. Altres formes de la bacteriorodopsina

1.9.1. Forma púrpura àcida

Quan es continua baixant el pH del medi per sota de 2 comença a aparèixer una espècie diferent de la bR blava; aquesta nova forma és l'anomenada bR púrpura àcida, bR_a . Aquesta espècie rep aquest nom perquè el seu espectre d'absorbància presenta un màxim a 565 nm, bastant proper a la bR púrpura a pH neutre (558 nm). Mowery et al. (1979) van detectar que perquè es formés aquesta espècie era necessària la presència d'elevada concentració de sal. En un altre estudi es mostrava que la part de la sal necessària per a la formació de bR_a eren els anions i no els cations ja que quan menor era el radi del anions involucrats més s'afavoria la formació de bR púrpura àcida (Fischer et al., 1979). Aquest grup sostindria que la nova espècie no es formaria com a conseqüència directa del pH sinò pel fet de que en disminuir el pH del medi s'afavorís la unió dels anions. Renthall et al. (1990) proposen que la unió del Cl^- es donaria a prop

de la arginina 82 el qual trencaria el seu pont d'hidrogen amb l'Asp 212, provocant la seva lateralització.

El pK_a de la forma púrpura àcida té un valor de 0,5 (Mowery et al., 1979; Kimura et al., 1984) i no es veu afectat per la desionització de la bR de manera que Kimura et al. (1984) proposen que la formació de la bR_a es deu a la protonació d'un segon grup més que no la unió d'un anió.

Estudis més recents de FTIR indiquen que en la forma bR_a el Cl⁻ es trobaria unit al contraió format per l'Asp 85, l'Arg 82 i Asp 212, i que la unió d'aquest anió produeix la protonació de l'Asp 212. Així doncs la protonació d'aquest grup a la bR_a es produeix paral·lelament a la unió de l'anió (Kelemen et al., 1999) fet que es dona sempre i quan l'Asp 85 ja es trobi protonat. Per altra banda, estudis de fotocorrents indiquen que la bR_a o bé podria bombejar ions clor o que la presència de Cl⁻ fes que aquesta forma pogués bombejar protons (Wang., 2000).

1.9.2 Forma vermella

Quan s'incrementa el pH del medi d'una suspensió de bR per sobre de 11,8 i es baixa ràpidament el pH, s'obté una espècie amb un màxim d'absorció a 440 nm (Muccio et al., 1979) que es formaria com a conseqüència de l'exposició de la Base de Schiff a un entorn aquós. Quan es sobrepassa el pH 11,3 apareix una nova espècie amb un màxim d'absorbància a 480 nm (forma vermella) que d'acord amb estudis de ressonància de Raman (Druckmann et al., 1982) tindria una BS desprotonada. Aquesta desprotonació és reversible sempre i quan no es pugi el pH per sobre de 12, ja que és en aquest moment quan es comença a desnaturalitzar irreversiblement la bR. El pK_a de la formació de l'espècie vermella es troba per sobre de 12,1 en 16 mM KCl (Balashov et al., 1991)

1.10. Estructura de la bacteriorodopsina a la part extracel·lular

1.10.1. Xarxa d'aigües

La xarxa de ponts d'hidrogen existent entre la BS i el CAP és de vital importància per al correcte funcionament de la bR (veure la secció I.7.1). En el manteniment d'aquesta xarxa hi estan involucrats molts grups i molècules d'aigua. Són moltes les mutacions que s'han realitzat en aquesta zona (Arg 82, Glu 9, 74, 194 i 204,

Tyr 57, etc) que produeixen canvis importants tant en el pK_a de l'Asp 85 com en la funcionalitat de la bacteriorodopsina.

Observant, però, els grups implicats en el manteniment de la xarxa d'aigües, es pot apreciar que hi ha un grup, la tirosina 79 (figura I.16), que mitjançant ponts d'hidrogen comunica l'Arg 82 amb el glutàmic 194 a més de comunicar els residus 9 i 7 de l'hèlix A. Sembla que aquesta tirosina pot jugar un paper important en el manteniment de la xarxa de ponts d'hidrogen tal i com mostra la seva posició central en la xarxa. La inhabilitació d'aquest grup podria produir efectes similars als observats quan s'anul·la la càrrega positiva de l'arginina 82 (veure la secció I.7.2).

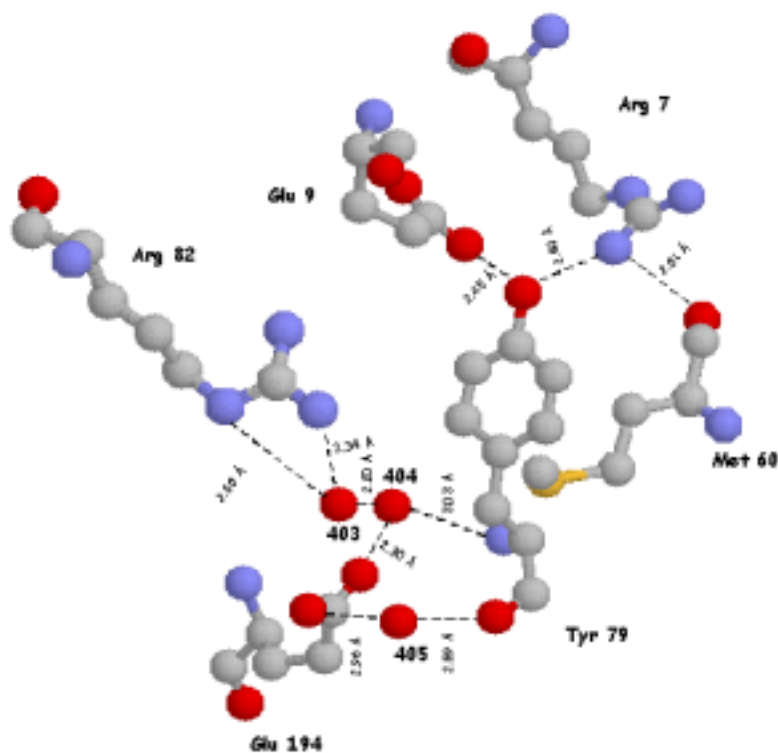


Figura I.16. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen al voltant de la tirosina 79. La posició de l'arginina 82 ha sigut desplaçada per tal de que es pogués veure clarament els seus ponts d'hidrogen amb l'aigua 403. En vermell estan representats els àtoms d'oxigen, en blau els de nitrogen i en groc el de sofre. Estructura resolta per Luecke et al. (1999a).

L'Arg 7 junt amb el Glu 9 es troben formant un pont d'hidrogen amb la Tyr 79, i l'arginina a més es troba formant un altre pont d'hidrogen amb la Met 60 de l'hèlix B. Observant la disposició de les hèlices de la bR representades a la figura I.7. es veu que l'hèlix B es troba lleugerament inclinada cap a l'hèlix A a l'extrem extracel·lular.

Aquest apropament podria estar induït per ponts d'hidrogen entre les dues hèlices entre les quals pot contribuir el pont d'hidrogen format entre l'Arg 7 i la Met 60.

Hi d'altres grups, però, que encara no han sigut suficientment estudiats. Un d'ells és la serina 193 que com es pot observar a la figura I.17 està formant un parell de ponts d'hidrogen amb el glutàmic 204 i amb l'aigua 420. El fet de que aquesta serina interaccioni amb els dos components de CAP, el glutàmic 194 i el 204, podria indicar la importància d'aquest residu en el manteniment de la correcta geometria entre els dos grups i per tant preservar la seva funcionalitat.

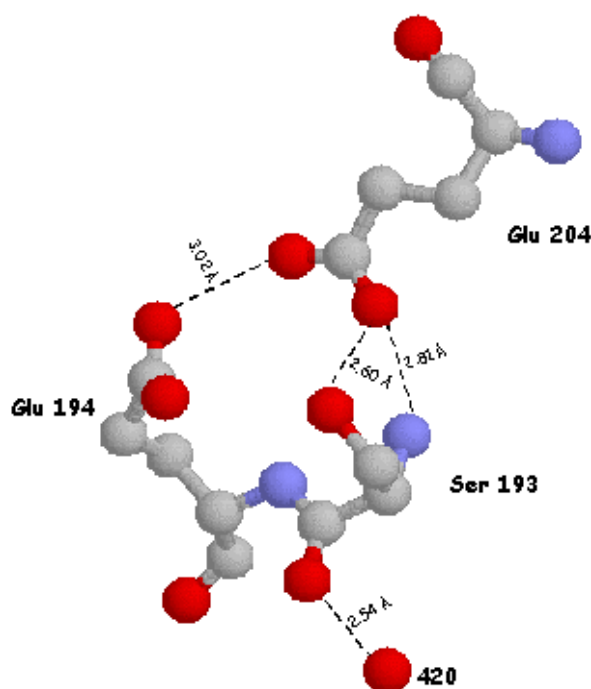


Figura I.17. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen presents al voltant de la serina 193. En vermell està representat els àtoms d'oxigen i en blau els de nitrogen. Estructura resolta per Luecke et al. (1999a).

1.10.2. Prolines extracel·lulars

A l'extrem extracel·lular de la bacteriorodopsina es pot observar la presència de tres prolines; 8, 77 i 200; que, com s'observa a la figura I.18. A i B, formen com una espècie de butxaca que conté quatre molècules d'aigua (aigües 415, 416, 417 i 418). Estudiant més en detall aquesta estructura, s'observa que hi ha una sèrie d'interaccions per ponts d'hidrogen entre aquestes aigües i grups propers (figura I.20).

En un principi es creia que el grup radical de les prolines no podia formar ponts d'hidrogen, però recentment (Chakrabarti et al., 1998) s'ha observat la possibilitat de que l'hidrogen del C δ pugui formar aquests enllaços (figura I.19). En el cas d'aquestes prolines sembla ser que no formarien cap pont d'hidrogen amb les aigües ja que la distància és massa gran. La prolina 200, però, podria formar un pont d'hidrogen amb el glutàmic 204, encara que no amb el seu C δ sinó que amb l'oxigen del seu enllaç peptídic.

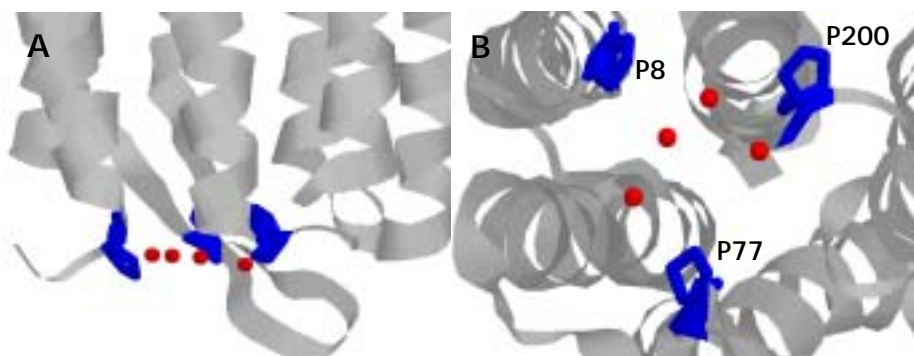


Figura I.18. (A) Posició de les prolines extracel·lulars 8, 77 i 200 en blau, i de quatre molècules d'aigua en vermell. En gris es troba representat l'esquelet de la bacteriorodopsina. (B) Visió des del costat extracel·lular, on es pot apreciar més clarament les posicions de les aigües respecte a les prolines. Estructura resolta per Luecke et al. (1999a).

Així doncs, encara que les prolines potser no estarien interaccionant directament amb les molècules d'aigua, sí que podrien tenir la funció de mantenir la correcta conformació dels grups que interaccionen amb les aigües com són el glutàmic 9 o la leucina 201, ja que les prolines són grups que contenen com a grup radical un anell pirrolidina. Aquest anell té la capacitat de restringir la geometria de l'esquelet de la cadena polipeptídica podent produir en ocasions canvis importants en la direcció de la cadena. L'enllaç peptídic té la característica de poder-se trobar en conformació *trans* o *cis*; degut a la repulsió de càrregues, la conformació *cis* és menys favorable que la forma *trans* en general a les proteïnes. En el cas de les prolines però, la configuració *cis* té la mateixa probabilitat d'aparèixer que la forma *trans* degut a que el nitrogen amídic forma part d'un anell pirrolidina de la prolina. Per aquests motius doncs, les prolines són capaces de generar torsions en la cadena polipeptídica.

Sovint les prolines estan involucrades en la formació de torsions més importants (Visiers et al., 2000) si en referència a la posició de la prolina, "i", hi ha una serina o una treonina en posició i-1 o i-2 (Govaerts et al., 2001). Aquestes condicions es reuneixen

tres cops en la bacteriorodopsina: les prolines 50, 91 i 186 en les hèlices B, C i F del costat citoplasmàtic que produeixen unes torsions necessàries per la reprotonació de la BS a partir de l'Asp 96 (Zhang et al., 1993b).

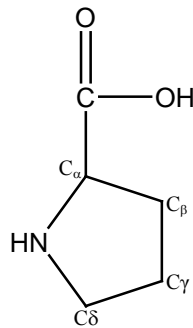


Figura I.19. Estructura de la prolina.

En el cas de les prolines 8, 77 i 200 no es dóna la condició de ser prolines interiors de l'hèlix, de manera que la seva possible funció podria ser, com s'ha mencionat anteriorment, el manteniment d'una conformació adequada al voltant de les molècules d'aigua.

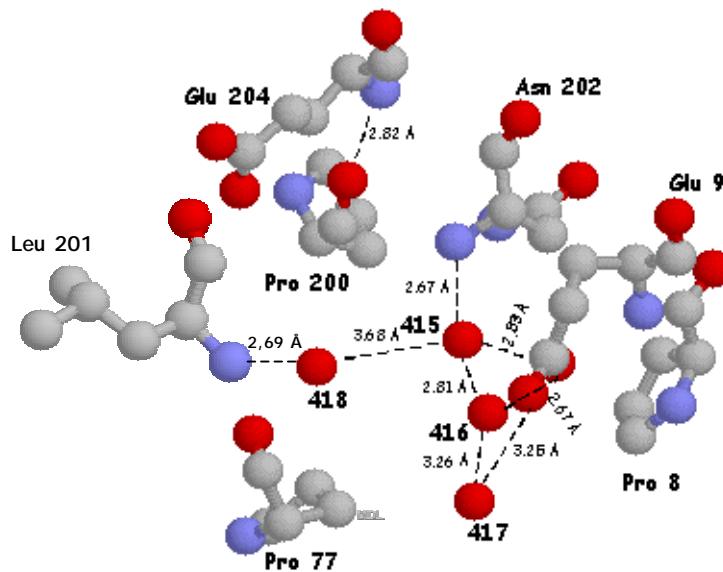


Figura I.20. Detall de les possibles interaccions de les molècules d'aigua i de les prolines en la part extracel·lular. La posició de la leucina 201 ha estat desplaçada per tal de poder observar clarament la seva interacció amb l'aigua 418. Estructura resolta per Luecke et al. (1999a).

I.10.3. Relació entre el costat extracel·lular i citoplasmàtic

La disposició centrada del retinal en la proteïna divideix la bR en dues zones, la part citoplasmàtica i la extracel·lular. Tot i que a cada intermediari del fotocicle s'atribueixen fenòmens concrets que succeeixen separadament en cadascuna d'aquestes parts, al llarg de tots aquests anys d'estudi de la bacteriorodopsina s'han anat detectant algunes evidències d'interaccions entre els dos costats de la proteïna (Tanio et al., 1999b; Alexiev et al., 2000).

Estudis recents del nostre laboratori han suggerit la possibilitat d'una relació a llarga distància entre el Glu 194, allotjat al costat extracel·lular, i l'Asp 96 allotjat al citoplasmàtic. Per exemple, dades d'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR) sobre el mutant E194Q mostren que a pH bàsics l'intermediari M és quasi absent obtenint-se sobretot L i N (Lazarova et al., 2000). Aquest fet doncs indica que en mutar el Glu 194 per una Gln es produeix una desprotonació prematura de l'Asp 96. Aquests resultats doncs semblen indicar que es produeix una relació a llarga distància entre aquests dos grups.

Per altre costat l'intermediari N del mutant E194Q, a més de presentar l'Asp 96 desprotonat, característica típica d'N, també presenta una desprotonació de l'Asp 85 (Lazarova et al., 2000). Com que ambdós grups es troben desprotonats i la Base de Schiff protonada, a simple vista es podria deduir que és l'aspàrtic 96 el que es deprotona precoçment cedint el seu protó a la BS. Aquesta deducció no és tan clara però, ja que podria ser el propi protó de l'Asp 85 el que reprotoqués la BS.

II. OBJECTIUS

Una de les qüestions sense resoldre sobre la bacteriorodopsina és el mecanisme d'expulsió del protó al costat extracel·lular. A més de l'Arg 82, i els Glu 194 i 204 presents a la zona extracel·lular, hi ha altres grups que participen no tan sols en l'establiment de la xarxa de ponts d'hidrogen que connecta aquesta regió amb la BS sinó que a més en l'establiment de xarxes secundàries, per exemple, la serina 193, el triptòfan 79, l'arginina 7 i el glutàmic 9. A la part extracel·lular de la bR, a més d'aquests grups participants en la xarxa de ponts d'hidrogen, es pot observar una interessant disposició de les prolines 8, 77 i 200, que suggereix que poden jugar un paper important en la disposició de les aigües. Aquestes prolines es troben formant una espècie de butxaca on hi ha incloses una sèrie de molècules d'aigua.

Una altra qüestió no resolta és la relació entre els aconteixements que succeeixen a la regió extracel·lular i citoplasmàtica. Aquest és un tema de gran interès per tal de poder entendre molts processos que tenen lloc durant el fotocicle a la bR. Una d'aquestes possibles relacions podria ser la establerta entre l'Asp 96 i el Glu 194.

A partir d'aquestes consideracions, els objectius específics van ser:

- 1.- Anàlisi del paper dels grups formadors de ponts d'hidrogen en la regió extracel·lular, mitjançant la construcció dels mutants S193A, Y79F, R7E/E9R. Estudi del fotocicle i del mecanisme d'alliberament del protó, i comparació de l'estabilitat d'aquests mutants amb la proteïna silvestre.
- 2.- Anàlisi del paper de les prolines 8, 77 i 200 en relació amb la disposició de les aigües a la part extracel·lular de la bR, mitjançant la construcció de mutants d'aquestes prolines. Estudi del fotocicle i del mecanisme d'alliberament del protó, i comparació de l'estabilitat d'aquests mutants amb la proteïna silvestre.
- 3.- Estudi de la relació a llarga distància entre l'Asp 96 i el Glu 194 mitjançant la construcció i estudi biofísic dels mutants D96N, D96N/E194Q i E194Q.

III. MATERIALS i MÈTODES

III.1. Material biològic emprat

III.1.1. Soques bacterianes

Per a l'obtenció de les bR mutants s'han emprat dues espècies bacterianes diferents: *Escherichia coli* i *Halobacterium salinarum*. La primera espècie és utilitzada com a eina per dur a terme tots els processos de tecnologia del DNA recombinant necessaris per a l'obtenció de bR mutants, ja que en aquesta espècie la metodologia està més ben descrita i perquè és un bacteri de ràpid creixement, amb un temps de duplicació de 20 minuts en comparació amb les 8-10 hores de *H.salinarum* (Oesterhelt et al., 1974a). La segona espècie és utilitzada per a l'expressió de la bR en el seu entorn natural.

Les soques que s'han utilitzat són:

D'*E.coli*:

TG1: El seu genotip és: *supE hsdA5 thiA (lac-proAB) F'[tra D36 proAB⁺ lacI^q LacZAM]* no modifica el DNA i permet la selecció mitjançant el sistema β -galactosidasa.

D'*H.salinarum*:

L33: Aquesta soca té insertat al gen de la bacteriorodopsina, gen *bop*, l'element mòbil ISH2 (DasSarma et al., 1984; Pfeifer et al., 1984) que impedeix la seva expressió. Per tant és una soca bR⁻, no produeix membrana púrpura, fet necessari per a poder expressar les bR mutants mitjançant plàsmid.

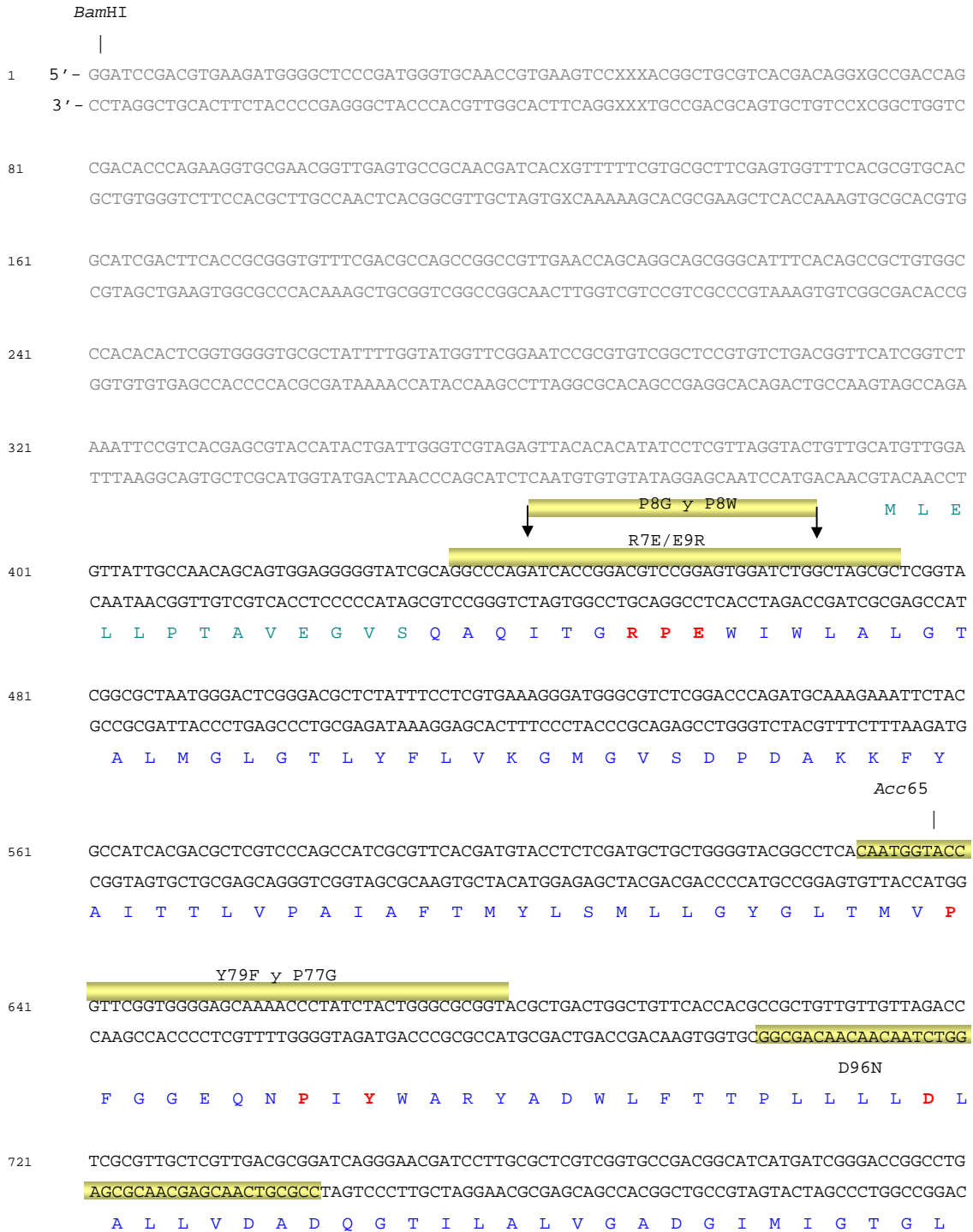
S-9: A partir d'aquesta soca s'extrau la bR nativa utilitzada com a control en tots els estudis fets a bR mutants. És una soca modificada on s'ha eliminat la capacitat de l'halobacteri de produir vacuoles gasíferes i altres pigments diferents de la bR que dificulten la feina d'extracció de la proteïna. A més aquesta soca posseeix un elevat rendiment de producció de membrana púrpura afavorint l'obtenció de gran quantitats de bR en cada extracció.

III.1.2. Gen *bop*

El gen de la bacterioopsina, gen *bop*, va ser proporcionat pel Dr. Needleman (Wayne State University School of Medicine) clonat al plàsmid pSELECTTM-1q (promega). El gen es troba comprés en un fragment de 1,2 Kbases entre les dianes

*Bam*HI i *Hind*III. El fragment va ser extret d'aquest plàsmid i clonat en els plàsmids especificats a l'apartat III.1.3.

La seqüència nucleotídica d'aquest gen està descrita al Genebank i correspon a Dunn et al. (1981) A la figura III.1 es troba representada la seqüència tant nucleotídica del gen *bop* com l'aminoacídica de la proteïna.



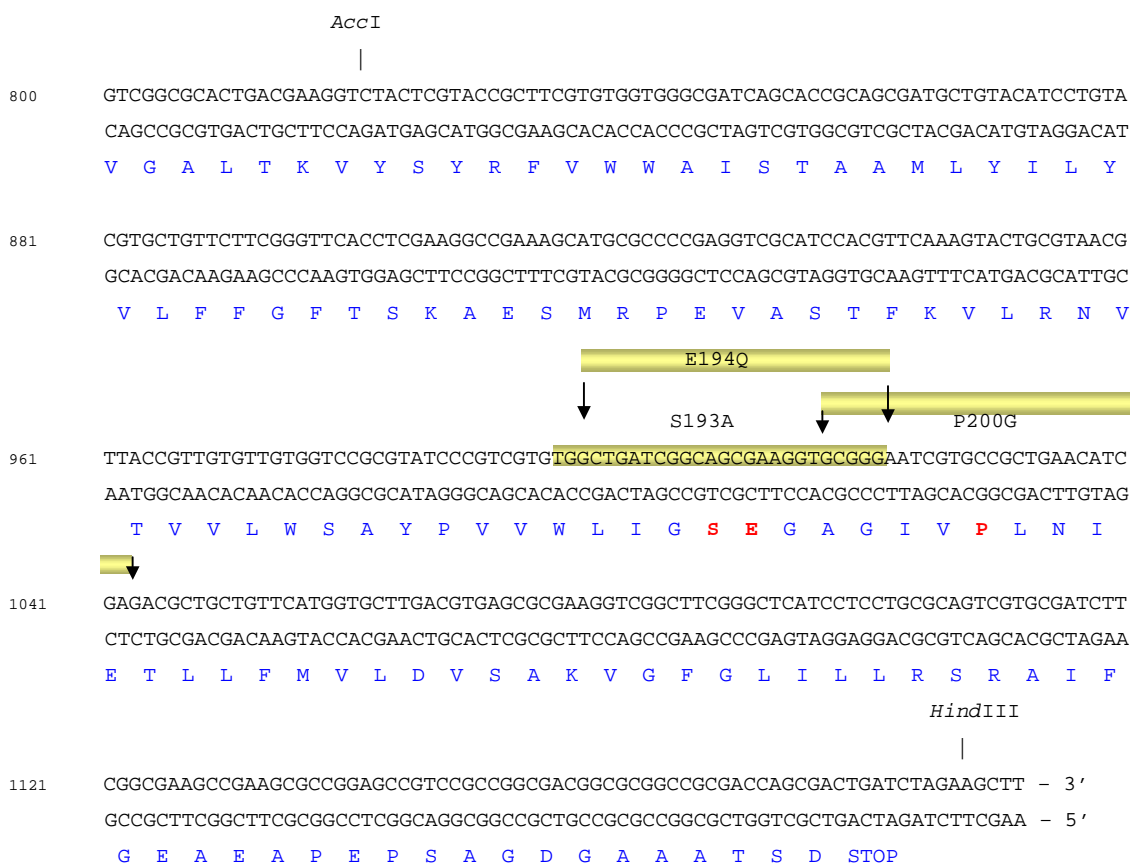


Figura III.1. Seqüència del fragment de 1,2 Kb que conté el gen de la bacteriorodopsina. La seqüència nucleotídica en negre correspon a la seqüència coneguda i en gris a la zona clonada seqüenciada al nostre laboratori. Les lletres en blau corresponen a la seqüència aminoacídica de la bR, les verdes són els aminoàcids escindits durant el processament del precursor de la bR (Dunn et al., 1981, veure secció I.3.2). En vermell es troben indicats els aminoàcids que s'han mutat en aquest treball. Els requadres grocs es corresponen a la zona d'oligonucleòtids mutagènics utilitzats per construir les bR mutants (veure secció III.2.1.).

III.1.3. Vectors

pUCBM20: És un plàsmid derivat del pUC18 que té afegit un lloc de múltiple inserció (figura III.2.A). Aquest plàsmid confereix al portador resistència a l'antibiòtic ampicilina i conté un fragment del gen *lacZ* d'*E.coli*, permetent així una selecció de les colònies transformants per al gen mitjançant el sistema β -galactosidasa. La resistència a ampicilina ve donada per l'expressió del gen de la β -lactamasa, clonat al plàsmid, encarregada de degradar l'antibiòtic.

pXL: Plàsmid llançadora cedit pel Dr. Needleman (Wayne State University School of Medicine). És un plàsmid d'expressió en *H.salinarum* que es capaç de replicar-se també en *E.coli*. Confereix resistència als antibiòtics novobiocina i tetraciclina (figura III.2.B). Aquest plàsmid posseeix el lloc de múltiple

restricció pSELECT™-1, facilitat així el clonatge del gen *bop*. En aquest cas la selecció de colònies transformants també està facilitada pel sistema β -galactosidasa. La resistència a tetraciclina ve donada per l'adquisició d'impermeabilitat de la membrana cel·lular a l'antibiòtic impedit la seva entrada dintre de la cèl·lula. La resistència a novobiocina ve donada per l'expressió d'una subunitat B de la DNA girasa resistent, on no es pot unir l'antibiòtic (veure secció III.1.4.c).

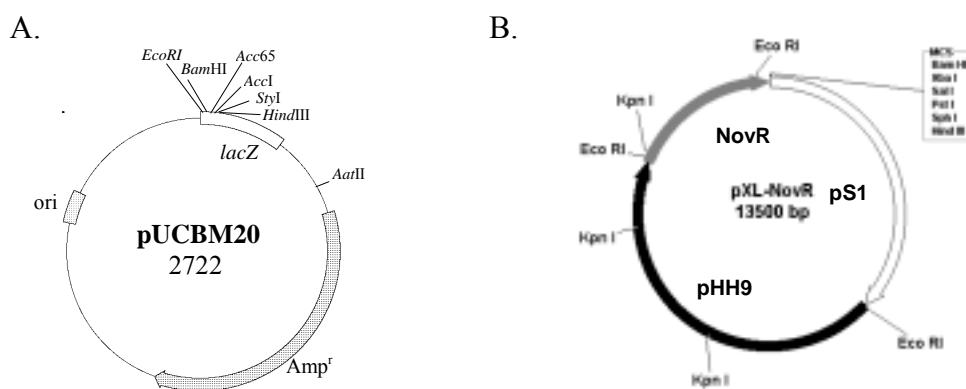


Figura III.2. Esquema dels plàsmids pUCBM20, A; y pXL, B.

III.1.4. Medis de cultiu i antibiòtics utilitzats

a) Medi de cultiu de *E.coli*

Medi líquid 2YT:	Bactotripton	16 g
	Extracte de llevat	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O destil·lada	q.s.p 1l

Medi agar LB:	Bactotripton	5 g
	Extracte de llevat	2,5 g
	NaCl	5 g
	Bactoagar	7,5 g
	H ₂ O destil·lada	q.s.p 500 ml

Les plaques són suplementades amb 50 μ g/ml de ampicilina o 15 μ g/ml de tetraciclina depenent del plàsmid que es vulgui seleccionar. A més es suplementen amb 24 μ g/ml d'IPTG i 40 μ g/ml de X-Gal per tal de poder

seleccionar les colònies que portin el plàsmid amb l'insert, segons el sistema de β -galactosidasa (Sambrook et al., 1989).

b) Medi de cultiu de *H.salinarum*

Medi C:	NaCl	250 g
	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	20 g
	Citrat sòdic	3 g
	KCL	2 g
	CaCL ₂	0,2 g
	Tris 2M (pH 7,2)	25 ml
	Triptona	5 g
	Extracte de llevat	3 g
	H ₂ O	q.s.p 1l

Per fer les plaques s'afegeix 15 g de bactoagarosa i es suplementa amb 150 g de sacarosa i l'antibiòtic novobiocina (0,3 μ g/ml). El pH s'ajusta a 7,2.

c) Antibiòtics.

*Ampicilina: aquest antibiòtic s'utilitza per seleccionar aquelles cèl·lules de la soca de *E.coli* TG1 que continguin el plàsmid pUCBM20. La concentració de treball és de 50 μ g/ml. És un antibiòtic bactericida que actua inhibint la síntesi de peptidoglicà de la paret bacteriana.

*Tetraciclina: antibiòtic utilitzat per a la selecció de cèl·lules de TG1 transformants per al plàsmid pXL. La concentració de treball és de 15 μ g/ml. És un antibiòtic bacteriostàtic, que actua unint-se a la subunitat 30S del ribosoma impedit la unió de l'ARNt i la traducció de l'ARNm, inhibint així la síntesi de proteïnes.

*Novobiocina: emprat per a la selecció de bacteris de *H.salinarum* que continguin el plàsmid pXL. La concentració de treball en medi líquid és de 1 μ g/ml i en placa de 0,3 μ g/ml. És un antibiòtic bacteriostàtic que actua unint-se i inhibint la subunitat B de la DNA girasa impedit així la replicació del DNA.

III.1.5. Cultiu i conservació bacteriana

a) Cultiu bacterià: El cultiu tant d'*E.coli* com d'*H.salinarum* es realitzen sota condicions d'esterilitat per tal d'evitar possibles contaminacions.

E.coli: Les cèl·lules són inoculades en medi 2YT o LB i s'incuben a 37° C i agitació de 300 r.p.m. (Braun Centromat) durant unes 12 hores. Quan es fa el sembrat sobre placa aquestes en mantenen a l'estufa també a 37° C i en absència d'agitació. L'antibiòtic utilitzat serà tetraciclina o ampicilina si les cèl·lules són portadores d'algun dels plàsmids (veure secció III.1.3.)

H.salinarum:

* Escalat de creixement: Les cèl·lules procedents d'una colònia o glicerinat són inoculades en 2 ml de medi hipersalí C i s'incuben a 39° C i 300 r.p.m. en presència de novobiocina quan es tracti d'un mutant i per tant porti el plàsmid pXL (veure secció III.1.3). Un cop que han crescut les cèl·lules (5-6 dies) s'inoculen els 2 ml en 250 ml de medi C. Quan aquest arriba a una OD₅₅₀ de 0,8, són inoculades en 10 l de medi C per produir massivament membrana púrpura.

*Producció de membrana púrpura: El cultiu es realitza en un erlenmeyer de 20 l amb 10 l de medi C en absència aquest cop de novobiocina ja que l'antibiòtic inhibeix la producció de bacteriorodopsina. La temperatura es manté sobre els 39° C mitjançant un focus Philips Spotone de 120 W, amb agitació magnètica i aireació amb una bomba (Model 7530-50, Cole-Parmer Instrument Company) d'uns 228 l/min. El cultiu es realitza en presència d'il·luminació per induir la síntesi de MP. Quan el cultiu arriba a la fase estacionària (OD₆₀₀ 1,5) es retira el subministrament d'aire i es manté la il·luminació durant cinc dies, temps establert com a òptim per induir la màxima producció de membrana púrpura. Passats aquest dies es procedeix a l'extracció de la MP (veure secció III.3.1).

b) Conservació dels cultius

*En placa o líquid: *E.coli* es conserva sota aquestes condicions a 4° C durant un màxim de deu dies, mentre que *H.salinarum* es pot conservar fins a un mes.

*Glicerinat: Ambdues espècies bacterianes poden ser guardades a -80° C en un 15 % de glicerol durant anys.

III.2 Tècniques de DNA recombinant

III.2.1 Mutagènesi dirigida per PCR

Mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'han introduït mutacions puntuals en el gen *bop*. Aquest mètode està basat en el de Landt et al. (1990), i s'ha seguit el procediment descrit per Juncosa et al (1994).

Partint del dsDNA motlle, es necessiten dos encebadors, oligonucleòtids, que es trobin en sentit invers i confluent de la regió a mutar. Depenent del lloc de mutació dins del gen *bop* s'utilitzen uns motlles i encebadors diferents; depenent de llur posició relativa s'ha de fer una o dues rondes de PCR:

Motlles:

pUCBM20-*bop*: Plàsmid en qual hi ha subclonat el gen *bop* sencer comprés entre las dianes *Bam*HI i *Hind*III.

pUCBM20-*bop*^{*Bam*HI-*Acc*65}: A aquest plàsmid es té subclonat el fragment del gen *bop* comprés entre las dianes de restricció *Bam*HI i *Acc*65.

pUCBM20-*bop*^{*Acc*65-*Hind*III}: A aquest plàsmid es té subclonat el fragment del gen *bop* comprés entre las dianes de restricció *Acc*65 i *Hind*III.

Encebadors:

Oligonucleòtid mutagènic: per al disseny de l'oligonucleòtid mutagènic s'ha tingut en conte l'ús de codó de *H.salinarum* i que la mutació estigués flanquejada per 13-15 nucleòtids en cada un dels seus extrems per assegurar la correcta hibridació del oligonucleòtid al DNA motlle (veure oligonucleòtids de la figura III.1).

Oligonucleòtids universals:

Fup: "Forward universal primer". Hibrida en una regió del plàsmid immediatament posterior a l'extrem 3' del fragment d'1,2 Kbases clonat i en la cadena superior.

Rev: "Reverse universal primer". Hibrida en una regió del plàsmid immediatament anterior a l'extrem 5' del fragment d'1,2 Kbases clonat i en la cadena inferior.

Rondes de PCR: Depenent del lloc del gen en el que es vol introduir la mutació s'ha de realitzar una sola ronda de PCR o bé dues.

Una sola ronda: Quan la mutació s'ha d'introduir en un extrem del gen o dels fragments clonats en el plàsmid pUCBM20, de manera que amb una sola PCR s'amplifica tot el gen o fragment. Com a exemple, a la figura III.1, els oligonucleòtids dels mutants P77G i Y79F tenen el seu extrem 5' solapat amb la diana de restricció ACC65, de manera que solament seria necessària una sola ronda de PCR amplificant la zona des de ACC65 fins a HindIII i després empalmant-lo amb el fragment des de BamHI i ACC65 mitjançant digestió, (veure secció III.2.2.1) i lligació dels fragments (veure secció III.2.2.2).

Dues rondes: quan el lloc d'introducció de la mutació es troba a la meitat del fragment del gen *bop* (figura III.3) s'ha de realitzar una primera PCR on s'utilitza el encebador mutagènic i l'encebador universal de l'extrem oposat, encebador 1, amplificant-se així només una part del gen. En la segona PCR s'utilitza com encebador el resultat de la 1^a PCR i l'encebador universal de l'altre extrem, encebador 2, el resultat d'aquesta PCR és l'amplificació del fragment sencer que estava clonat en el DNA motlle amb la mutació introduïda.

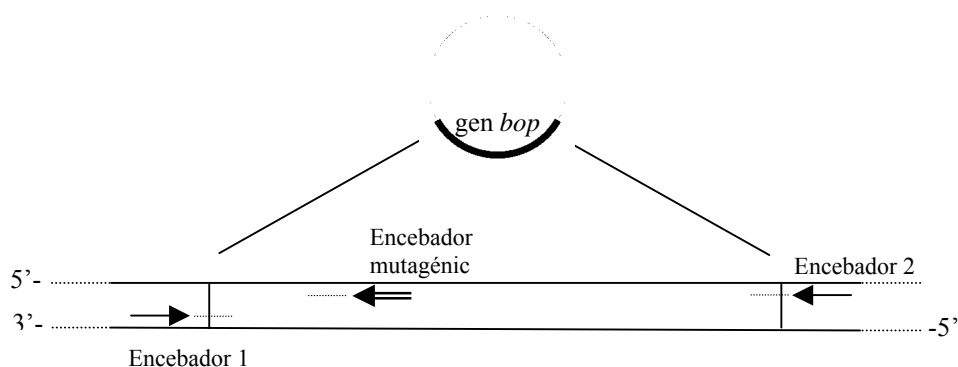


Figura III.3. Esquema dels oligonucleòtids que s'han d'utilitzar quan la mutació a introduir es troba en la meitat del gen i s'han de realitzar dues rondes de replicació.

Com a exemple, a la figura III.1, els mutants D96N i P200G s'haurien de realitzar mitjançant dues rondes de PCR ja que no es solapen amb cap extrem del gen clonat.

La DNA polimerasa utilitzada ha sigut la pfx platinum (New England Biolabs) la qual té com a principal característica que la seva activitat polimeritzadora no s'activa fins que s'arriba als 95° C, d'aquesta manera no és necessari començar la PCR amb un "hot start". El termociclador utilitzat ha estat

el PCR-Minicycler, i els diferents additius afegits a cadascuna de las PCRs estan indicats a la taula III.1.

Taula.III.1. Components afegits a cada PCR.

	Primera PCR	Segona PCR
Tampó 10 X pfx	5 µl	5µl
DNA motlle (10 ng/µl)	2 µl	2µl
Encebador mutagènic (5 pmol/µl)	4 µl	--
1 ^{er} encebador flanquejant (5pmol/µl)	4 µl	--
2 ^{on} encebador flanquejant (5 pmol/µl)	--	4 µl
Producte 1 ^{era} PCR	--	15 µl
Nucleòtids (10 mM)	1 µl	1 µl
Polimerasa pfx	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O estèril	q.s.p 50 µl	q.s.p 50 µl

Sobre la mescla s'afegeix 40 µl d'oli mineral per tal d'evitar l'evaporació del contingut.

La programació del termociclador ha estat la següent, encara que aquestes condicions han patit petits canvis degut a les diverses T_m d'hibridació dels diferents oligonucleòtids mutagènics.

1^{era} PCR: 30 x (94° C, 1',15" + 55° C, 1' + 72° C, 1') + 72° C, 10' + 4° C

2^{ona} PCR: 30 x (94° C, 1',15" + 45° C, 1',30" + 72° C, 1',15") + 72° C 10' + 4° C

III.2.2 Manipulacions enzimàtiques

III.2.2.1 Digestions amb enzims de restricció

El volum total de digestió és d'uns 20 µl en els quals la quantitat de DNA a digerir és de 0,5 - 10 µg. S'afegeix el tampó adequat depenent de l'enzim de restricció a utilitzar, i l'enzim a raó d'una unitat per µg de DNA. Es digereix durant una hora a 37° C.

Quan s'ha de fer una digestió amb varis enzims de restricció, poden utilitzar-se simultàniament si comparteixen el mateix tampó de digestió, en el cas contrari, s'ha de

digerir amb cada enzim separadament purificant el DNA entre cada una de las digestions.

III.2.2.2 Lligació del DNA

La lligació de diferents fragments de DNA es duu a terme utilitzant la lligasa del bacteriòfag T4. S'afegeixen les proporcions adequades dels diferents fragments de DNA i s'addiciona el tampó de lligació i 1 µl de lligasa, en una proporció d'una unitat de lligasa per µg de DNA. La mescla s'incuba durant tota la nit a 16° C. El DNA obtingut ja està preparat per a transformar-lo a la soca corresponent (veure secció III.2.6 i III.2.9).

III.2.3 Electroforèsi de DNA en gels d'agarosa

L'electroforèsi de DNA en gels d'agarosa és una tècnica rutinària per separar y extreure fragments de DNA, així com per estimar la seva concentració i puresa. Depenent del tamany molecular dels fragments de DNA a separar, la concentració de agarosa serà diferent, entre 0,8-2 %.

1: Es pesa la quantitat d'agarosa adequada per al tamany del DNA i es dissol sota calor en tampó TAE 1X

TAE 50X	Tris-base	242 g
	EDTA 0,5M (pH8)	100 ml
	Àcid acètic glacial	57,1 ml
	H ₂ O destil·lada	q.s.p 1 l

2: Es verteix sobre el suport d'electroforèsi prèviament segellat amb cinta adhesiva i es col·loca una pinta per crear els pous.

3: Un cop gelificat es retira la pinta i la cinta adhesiva, i es col·loca el suport en la cubeta d'electroforèsi omplint-lo amb tampó TAE 1X.

4: En cadascun dels pouets es carreguen les diferents mostres de DNA a les que prèviament s'ha addicionat 2 µl de tampó de carrega.

Tampó de carrega	Bromofenol	2,5 µg
	Xilene-cianol	2,5 µg
	Ficoll	0,15 mg
	H ₂ O	1 ml

Les mostres són carregades junt amb un marcador de pes molecular per tal de poder determinar el tamany de les bandes del DNA problema. Els marcadors utilitzats en aquest treball han estat λ -BstII i marcador VI de Boehringer Mannheim.

5: Les mostres de DNA es resolen a 50-100V, depenent de les característiques del DNA i del gel.

6: El gel es tenyeix amb EtBr (0,5 μ g/ml) en tampó TAE 1X durant 20 minuts. Passat aquest temps les bandes es visualitzen mitjançant radiació UV.

III.2.4 Purificació de DNA

En ocasions és necessari recuperar el DNA que ha sigut resolt en electroforèsi d'agarosa ja sigui perquè és el resultat d'una digestió que es vol subclonar en un plàsmid, o bé perquè és el resultat d'una PCR i es vol purificar de la resta d'additius del procés.

El mètode de recuperació del DNA depèn de la mida d'aquest. En aquest treball s'ha utilitzat el kit d'extracció de DNA per columna EZNA, d'Omega Biotek. El protocol utilitzat és l'especificat pel fabricant.

III.2.5 Competència de cèl·lules d'*E.coli*

El mètode utilitzat per a l'obtenció de cèl·lules competents és una adaptació de Sambrook et al (1989) aplicat a la soca TG1 de *E.coli*. Aquest pas és necessari per a que les cèl·lules es puguin transformar amb DNA (veure secció III.2.6).

1: S'inocula en 30 ml de medi 2YT 100 μ l de TG1 glicerinat, i s'incuba sota agitació a 37 ° C fins que la OD₅₅₀ sigui 0,6 (10⁷-10⁸ cèl·lules/ml).

2: Es manté en gel durant 10 minuts per frenar el creixement cel·lular.

3: Es centrifuga a 1.000 g. 4° C durant 10 minuts.

4: S'elimina el sobrenedant i es resuspén el sediment en 15 ml de CaCl₂ 50 mM.

5: Es manté en gel durant 20 minuts.

6: Es torna a centrifugar.

7: S'elimina el sobrenedant i el sediment es resuspén aquest cop amb 3 ml de CaCl₂ 50mM.

8: Es manté en gel durant una hora.

9: S'afegeix glicerol fins una concentració final de 15 % (v/v). S'alicuota en 100 μ l i es guarda a -80° C.

III.2.6 Transformació de cèl·lules competents de *E. coli*

El mètode emprat és el descrit per Sambrook et al. (1989) i consisteix en la introducció de DNA dintre de la cèl·lula mitjançant xoc tèrmic. Per a que es pugui dur a terme la transformació les cèl·lules han de ser competents (veure secció III.2.5).

- 1: Es descongela una alíquota de cèl·lules competents d'*E.coli*, mantenint-la en gel.
- 2: S'afegeixen uns 50 ng de DNA i s'incuba en gel durant 30 minuts.
- 3: S'incuba durant 1,5 minuts en un bany a 42° C per produir un xoc tèrmic. Passat aquest temps es deixa en gel durant cinc minuts més.
- 4: S'afegeixen 400 µl de medi 2YT i s'incuba a 37° C durant mitja hora si s'ha d'expressar la resistència a ampicilina o una hora si és a tetraciclina.
- 5: Es sembren 100 µl en plaques amb l'antibiòtic adequat.
- 6: S'incuben les plaques a 37° C durant tota la nit.

III.2.7 Extracció del DNA plasmídic en *E.coli*

Mètode realitzat mitjançant lísi alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) sobre cèl·lules procedents d'una sola colònia, que han sigut crescudes en el seu medi de cultiu. La quantitat de brou de cultiu sobre el que s'ha de realitzar l'extracció plasmídica depèn del nombre de còpies del plàsmid en una soca determinada.

- 1: Es centrifuguen 1,5 ml del cultiu 2 min a 12.000g.
- 2: S'elimina completament el sobrenedant per aspiració, i el sediment es resuspèn en 100 µl de solució I:

Solució I: Glucosa 50 ml.

Tris.HCl 25 mM (pH 8)

EDTA 10 mM (pH 8)

- 3: S'afegeixen 200 µl de solució II, i s'inverteix suaument diverses vegades.

Solució II: NaOH 0,2 N

SDS 1 %

- 4: S'afegeixen 50 µl de solució III:

Solució III: Acetat potàsic 60 ml

Àcid acètic glacial 11,5 ml

H₂O destil·lada 28,5 ml

- 5: Es manté en gel durant 5 minuts.
- 6: Es centrifuga durant 5 minuts a 12.000 g. El sobrenedant es transfereix a un tub nou.

7: S'afegeix 200 µl de fenol: cloroform:alcohol isoamílic (24:23:1), i s'agita al vòrtex. Es centrifuga 2 minuts a 12.000 g, i es recupera la fase superior. Es torna a realitzar altre rentat per acabar de desproteïnitzar.

8: Es repeteix el pas anterior però aquesta vegada fent un sol rentat amb cloroform:alcohol isoamílic (24:1) per eliminar la resta de fenol.

9: S'afegeix 1 ml d'etanol i s'espera 5 minuts a que el DNA precipiti.

10: Es centrifuga durant 5 minuts a 12.000 g. Es retira el sobrenedant per aspiració.

11: S'afegeixen 500 µl d'etanol 70 % i es centrifuga durant 5 minuts a 12.000 g. S'aspira el sobrenedant i es seca el sediment al buit.

12: Es resuspèn el sediment en 50 µl de TE o H₂O i s'afegeixen 2 µl de RNasa (1,25 mg/ml). Es conserva a -20° C.

III.2.8 Seqüenciació del DNA

Mitjançant la seqüenciació per PCR del DNA es comproven tant la correcta introducció de les mutacions al gen *bop* com que no s'han produït altres mutacions indesitjables durant el procés de mutació del gen *bop*. Per a seqüenciar tot el gen es fan dues seqüenciacions, una utilitzant el encebador FUP i en l'altre el REV. En la mescla de seqüenciació s'afegeix:

DNA a seqüenciar	1 µl
Encebador REV o FUP	1 µl
DMSO	1 µl
Premix	4 µl
H ₂ O MilliQ	13 µl

La solució permix consisteix en una mescla de nucleòtids i hidroxinucleòtids marcats cadascun d'ells amb un colorant diferent, i de la polimerasa a més d'un tampó especial.

El programa que es duu a terme en el termociclador és: 94° C, 3'; 96° C, 30''; 55° C, 4'. Un cop finalitzada la PCR es procedeix a la recuperació del DNA lliure de nucleòtids. Per això es prepara una columneta amb sepharex G50 per on es passa el resultat de la PCR, i el líquid obtingut després d'una centrifugació és el DNA lliure de nucleòtids.

El resultat de la purificació per la columneta es liofilitza, el producte del qual es resuspèn en tampó de càrrega i s'introdueix en un gel de poliacrilamida i s'obté la seqüència del DNA mitjançant un seqüenciador automàtic que relaciona cada nucleòtid amb el seu colorant específic.

III.2.9 Competència i transformació de cèl·lules de *H.salinarum*

El mètode utilitzat es el descrit per Cline et al., 1987 i 1989, i adaptat per Ni et al. (1990)

1: S'inocula la soca L33 de *H.salinarum* en medi C i s'incuba a 39° C fins que l'DO₅₅₀ és de 1,0-1,5; al voltant d'uns 5 dies.

2: Es centrifuguen 1,5 ml del brou de cultiu a 700 g durant 12 minuts.

3: El sediment es resuspèn en 200 µl de tampó d'esferoplastes.

Tampó d'esferoplastes:	NaCl	2 M
	KCl	27 mM
	Tris (pH 8,75)	50 mM
	Sacarosa	15 %
	H ₂ O miliQ	

4: S'afegeixen 20 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8) en tampó d'esferoplastes i 0,5-1 µg de DNA en un volum de 15 µl i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient.

5: S'afegeixen 230 µl de PEG (600) - tampó d'esferoplastes (6 vol/4 vol), s'homogeneïtza suaument i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient.

6: S'afegeix 1 ml de sals de regeneració i es centrifuga a 700 g durant 15 minuts.

Sals de regeneració:	NaCl	4,3 M
	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	80 mM
	KCl	27 mM
	CaCl ₂	1,4 mM
	Citrat Sòdic	10 mM
	Tris (pH 7,2)	50 mM
	Sacarosa	15 %
	H ₂ O MilliQ	

7: Si el procés ha sigut correcte, després de la centrifugació s'observa un petit sediment, en el cas contrari hi haurà hagut un problema de lísi cel·lular. Es retira el sobrenedant i s'afegeix 1 ml de medi C-sacarosa.

8: S'incuba a 37° C durant tota la nit.

9: Es sembra en plaques de medi C-sacarosa que continguin novobiocina 0,3 g/ml. S'incuba a 37° C.

Passat un temps d'incubació d'uns 10 dies es comencen a observar colònies de dues classes:

Blanquinoses: colònies formades a partir de cèl·lules que no s'han transformat amb el DNA, i que per lo tant no sintetitzen membrana púrpura, i que han crescut en llocs de la placa on la concentració d'antibiòtic no era suficient com per a inhibir el seu creixement.

Púrpures: aquestes són les colònies que han sigut transformades amb el DNA, ja que en expressar la bR han adquirit aquesta coloració. Cal esmentar que en un principi aquestes mateixes colònies són blanques degut a que la novobiocina inhibeix la síntesi de bR, a mesura que es va degradant l'antibiòtic les colònies van prenent una coloració més púrpura.

III.2.10 Extracció de DNA plasmídic en *H. salinarum*

Degut al baix nombre de copia del plàsmid pXL en *H. salinarum*, el volum de cèl·lules del qual s'ha d'extreure el plàsmid ha de ser major que en el cas d'*E. coli* (veure secció III.2.7); per aquest motiu es realitza una mediprep a partir de 200 ml de bou de cultiu.

El protocol a seguir és el mateix que en el cas de *E. coli*, però el rentat de les cèl·lules es fa amb solució A (25mM Tris i 10 mM de EDTA) en comptes de la solució I. A més, la precipitació del DNA es realitza amb isopropanol ja que la proporció que s'ha d'afegir és menor.

III.3 Manipulació de la membrana púrpura

III.3.1 Extracció de la membrana púrpura d' *H. salinarum*

Un cop que el cultiu cel·lular ha arribat a la fase estacionària, es retira el subministrament d'aire durant cinc dies per tal d'afavorir la síntesi de membrana púrpura (veure secció III.1.5.a). Una vegada passat aquest temps es procedeix a l'extracció de la membrana. El mètode emprat es una adaptació del descrit per Oesterhelt i Stoeckenius (1974).

1: Es centrifuga el brou de cultiu a 12.000 g, 10° C, 15 min.

- 2: Es resuspenen els sediments en un volum total de 120 ml de NaCl 4 M.
- 3: S'afegeix 5 mg de DNasa per reduir la viscositat de la mostra.
- 4: Es dialitza durant tota la nit contra 0,1 M NaCl per produir lisi cel·lular.
- 5: Es centrifuga el contingut de la diàlisi amb 0,1 M de NaCl, a 4° C màx 20° C, 30 min, 65.000 g. S'ha utilitzat el rotor T865 de la ultracentrífuga (Sorvall Ultra 80 & Combiplus).
- 6: El sediment està constituït per una part blanquinosa corresponent a restes cel·lulars, una part púrpura majoritària consistent en la membrana púrpura, i una capa més superficial del sediment que junt amb el sobrenedant vermellós componen les restes d'altres pigments com la bacterioruberina (veure secció I.2). Es recupera la part violeta i es fan tres rentats més per eliminar les restes cel·lulars i pigments. Entre rentat i rentat la mostra és homogeneïtzada per assegurar la completa eliminació dels pigments.
- 7: Es fan tres o quatre rentats amb aigua destil·lada, fins que s'observa que el sobrenedant és transparent.
- 8: Es resuspèn el sediment en un volum total de 20-30 ml d'aigua destil·lada.
- 9: Es realitza un espectre d'absorció entre 250 i 800 nm tant per comprovar l'absència d'altres pigments diferents de la MP com per estimar la concentració de bR obtinguda (veure secció III.3.3.a).
- 10: L'extracció es aliquidada i guardada a -20° C

III.3.2 Electroforèsi de proteïnes en gels de poliacrilamida

L'electroforèsi discontinua en gels de poliacrilamida amb SDS permet l'anàlisi de mescles de proteïnes (Laemmli, 1970). Els gels estan constituïts per fibres de monòmers d'acrilamida entrecruats amb bisacrilamida. El SDS permet desfer el plegament de les proteïnes i a més les carrega negativament per a que migrin cap al pol positiu en funció del seu pes molecular.

Un cop muntats els vidres s'han de polimeritzar dos tipus de gels: gel separador i gel apilador:

Gel separador o inferior: El percentatge d'acrilamida/bisacrilamida d'aquest gel depèn del pes molecular de les proteïnes a separar. En aquest cas s'ha utilitzat un percentatge del 15 %

- 1: Es monten els cristalls que contindran el gel.
- 2: Es prepara el gel separador al 15 %:

Acrilamida/bisacrilamida 30 % / 0,8 %	2,25 ml
Tampó inferior 4X (pH 8,8) (1,5 M Tris + 0,4 % SDS)	1,5 ml
H ₂ O	q.s.p 6.000 µl
PSA 15 %	24 µl
TEMED	3µl

2: Una vegada afegida aquesta solució entre els cristalls s'afegeix damunt una petita pel·lícula d'aigua per a que la superfície del gel sigui recta i quedi lliure de bombolles.

3: Quan ja ha polimeritzat es retira l'aigua i s'afegeix el gel apilador.

Gel apilador o superior: Mitjançant aquest gel es concentra la mostra en un petit front sobre el gel separador, d'aquesta manera totes les mostres entren en el segon gel simultàniament. El percentatge d'acrilamida/bisacrilamida en aquest cas és de 4 %.

4: Es prepara el gel apilador al 4 %:

Acrilamida/bisacrilamida 30 % / 0,8 %	225 µl
Tampó de dalt 4X (pH 6,8) (tris 0,5 M + SDS 0,4 %)	750 µl
H ₂ O	q.s.p 3.000µl
PSA	30 µl
TEMED	3 µl

5: S'afegeix aquesta solució sobre el gel inferior i es col·loca la pinta que generarà els pous de càrrega de les mostres.

6: Una vegada polimeritzat s'extrau la pinta i es col·loquen els cristalls junt amb el gel en un suport que s'introdueix dins de la cubeta d'electroforèsi a la qual s'afegeix tampó de cubeta:

Tampó de cubeta 10 X:

Glicina	1,92 M
Tris-HCl	0,25 M
SDS	1 %

7: A les mostres de proteïna s'afegeix tampó de càrrega i es bullen durant cinc minuts per tal de desnaturalitzar les proteïnes i solubilitzar-les.

Tampó de càrrega 4 X:

Tris-HCl	200 mM (pH 6,8)
SDS	8 %
Blau de bromofenol	0,4 %

Glicerol 40 %

8: Es carreguen als pous les mostres i el marcador de pes molecular *Wide Range* de Sigma. Es resolen a 50 mV durant uns 45 minuts.

9: Passat aquest temps es desmunten els cristalls, s'extrau el gel i s'introdueix en solució de tinció Cromassie R-250 durant 30 minuts, solució que serveix tant per fixar com per visualitzar les bandes.

Cromassie R-250 0,1 %

Metanol 40 %

Àcid acètic 10 %

H₂O 50 %

10: Es renta el gel amb solució destenyidora per eliminar l'excés de tint.

Metanol 40 %

Àcid acètic 10 %

H₂O 50 %

III.3.3 Determinació de la concentració de bacteriorodopsina

a)***Espectrofotomètricament:** A la mostra de bacteriorodopsina se l'hi realitza un espectre d'absorció entre 250 i 800 nm per determinar el valor d'absorbància a 568 nm, punt en el que es troba el màxim d'absorbància de la bacteriorodopsina adaptada a la llum (veure secció I.5.2).

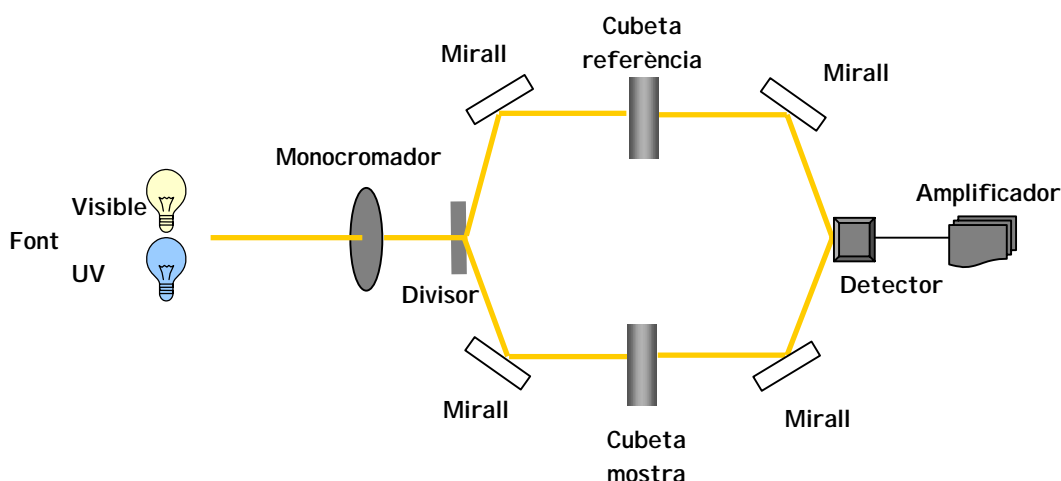


Figura III.4 Esquema de funcionament de l'espectrofotòmetre.

Mitjançant la fórmula de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$) es calcula la concentració de la proteïna, tenint en compte que la seva ϵ per a la bR adaptada a la llum és de $63.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ i de $58.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ per a l'adaptada a l'obscuritat. És per això, que abans de realitzar l'espectre d'absorbància s'ha d'il·luminar la mostra durant uns minuts (veure secció III.3.5)

Els espectres d'absorbància s'han realitzat en un espectrofotòmetre Varian Cary 3 de doble cubeta esquematitzat a la figura III.4.

Esfera integradora

L'esfera integradora es pot col·locar a l'espectrofotòmetre de UV-visible en comptes de les cel·les tradicionals. És una esfera amb un interior completament blanc on es dipositen la cubeta de la mostra i la de referència. Un cop que incideix l'eix de llum sobre la cubeta de mostra, tots els raigs que són dispersats per la mostra es reflexen a les parets de l'esfera i van a parar al detector. D'aquesta manera, queda anul·lat qualsevol efecte de la dispersió de la llum, i s'evita la pèrdua de senyal.

b)*Lowry: Aquesta tècnica consisteix en una mesura de la concentració de bR utilitzant com a patró una bateria de suspensions de bR de concentració coneguda.

1: Es realitza un banc de dilució de la proteïna patró en un rang de concentracions que compregui la de la proteïna problema.

2: En tubs d'assaig s'introdueixen 200 μl de cadascuna de les dilucions i la mostra problema.

3: S'afegeix 1 ml de reactiu C a cadascun dels tubs i s'agita durant 10 minuts.

Reactiu A: 1 g de NaCO_3 en 50 ml de NaOH 0,1 N.

Reactiu B: 0,1 g de tartrat-sòdic-potàsic en 10 ml d'aigua.

Reactiu C: 50 ml del reactiu A + 1 ml del reactiu B + 0,51 g de SDS.

4: S'afegeix 0,1 ml del Reactiu D, Reactiu de Folin-Ciocalteus, a cadascuna de les mostres i es manté sota agitació durant mitja hora.

5: Es mesura l'absorbància a 750 nm de la mostra i patrons.

6: Es determina la concentració de la mostra problema mitjançant una recta patró en la qual es representa la concentració de proteïna en funció de la seva $A_{750 \text{ nm}}$.

III.3.4 Desionització de la membrana púrpura

La membrana púrpura es desionitza dialitzant-la contra una solució de reïna d'intercanvi aniònic Dowex-50W (Sigma) durant un mínim de 6-8 hores. La reïna es regenera periòdicament rentant-la primer amb NaOH 0,1 N i disminuint el pH fins a 7 rentant-la amb aigua, i segon rentant-la amb HCl 0,1 N fent finalment rentats amb aigua fins que el pH de la reïna sigui 3,5.

Per evitar contaminació per cations exògens és necessari que tot el material que entra en contacte amb la proteïna sigui de plàstic prèviament netejat amb aigua MilliQ per retirar possibles restes de cations.

L'ajustament del pH de les mostres desionitzades es realitza mitjançant la mesura del pH de duplicats per tal d'evitar la contaminació de la mostra amb l'elèctrode del pH-metre. A la mostra original s'afegeix la mateixa quantitat de NaOH o HCl que al duplicat.

III.3.5 Adaptació de la bacteriorodopsina a la llum i a la foscor

L'adaptació de la bR a la foscor es realitza guardant les mostres a 4° C durant una nit en condicions d'obscuritat total. Depenent del mutant, aquest temps s'incrementa.

L'adaptació a la llum es duu a terme il·luminant les mostres amb una font de llum Seom durant 2 minuts.

III.4 Titració de la bacteriorodopsina en front del pH

Aquesta tècnica consisteix en prendre espectres d'absorbància a una mostra de concentració 15 µM de membrana púrpura adaptada a la foscor (veure secció III.3.5) a la qual se l'hi va ajustant el pH des de 1 a 13 mitjançant microaddicions de HCl o NaOH. S'ha utilitzat un pH-metre Metrohm 713 sèrie 01 amb un elèctrode Crison.

L'experiment es duu a terme sobre mostres de MP en diferents condicions de força iònica del medi:

- H₂O
- 150 mM KCl
- 1M KCl
- 2M KCl
- 75 mM Na₂SO₄

-Mostres desionitzades (veure secció III.3.4)

Depenent del rang de pH en el qual es faci l'experiment parlem de titració àcida o bàsica.

a) Titració àcida

Mitjançant la titració entre pH 7 i 1 es pot determinar el pK_a aparent de l'aspàrtic 85 responsable de la transició membrana púrpura-blava (veure secció I.8.3).

Paral·lelament a l'acidificació de la mostra de MP es van prenent espectres d'absorbància entre 250 i 800 nm. La representació del canvi d'absorbància a 630 nm, màxim d'absorbància de la forma blava en l'espectre de diferència, en funció del pH de la mostra dona una gràfica del tipus sigmoidal en la que el punt d'inflexió, X_0 , és el pK_a aparent de la transició (figura III.5). L'ajustament de la corba a l'equació de Boltzman dona els paràmetres d'interès:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

y Absorbància a una longitud d'ona determinada, en aquest cas 630 nm, en funció del pH.

A_1 Valor final de l'absorbància.

A_2 Valor inicial de l'absorbància.

X_0 punt mig de la corba.

dx amplada de la corba.

X pH

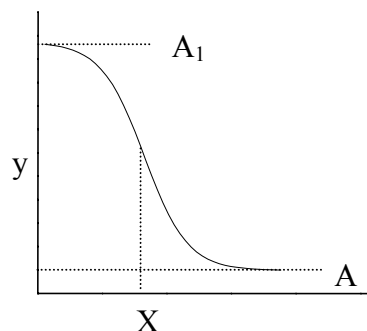


Figura III.5. Representació esquemàtica d'una corba sigmoidal.

b) Titració bàsica

La mostra es titra entre els pH 7 i 14 i es prenen també espectres d'absorbància per observar posteriorment l'aparició de diferents espècies com membrana vermella (470 nm) i retinal lliure (365 nm). L'ajustament a una corba sigmoidal dels canvis d'absorbància a cadascuna d'aquestes longituds d'ona en funció del pH dona el pK_a aparent per cadascuna d'aquestes espècies.

III.5 Tractament de la bacteriorodopsina amb hidroxilamina

La hidroxilamina (figura III.6), és una molècula capaç de penetrar dintre de la bR i hidrolitzar la unió del retinal amb la proteïna. Els experiments de reactivitat amb la hidroxilamina es duen a terme centrifugant 0,4 mg de membrana i resuspenent-la en una solució 1 M d'hidroxilamina en 150 mM de fosfat sòdic pH 7, amb una concentració final de bR de 0,4 mg/ml.

L'experiment es realitza sota dues condicions diferents: en absència d'il·luminació, on es segueixen canvis en l'espectre d'absorbància de la bR al llarg del temps, i en presència d'il·luminació, on la mostra és il·luminada contínuament amb llum blanca (300 lux) i es medeix l'absorbància a intervals de temps intermitents.

Es realitza l'experiment en aquestes dues condicions perquè l'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina depèn de si la bR s'il·lumina o no (veure secció IV.2.2.4).

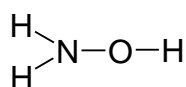


Fig III.6. Molècula d'hidroxilamina.

La representació del canvi d'absorbància a 570 nm en funció del temps de reacció de la hidroxilamina dóna com a resultat una gràfica que s'ajusta a una monoexponencial decaient (figura III.7), amb les següents magnituds:

$$y = y_0 + Ae^{-x/t}$$

y Absorbància a una longitud d'ona determinada, en aquest cas a 570 nm, en funció del temps.

y_0 Valor de y cap a on tendeix la corba.

A Amplitud del canvi d'absorbància.

t Constant de la caiguda de la corba.

X temps

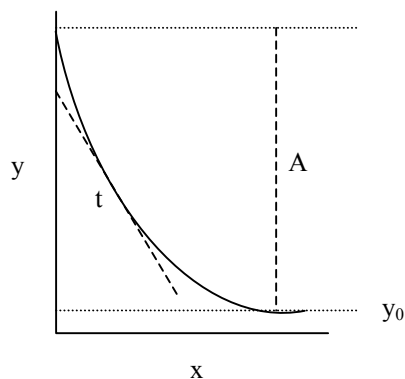


Figura III.7. Representació esquemàtica d'una corba monoexponencial decaient.

La multiplicació de t per $\ln 2$ dona lloc a la $t_{1/2}$ de caiguda de la corba. Aquest és el valor utilitzat per determinar la velocitat de reacció de la hidroxilamina.

III.6. Estabilitat tèrmica de la bacteriorodopsina

III.6.1. Espectroscòpia UV-Vis.

Es determina l'estabilitat tèrmica de mostres de bR adaptades a la foscor a una concentració de 15 μM en aigua a pH 4,0 i 7,0. L'experiment es realitza incubant durant vuit minuts la mostra a temperatures compreses entre 20 i 100° C a intervals de 5° C, i adquirint espectres d'absorbància en el UV-visible a cada temperatura. L'increment de temperatura es produeix en la mateixa cel·la de l'espectrofotòmetre mitjançant un circuit tancat connectat a un bany.

La representació de l'absorbància a 570 nm en funció de la temperatura dona com a resultat una corba sigmoïdal (figura III.5), amb un punt d'inflexió que indica el T_m de desnaturalització de la bR.

III.6.2. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

Mitjançant el DSC és possible mesurar la capacitat calorífica aparent d'un sistema en funció de la temperatura (Mateo, 1984). L'increment de temperatura induïx canvis conformacionals a les proteïnes, que van associats a l'absorció o alliberament de calor. En el cas de la bacteriorodopsina, la seva desnaturalització tèrmica dóna lloc a l'absorció de calor, apareixent un pic positiu en el termograma si el procés és suficientment cooperatiu.

Un termograma és la corba donada per la representació de la capacitat calorífica en funció de la temperatura. Es parla de capacitat calorífica aparent, C_p^{ap} (cal/°C), ja que no s'obtenen valors absoluts, sinó la diferència entre dos estats diferents, sent la bR a temperatura ambient l'estat de referència.

Els experiments s'han realitzat en un calorímetre Micro-Cal MC2 (MicroCal Inc, USA) que conté dues cel·les, una per la mostra i l'altra per la referència, essent la capacitat de cadascuna de les cel·les de 1,23 ml. El sistema d'escalfament escalfa tant les cel·les com la cambra. El sistema de refrigeració consisteix un circuit tancat connectat a un bany, que refrigera la cambra (figura III.8). Els experiments es realitzen a 1,7 atmosferes de pressió de nitrogen per evitar l'ebullició de la mostra a elevades temperatures, i a una velocitat de rastreig de 1,5 K/min.

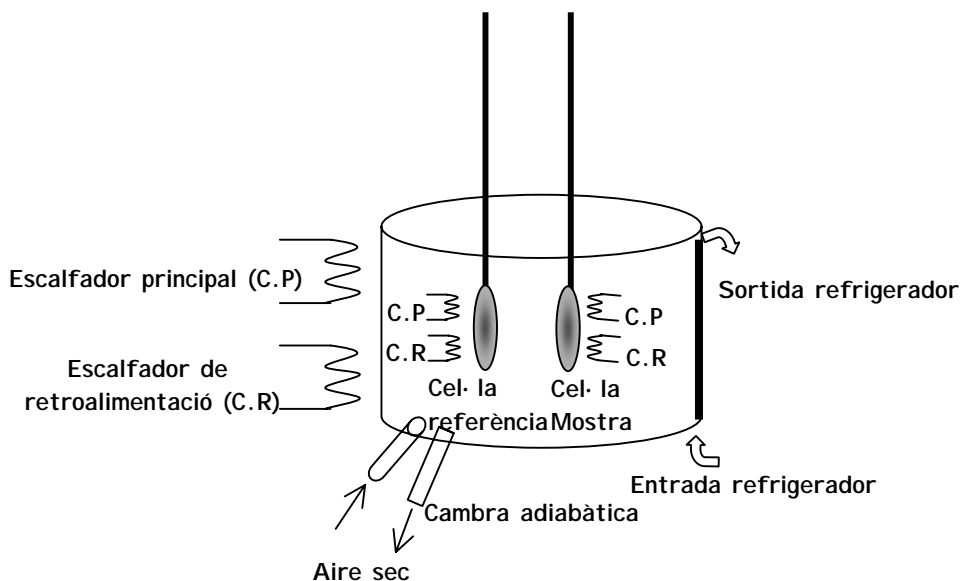


Figura III.8. Esquema del sistema de escalfament-refredament de la mostra en l'aparell de DSC. C.P és el calentador principal i C.R el de referència.

Les mostres es preparen a una concentració de 1,5-2 mg/ml i es dialitzen durant tota la nit contra H₂O amb un pH final de ~ 6,5. L'aparell consta de dues cel·les, una dedicada a la referència on s'introdueix l'aigua de la diàlisi i l'altra a la mostra. Sobre les dues cel·les s'incrementa la temperatura des de 25 a 110° C enregistrant-se simultàniament la capacitat calorífica del sistema.

Primerament s'obté el termograma per l'aigua introduint-la a les dues cel·les per tal de restar la capacitat calorífica de l'aigua al termograma de la mostra. Un cop s'ha obtingut el termograma per l'aigua, es realitza el mateix procés per la mostra de bR, la qual un cop s'ha incrementat la temperatura fins a 110° C és refredada i es torna a incrementar la temperatura tant per comprovar la irreversibilitat del procés com per tenir un termograma de la capacitat calorífica de la proteïna desnaturalitzada. Com que en aquest últim termograma consta tant de la capacitat calorífica de l'aigua com de la bR desnaturalitzada és aquest últim termograma el que s'utilitza per restar-lo del termograma de la bR. Així doncs el termograma de l'aigua és únicament utilitzat quan la qualitat de l'últim termograma no és prou bo.

Un cop obtinguda la resta es realitza la correcció de la línia base (figura III.9), en la qual s'igualen les línies base pre i post-màxim de desnaturalització. Aquest desfase de la línia base es deu a la diferent capacitat calorífica de la proteïna nativa i desnaturalitzada. Aquesta correcció es realitza mitjançant el programa OriginTM.

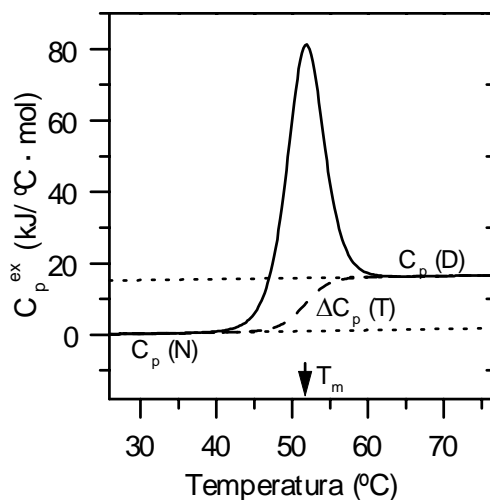


Figura III.9. Traçat de la línia base d'acord amb el mètode de Takahashi i Sturtevant (1981). $C_p(N)$ és la capacitat calorífica a l'estat natiu, i $C_p(D)$ a l'estat desnaturalitzat. La línia base $\Delta C_p(T)$ uneix sigmoïdalment els dos nivells de manera proporcional a l'àrea per sota de la transició.

III.7. Determinació del bombeig de protons de la bacteriorodopsina incorporada en liposomes

a) Inclusió de la bR en liposomes de fosfatidilcolina (PC) d'ou

Purificació de la fosfatidilcolina: L'extracció i purificació de la fosfatidilcolina d'ou es realitza de la següent manera:

- 1: Es mesclen 12 rovells d'ou amb 500 ml d'acetona, s'agita durant 5 minuts.
- 2: Es deixa reposar durant 1 hora en una atmosfera de nitrogen.
- 3: S'agita i filtra amb un Büchner.
- 4: Es renta el precipitat amb 200 ml d'acetona freda ($5-10^\circ\text{C}$).
- 5: Es recupera el precipitant, afegir 500 ml d'etanol 95 % i agitar durant 5 minuts.
- 6: Es deixa reposar durant 1 hora en atmosfera de nitrogen.
- 7: Es filtra amb un Büchner.
- 8: Es rotavapora el filtrat fins a la màxima sequedat.

La rotavaporació consisteix en evaporar el contingut del baló mitjançant buit, generat per trompa d'aigua, mentre que el baló va rodant i és remullat en un bany a la temperatura desitjada.

- 9: El residu es dissol en 100 ml d'èter etílic i sota agitació s'afegeix 500 ml d'acetona.

- 10: Els fosfolípids precipiten i es decanta el líquid.
- 11: Es renta el precipitat amb 100 ml d'acetona freda.
- 12: El sòlid es dissol en 100 ml d'èter i es repeteix la precipitació afegint 500 ml d'acetona.
- 13: Es renta el precipitat amb acetona.
- 14: Es dissol amb 50 ml de cloroform. Aquí el sòlid conté principalment fosfolípids i poca quantitat de carotens.
- 15: La dissolució amb cloroform s'aplica a una columna d'alúmina (27 x 3 cm, placa filtrant nº 4). L'eluent consisteix en una mescla (9:1 v/v) cloroform: metanol i l'efluent es recull en fraccions de 70 ml.
- 16: Per anàlisi de cromatografia de capa fina es determinen les fraccions de major puresa.
- 17: Es rotavaporen les fraccions escollides i es dissol en cloroform conservant-se a -20° C.

Inclusió de la bR en liposomes: El volum total de la mescla de bR i PC és de 15 ml tenint una concentració final de PC de 6,0 mg/ml, 0,12 mg/ml de bR i 150 ml KCl.

- 1: En un baló de vidre s'addiciona 1,88 ml de PC dissolt en cloroform (concentració 48 mg/ml) i es rotavapora a $20 - 30^{\circ}$ C durant uns 13 minuts, moment en el que s'observa el fosfolípid precipitat a les parets.
- 2: El baló s'embolica en paper d'alumini i es col·loca en una campana de buit durant 30 minuts per eliminar tota resta de cloroform.
- 3: S'afegeix al baló una mescla de 15 ml de bR a concentració 0,12 mg/ml en 150 mM KCl pH 7,0.
- 4: Es tapa la boca del baló amb parafilm i s'agita amb l'ajuda d'un vòrtex a màxima potència fins que la totalitat dels PC s'han dissolt, uns 10 minuts.
- 5: La mescla es passa per un microfluiditzador per tal d'arribar a una població de liposomes homogènia d'un diàmetre d'uns 60 nm. Aquest mètode consisteix en fer passar la solució de liposomes a alta pressió (4 bars) a través de filtres. L'aparell emprat és un Microfluidizer 110S. Previ rentat amb etanol, aigua i tampó 150 mM KCl es procedeix a la re-circulació de la solució de liposomes pels filtres durant 4 minuts.

6: Es mesura el diàmetre majoritari dels liposomes mitjançant un Microtrack UPA 150 (Honeywell, USA). Quan es fa incidir un làser (780 nm en aquest cas) sobre una solució de liposomes es produeix una dispersió que depèn de la mida dels liposomes. Amb la tècnica d'anàlisi de l'espectre de freqüències el que es fa es comparar la llum dispersada a 0° respecte al feix incident amb el propi feix dispersat. La llum dispersada pateix un desplaçament de la freqüència original (efecte Doppler) el qual depèn de la velocitat de les partícules (figura III.10). La diferència de freqüència es detectada mitjançant el canvi produït sobre el feix original a l'interaccionar amb la llum dispersada. Del tractament matemàtic de les dades intensitat-temps s'obté la intensitat-freqüència. La representació d'aquest parell de dades dona com a resultat una corba de caràcter Lorentzià quan totes les molècules són de la mateixa grandària. Quan hi ha una suma de poblacions de diferents mides s'obté una corba complexa multilorentziana. La deconvolució d'aquestes dades dona com a resultat la distribució de les poblacions de mides de liposomes de la solució.

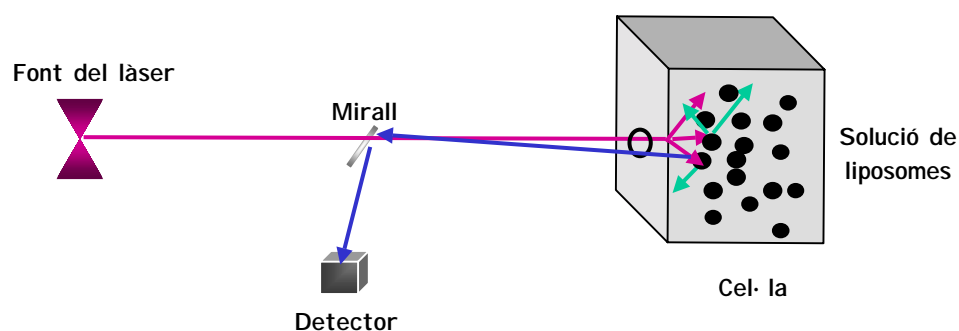


Figura III.10. Esquema de funcionament de l'espectròmetre d'anàlisi d'espectre de freqüències. En violeta el feix incident, en verd els raigs dispersats en un angle diferent de 0° i per tant perduts; en blau els raigs amb angle de dispersió 0° que arriben al detector.

Les mostres es dilueixen en medi aquós de manera que l'índex de càrrega de la solució es trobi entre 0,1 i 0,2 assegurant-nos de que hi arribi suficient senyal al detector. Hi ha una sèrie de paràmetres que s'han d'introduir al programa ja que depenen de la solució, mostra, etc aquests canvien, com són la viscositat o l'índex de refracció. Les dades introduïdes són: viscositat (25°C) de 1,002 cP, índex de refracció de 1,332, temps de lectura 10 minuts, índex de

refracció del fosfolípids 1,49, densitat dels liposomes $1,01 \text{ g/cm}^3$, tipus de partícules esfèriques.

Determinació de la correcta orientació de la bR als liposomes

Per determinar que l'orientació de la bR es dona majoritàriament amb la cara citoplasmàtica cap a l'exterior del liposoma, es procedeix a la digestió dels liposomes amb papaïna. La papaïna és un enzim que talla els llocs de la proteïna més exposats al medi ja que l'enzim no pot penetrar dintre del liposoma. En el cas de la bR és l'extrem C-terminal que en trobar-se en la part citoplasmàtica estarà exposat a l'enzim i serà digerit. El mètode emprat ha sigut el utilitzat per Huang et al. (1980).

- 1- Perquè la papaïna sigui activa primer ha de ser activada per cisteïna. A $4'5 \mu\text{l}$ de papaïna dissolta en aigua a una concentració de $0,5 \text{ mg/ml}$ se l'hi afegeix $7,5 \mu\text{l}$ de cisteïna a $0,5 \text{ M}$, $0,02 \text{ M}$ EDTA i pH $8,0$.
- 2- S'afegeixen $42 \mu\text{l}$ de TRIS.Cl $0,5 \text{ M}$ pH $8,0$ a $380 \mu\text{l}$ de suspensió de liposomes amb bR ($0,12 \text{ mg/ml}$). La quantitat de bR utilitzada és doncs de $45,6 \mu\text{g}$.
- 3- Es mesclen les solucions de papaïna i liposomes i s'incuba durant tota la nit a 37°C i a la foscor. La relació total de papaïna : bR és de $1 : 20$.
- 4- La mescla de digestió es renta tres vegades amb aigua destil·lada centrifugant a 16.000 g , 40 min , i 4°C per tal d'eliminar les restes d'enzim. Finalment el sediment es resuspèn en 1 ml de metanol per eliminar els fosfolípids.
- 5- Es passa pel vòrtex i es centrifuga durant 2 min a 8.000 g .
- 6- Es resuspèn el sediment amb 1 ml de tolué / èter en proporció $2:1$.
- 7- Es passa per vòrtex i es centrifuga durant 2 min a 8.000 g . S'eixuga el sediment al buit i es resuspèn en tampó de càrrega d'electroforèsi de proteïnes i es bull la mostra (veure secció III.3.2).
- 8- En els pous del gel es carrega la mostra i un control amb la bR sense digerir.

b) Mesura del bombeig de protons

S'introdueixen $2,5 \text{ ml}$ de bR inclosa en liposomes en una cubeta de plàstic amb una petita mosca magnètica d'agitació. La cubeta amb la mostra s'introdueix dintre d'un got de precipitats amb aigua per tal d'absorbir el calor de la llum incident sobre la

mostra. La llum prové d'un transil·luminador a màxima potència amb filtratge previ de la llum ultravioleta mitjançant un filtre groc (figura III.11).

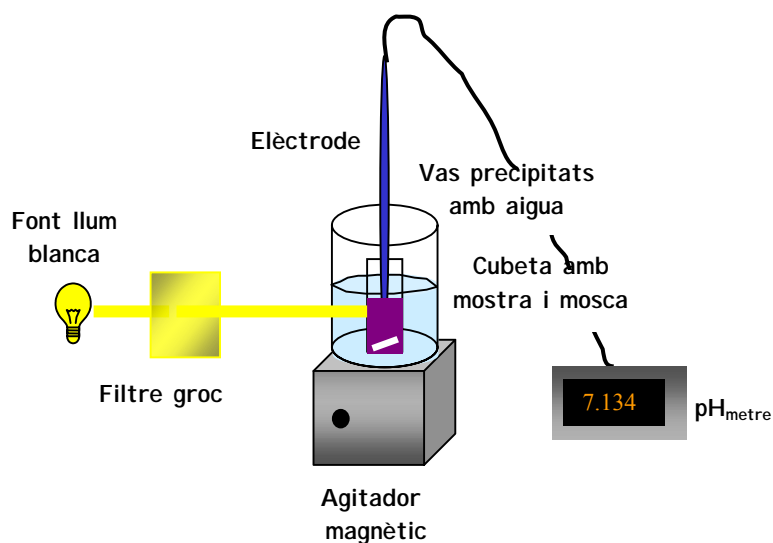


Figura III.11. Esquema de la tècnica de mesurament de bombeig de protons en liposomes.

L'experiment s'inicia primer il·luminant la mostra durant uns 2 minuts per tal d'adaptar-la a la llum (veure secció III.3.5) i després mantenint-la a l'obscuritat durant uns 10 minuts per a que els protons que hagin pogut ser bombejats dintre del liposoma surtin per difusió. Passat aquest temps es comença l'experiment en el qual s'anota el pH inicial de la mostra abans d'il·luminar i un cop iniciada la il·luminació s'anota el pH a diferents intervals de temps fins que el pH s'estabilitza, moment en el qual es deixa d'il·luminar la mostra i també s'anota el temps de retorn al pH inicial.

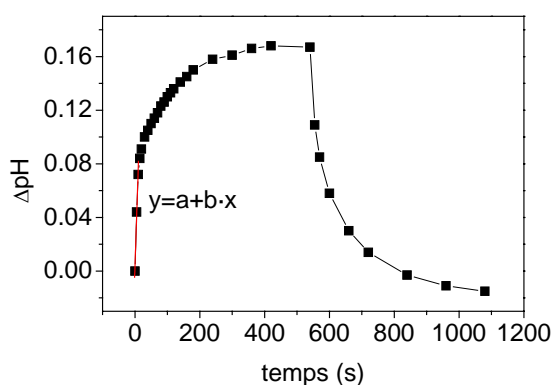


Figura III.12. Gràfica de representació de les dades de bombeig de protons en liposomes. En vermell es mostra una recta ajustada als tres primers punts per tal de determinar la velocitat de bombeig.

Un cop realitzat l'experiment es mesura l'eficàcia de bombeig representant el canvi de pH en funció del temps. L'ajustament dels 15 primers segons a una equació lineal dóna una pendent, el valor de la qual és la velocitat de bombeig de la mostra (figura III.12).

III.8. Fotòlisi de llampec

Amb aquesta tècnica és possible observar espectrofotomètricament canvis d'absorbància d'una mostra al llarg del temps un cop és irradiada per un làser.

L'aparell utilitzat és un LKS50 de Applied Photophysics amb un làser Nd:YAG (Neodymium: Yttrium Aluminium Garnet; Spectron Laser Systems). En tots els casos l'energia del làser és de 5 mJ/pols.cm² amb una duració del pols de 9 ns, una longitud d'ona de 532 nm i una freqüència de repetició de 0,5 Hz. El processament de les dades es duu a terme amb el programa LASER Applied Photophysics.

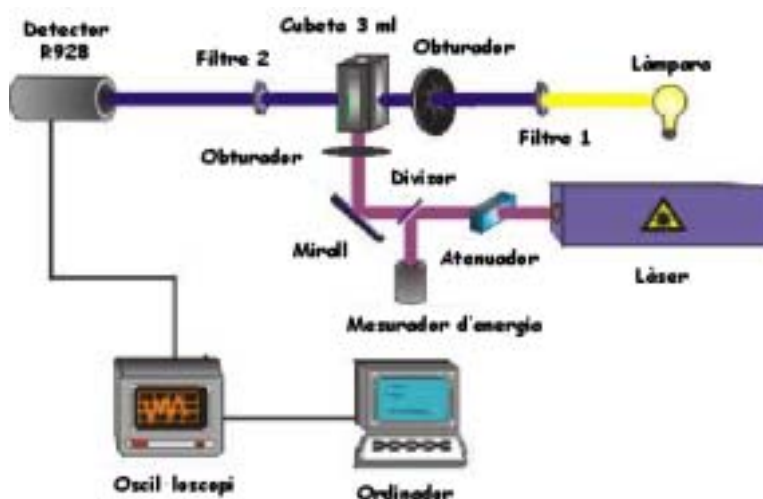


Figura III.13. Esquema del funcionament de l'aparell de fotòlisi de llampec.

Com es pot observar a la figura III.13 sobre la cubeta on hi ha la mostra es fa incidir un impuls de làser que és capaç de excitar algunes molècules de bR. Al mateix temps, s'hi fa incidir un feix de llum de mesura per tal d'adquirir l'absorbància a una longitud d'ona determinada segons l'intermediari a estudiar.

Amb aquest aparell hem dut a terme els següents estudis:

Determinació de la vida mitja dels intermediaris: l'experiment es realitza sobre mostres de bR adaptades a la llum (veure secció III.3.5) a una concentració de 15 μM , 1 M KCl, temperatura ambient i pH 4, 6,5 o 10 segons l'experiment. Les dades obtingudes consisteixen en la diferència d'absorbància entre la mostra sense fer-hi incidir el làser i després de fer-lo incidir. Una vegada que s'ha fet incidir el pols de làser es prenen els valors d'absorbància en funció del temps. En la figura III.14 es representa la cinètica de l'intermediari M ja que el seu màxim d'absorbància es troba a 410 nm. Per cada valor de longitud d'ona es fa una mitja de 4 mesures ja que el làser s'hi fa incidir sobre la mostra quatre vegades amb un espai entre pols i pols de 10 segons.

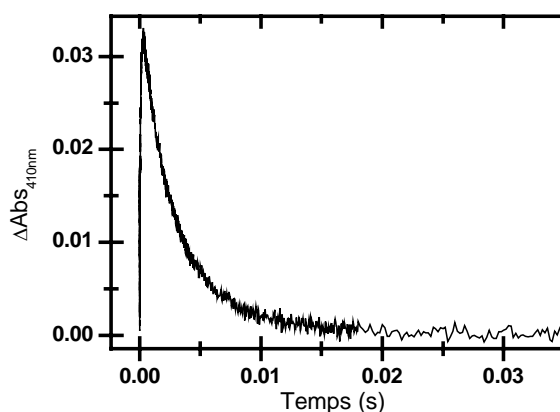


Figura III.14. Cinètica d'absorbància a 410 nm en funció del temps d'una mostra de bR a pH neutre i 1 M de KCl.

Determinació de canvis de pH del medi: el colorant piranina (àcid 8-hidroxí-1,3,6-pirentrisulfonat trisodi) és capaç de detectar canvis del pH del medi on es troba dissolt (Kano et al., 1978). Ja que el pK_a de la piranina a 1M de KCl és de 7,2, és solament al voltant d'aquest pH on es pot detectar canvis del pH.

L'espectre d'absorbància del colorant presenta un màxim d'absorbància a 460 nm la intensitat del qual depèn de l'estat d'ionització del seu grup hidròxid (figura III.15). Aquesta capacitat del colorant de canviar la seva absorbància en funció del pH ens permet estudiar canvis del pH d'un medi on es trobi en suspensió la bR. Per obtenir els canvis d'absorbància a 460 nm de la piranina al llarg del temps, un cop que s'ha incidit el pols de làser, abans s'ha d'obtenir la mateixa corba en absència de piranina per tal de restar els intermediaris que absorbeixen a aquesta mateixa longitud d'ona. Les corbes obtingudes provenen de la mitja de 10 corbes.

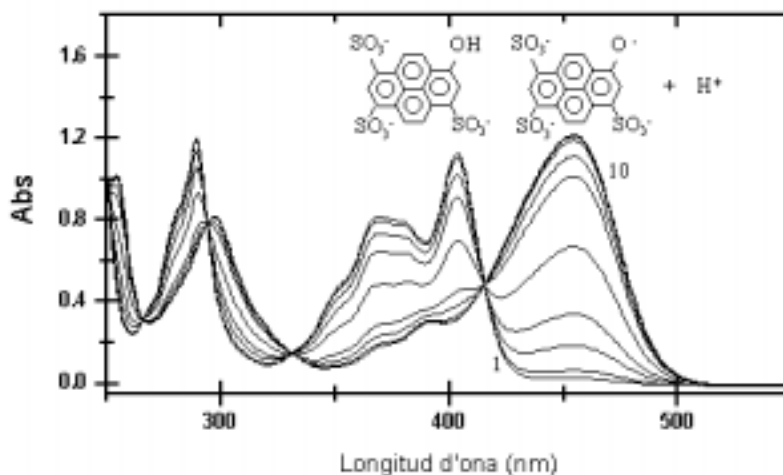


Figura III.15. Espectre d'absorbància en el UV-visible de la piranina a una concentració de 20 μM en 1 M de KCl a diferents valors de pH (de l'1 al 10: 5,1; 5,5; 6,0; 6,4; 6,9; 7,2; 7,6; 8,5; 8,8 i 9,2). A cada pic es mostra l'estat d'ionització de la piranina.

III.9. Fotocorrents

Els fragments de membrana púrpura orientats són capaços de produir un senyal elèctric quan son irradiats amb llum. Aquest senyal es produeix com a conseqüència del moviment de càrregues en la proteïna durant el fotocicle (Liu et al., 1988). Aquesta tècnica és molt semblant a la de fotòlisi de llampec però en comptes de mesurar l'absorbància a una longitud d'ona el que es mesura és el corrent elèctric al llarg del temps. Per tal de fer aquestes mesures és necessari que els fragments de MP es trobin orientats perquè el moviment de càrregues es doni en el mateix sentit a tots els fragments de MP.

Orientació de la MP en poliacrilamida

La MP és immobilitzada i orientada en gels de 30 % poliacrilamida/0,8 % bisacrilamida, en un volum total de 4,5 ml on la concentració de bR és de 0,9 mg/ml, 2,7 $\mu\text{g/ml}$ de persulfat amònic i 13,5 μl de temed. Primerament s'introdueix la mescla sense el temed en un recipient de 60 x 4,9 x 50 mm dotat de dos elèctrodes de signe contrari a cada costat connectats a una font d'electroforèsi. S'aplica el temed a la mescla, i durant els 20 segons que triga en polimeritzar el gel, s'agita el medi per homogeneitzar-lo. Passat aquest temps s'aplica un voltatge de 15 V/cm per tal de

afavorir l'orientació de la bR. Passat un minut s'apaga la font elèctrica i es deixa durant uns minuts que polimeritzi del tot el gel.

S'extrau la peça sencera de gel i es deixa remullat en aigua destil·lada al menys 48 h per tal d'eliminar restes de temed del gel. Passat aquest temps es talla el gel en fragments de 6 x 4,9 x 12 mm amb ajuda d'un motlle. Si l'homogeneïtat de la mostra és bona surten unes 12 peces. Les peces amb bombolles o mal homogeneïtzades són descartades.

Cada peça s'introdueix dintre d'un tub on hi ha solució 150 mM KCl, cada tub s'ajusta a un pH determinat entre 3 i 11 i es deixa reposar durant tota la nit per tal de que la concentració de protons i KCl s'equilibri dintre del gel.

Es mesura el pH de cada tub per determinar el pH exacte després de la deriva durant l'equilibrat. En una cubeta de 10 x 5 x 45 mm s'introdueix 1 ml de la solució d'un tub i es fica el fragment de poliacrilamida del mateix tub procurant que el gel quedi el més centrat possible en la cubeta. S'il·lumina el gel durant dos minuts amb llum verda per tal de adaptar la bR a la llum (veure secció III.3.5).

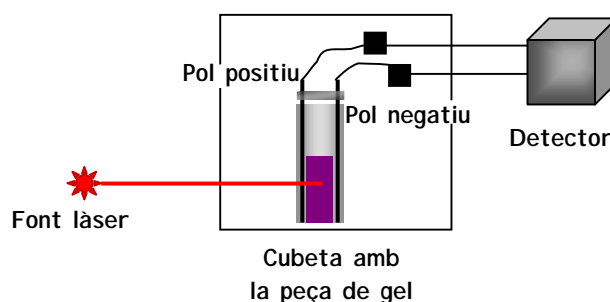


Figura III.16. Esquema de funcionament de l'aparell de fotocorrents.

La cubeta s'introdueix dintre del portacubetes i es col·loquen dintre d'aquesta els electrodos (figura III.16). Es fa incidir un pols de làser (532 nm) i es mesura la diferència de voltatge al llarg del temps. El làser utilitzat ha sigut un Nd-YAG a una intensitat de 10 mJ.

El senyal elèctric és enregistrat en una escala de temps de 500 μ s després del pols de làser. La representació de la intensitat en funció del temps dóna una gràfica (figura III.17) on es pot observar els canvis en el senyal elèctric.

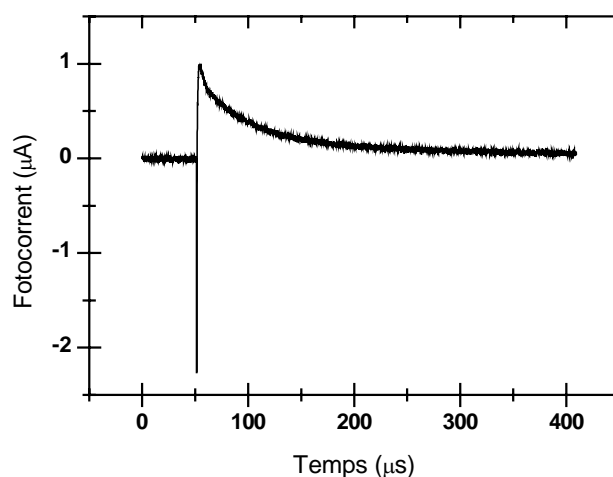
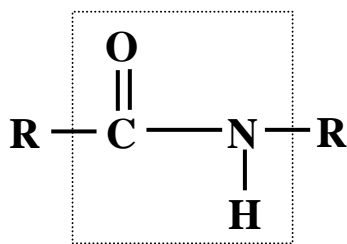


Figura III.17. Representació de les fotocorrents en funció del temps després del làser, per una mostra de bR silvestre en 100 mM KCl.

III.10. Adquisició d'espectres d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)

La radiació d'infraroig es troba compresa entre $14000-200\text{ cm}^{-1}$, encara que és la regió entre $4000-1000\text{ cm}^{-1}$ la de major interès biològic. La freqüència de vibració d'un enllaç depèn de la massa dels àtoms i de la força del enllaç. Així doncs, quan es representa la intensitat d'absorció en funció de la freqüència de la radiació infraroja s'observa que cada grup d'enllaços absorbeix en una zona característica.



Enllaç
amida

Figura III.18. Representació de l'enllaç amida.

Els modes de vibració dels enllaços es poden classificar en dos grups, els de tensió on els àtoms vibren en la direcció de l'enllaç, i els de flexió on els àtoms es mouen principalment de manera perpendicular a la direcció de l'enllaç. Es poden donar combinacions dels diferents modes de vibració en un mateix enllaç.

En el cas de les proteïnes, el grup químic més abundant és el grup amida. (figura III.18) Aquest grup posseeix diferents formes de vibració dels quals els que són d'interès per nosaltres són l'Amida I i II (figura III.19). L'Amida I es correspon en un 80 % amb la vibració de tensió de l'enllaç C = O i un 20 % de l'enllaç N-H, que es troba representada en l'espectre d'infraroig en una banda localitzada entre 1700 i 1600 cm^{-1} . L'Amida II es correspon en un 60 % al doblegament de l'enllaç N-H i en un 40 % a l'estirament de l'enllaç C - N donant aquest cop una banda compresa entre 1500 i 1600 cm^{-1} .

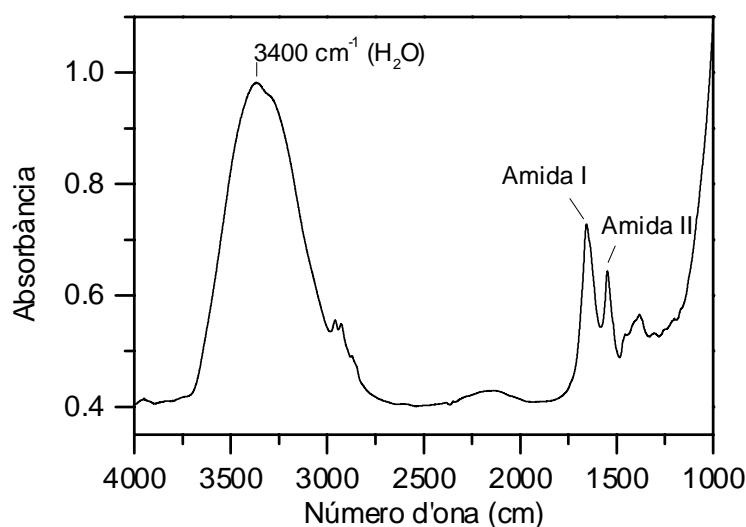


Figura III.19. Espectre d'absorció d'un film hidratat de bacteriorodopsina.

Les bandes originades per les vibracions dels grups carboxílics de les cadenes laterals dels aminoàcids com l'aspàrtic o glutàmic donen bandes en les zones 1750-1700 cm^{-1} per COOH i 1450-1500 per COO⁻.

La interpretació de les bandes d'infraroig a la bR té el problema addicional a altres proteïnes de la presència d'una molècula de retinal que dóna múltiples modes de vibracions que es solapen amb les bandes de vibració de la proteïna.

A continuació es descriu el procediment emprat per tal d'obtenir espectres de diferència entre la bR fotolitzada i no fotolitzada.

a) Preparació de la mostra:

A 0,4 mg de MP s'afegeix 1 ml 150 mM KCl, 10 mM carbonat/bicarbonat pH 10 i es centrifuga, es descarta el sobrenedant i es torna a repetir el procés dues vegades per assegurar-nos de que la mostra ha sigut ben rentada. El sediment es resuspèn en un

volum final de 50 μl del mateix tampó. Aquest volum es diposita sobre una finestra de CaF_2 i es seca parcialment en una campana de buit. Un cop obtingut el film s'aplica tampó per obtenir la humitat desitjada i seguidament es tapa el film amb una altra finestra amb un espaiador entre mig de 0,5 mm tancant-ho hermèticament. Previ a l'adquisició dels espectres, la mostra s'adapta a la llum durant uns minuts (veure secció III.3.5)

b) Adquisició d'espectres:

Una vegada adaptada a la llum es col·loca la mostra en un portamostres allotjat en una càmera dins de l'infraroig la humitat de la qual es purga contínuament amb aire sec per disminuir al màxim la presència de vapor. Mitjançant un bany Haake K, es manté la mostra a la temperatura adequada segons l'experiment.

Abans de començar a adquirir espectres es fa un primer espectre d'absorbància per determinar la humitat de la mostra mitjançant el càlcul de la relació entre les bandes de l'aigua (3400 cm^{-1}) i Amida I i II (Bouché et al., 1992) de manera que la humitat de la mostra es superior al 80% quan (banda $\text{H}_2\text{O}/\text{Amida I}$) és superior a 2 i ($\text{Amida I}/\text{Amida II}$) és superior a 1,2.

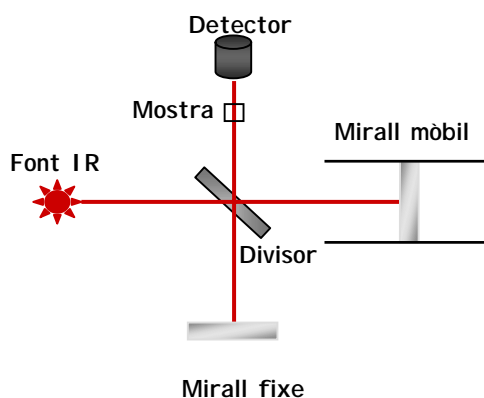


Figura III.20. Esquema del funcionament de l'espectrofòmetre d'infraroig.

Un cop que tant la temperatura com la humitat de la càmera s'han estabilitzat es procedeix a l'adquisició d'espectres. Les mesures consisteixen en adquirir una sèrie d'espectres de la mostra mentre és il·luminada contínuament. Posteriorment els espectres en absència d'il·luminació es resten dels corresponents a il·luminació, obtenint així l'espectre de diferència entre els intermediaris del fotocicle i la bR en estat fonamental.

La il·luminació de la mostra es duu a terme mitjançant un il·luminador on la llum es filtra mitjançant un filtre groc, i la calor es filtra a través d'un recipient d'aigua.

Els espectres s'han adquirit en un espectrofotòmetre Bio-Rad FTS 6000 amb transformada de Fourier el funcionament del qual es troba esquematitzat a la figura III.20. Per una mateixa mostra s'adquireixen 5 tandes de espectre amb 350 espectres cadascun obtenint-se al final 1750 espectres de diferència. S'ha treballat a una resolució de 2 cm^{-1} . Els espectres obtinguts han sigut analitzats mitjançant el programa GRAMS.

III.11. Microscopia de força atòmica (AFM)

L'AFM és una tècnica que permet resoldre superfícies. L'aparell consisteix en un portamostres de caràcter piezoelèctric on es diposita la mostra. La mostra s'escaneja amb una punta que es troba subjecta per un braç. Sobre aquest braç s'hi fa incidir un feix de làser que és reflexat pel braç i va a parar al detector (figura III.21).

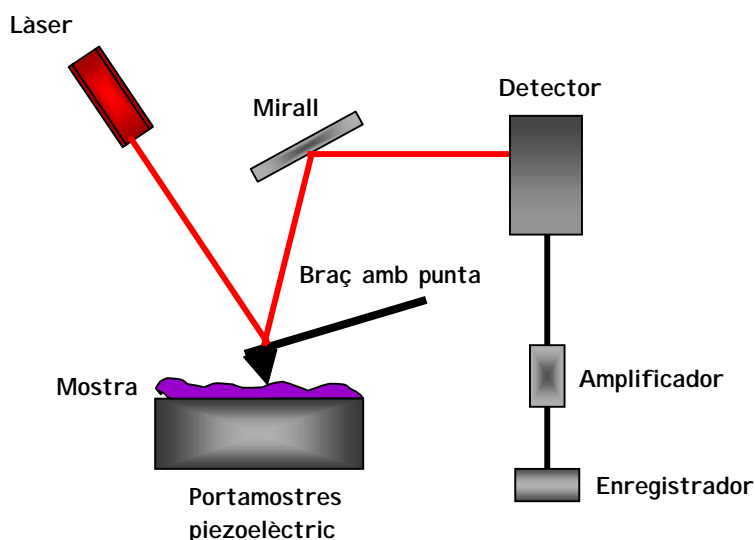


Figura III.21. Diagrama esquemàtic del funcionament de un microscopi de força atòmica.

L'obtenció d'imatges superficials consisteix en escanejar la superfície de la mostra amb la punta aplicant una força constant. Canvis en el relleu de la superfície involucren moviments verticals de la punta i per tant diferents angles de reflexió del làser. La imatge superficial s'obté per la representació dels canvis verticals en funció de la posició lateral de la punta.

En un principi aquesta tècnica es va utilitzar per a resoldre superfícies de mostres no biològiques, però en els darrers anys s'ha utilitzat per mostres biològiques com DNA, lípids o proteïnes en presència del seu tampó i a temperatura ambient.

Preparació de la mostra

- Es prepara mostra de membrana púrpura a 50 µg/ml en 200 mM de KCl i 20 mM TRIS pH 8,2.
- 20µl de la mostra preparada es dipositen sobre un fragment d'1 cm² de mica prèviament exfoliada per eliminar imperfeccions de la superfície. La mica es troba adderida a un suport de teflò.
- Es deixa durant uns 10-30 minuts a temperatura ambient perquè els fragments de membrana púrpura s'addereixin bé a la superfície de la mica. Com que la mica i la MP estan carregada negativament és necessària la presència dels cations K⁺ per fer de pont entre les càrregues negatives i evitar així la repulsió electrostàtica.
- La mostra adderida suaument es renta amb tampó d'escanejat consistent en 10 mM NaCl, 20 mM MgCl i 20 mM TRIS a pH 8,2. Un cop rentat es posa una gota d'aquest tampó sobre la mostra i es posa sobre el portamostres del microscopi.
- Es deixa la punta sucant al tampó durant un parell d'hores per que s'estabilitzi.
- Passat aquest temps es comença a escanejar la superfície.

Característiques de l'escanejat

- S'ha utilitzar un microscopi de forces Nanoscope III de Digital Instruments.
- La punta utilitzada en aquest cas és de nitrat de silicona afilada.
- L'escanejat es realitza en el mode de contacte, on la punta contacta contínuament amb la mostra.
- La força d'aplicació de la punta sobre la superfície és de 100-300 pN.

Tractament de les imatges

Un cop obtingudes les imatges amb el mateix programa del microscopi es pot fer un primer tractament de les imatges consistent en l'anul·lació del soroll de fons mitjançant una desondulació de la imatge i un posterior filtrat aplicant la transformada de Fourier i seleccionant aquelles freqüències de major repetició.

III.12. Obtenció de cristalls de bR

El mètode utilitzat per l'obtenció de cristalls de bacteriorodopsina ha estat el basat en el mètode per fase cúbica descrit per Landau et al (1996) i modificat per Facciotti et al. (2001). Per tal de poder obtenir els cristalls, primer s'ha de solubilitzar la proteïna obtenint-se els monòmers.

Solubilització de la bR

- S'incuben 10 mg de bacteriorodopsina amb 200 mg d'octilglucòsid (OG) en un volum total de 17 ml amb 25 mM Na⁺/K⁺ pi a pH 5,6. La incubació es realitza a temperatura ambient i a les fosques durant unes 24 hores.
- Passat el temps d'incubació s'ultracentrifuga la mostra a 150.000 g durant 30 minuts per tal de sedimentar els fragments de membrana púrpura que no han sigut solubilitzats.
- Es pren un espectre d'absorbància del sobrenedant per tal de determinar tant l'estat correcte de la bR com la seva concentració.
- La mostra es concentra a 18 mg/ml amb Centricons 30 de Millipore.
- La mostra ja es troba preparada per iniciar el protocol de cristal·lització. Aquesta bR pot ser congelada a -80° C i ser utilitzada posteriorment.

Cristal·lització

- En eppendorfs de 200 µl de PCR s'introdueixen 13 mg de 1-mono-oleïna-rac-glicerol (MO) i 13 µl de bR solubilitzada i concentrada. Aquest procés es repeteix en 6 eppendorfs més ja que per assegurar la correcta cristal·lització de la bR es proven diferents condicions (veure més endavant).
- Es centrifuguen les mostres a 22° C durant 10 min a velocitats de 6.000 g, 7.000 g, 8.000 g, 9.000 g i 10.000 g rotant 180° els tubs entre centrifugació i centrifugació.
- Es centrifuga durant 100 min a 10.000 g.
- Es rota 180° i es centrifuga durant 3 h a 10.000 g.
- S'incuben les mostres a 21° C durant tota la nit i a les fosques.
- A cada tub s'afegeix 100 µl d'una solució Na⁺/K⁺ pi pH 5,6. A cada tub s'afegeix una concentració diferent des de 2,4 a 3 M, ja que el procés de cristal·lització depèn de la concentració de sal afegida. Es per aquest motiu que realitzant un banc de diferents concentracions ens assegurem de que en algun tub s'obtinguin bons cristalls.

-Incubació a 21° C i a les fosques al voltant d'un mes. Passat aquest temps es segueix el creixement dels cristalls mitjançant microscòpia òptica.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.1. Disseny i obtenció de les bR mutants

IV.1.1. Selecció de les mutacions.

El meu treball de tesi ha consistit en aclarir la funció de certs aminoàcids localitzats sobretot a la part extracel·lular de la bacteriorodopsina. Es van realitzar tres grups de mutacions detallats a l'apartat d'objectius resumit en: estudi d'alguns grups formadors de ponts d'hidrogen, estudi de la funció de prolines extracel·lulars i estudi de la relació del Glu 194 i Asp96. A la taula IV.1. es mostra la localització de cadascuna d'aquestes mutacions.

Taula IV.1. Descripció de les mutacions introduïdes a la bR.

Mutant	Localització	Situació	Estudi
R7E/E9R	Extrem N-ter/Hèlix A	Extracel·lular	Estudi grups formadors ponts d'hidrogen.
Y79F	Bucle B-C		
S193A	Hèlix F		
P8G	Extrem N-ter		Estudi funció prolines extracel·lulars.
P8W	Extrem N-ter		
P77G	Bucle B-C		
P200G	Bucle F-G		
P8G/P77G/P200G			
D96N[*]	Hèlix C	Citoplasmàtica	Estudi relació Glu 194 i Asp 96.
E194Q^{**}	Hèlix F/Bucle F-G	Extracel·lular	
D96N/E194Q		Extracel·lular/ Citoplasmàtica	

*Mutant estudiat àmpliament per altres autors però en alguns aspectes falta informació (Otto et al., 1989; Tittor et al., 1989; Kamikubo et al., 1997). **Mutant ja construït i estudiat parcialment al nostre laboratori.

IV.1.2. Obtenció dels mutants

L'obtenció dels mutants s'ha realitzat mitjançant la metodologia que es detalla a l'esquema IV.1. Com que la velocitat de creixement de *Halobacterium salinarum* és molt lenta i el coneixement de tècniques moleculars aplicades a aquesta espècie són molt pobres es fa servir l'espècie *Escherichia Coli* com a eina de construcció del gen *bop* mutant.

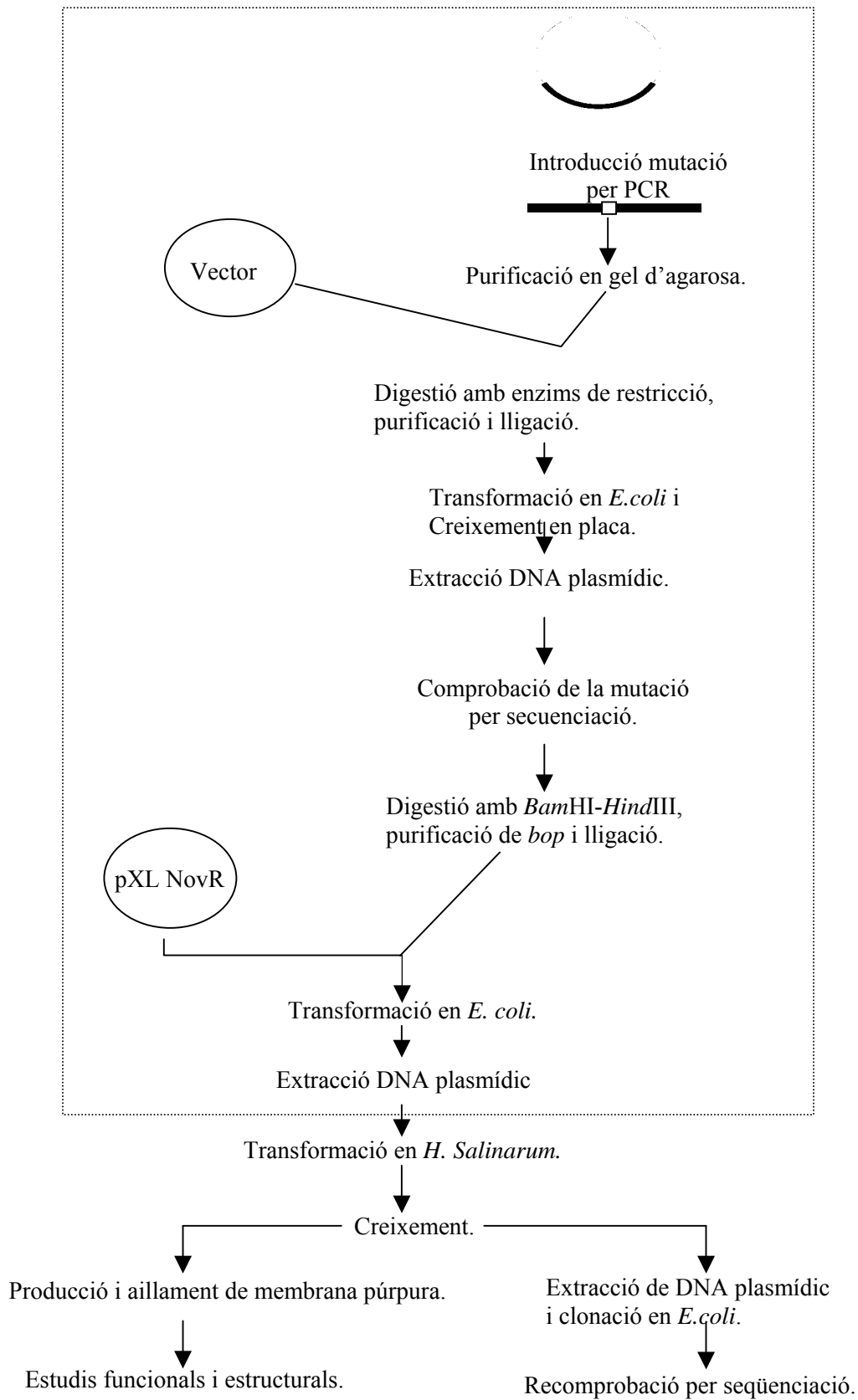


Figura IV.1. Esquema d'obtenció dels mutants de bacteriorodopsina. Dintre del requadre es troben inclosos aquells processos que es duen a terme a *E. Coli*.

Un cop obtingut el gen mutat, l'expressió de la proteïna mutant ja es duu a terme en l'espècie hoste per tal d'obtenir la proteïna en el seu ambient natural, fet que en aquest cas és molt important tenint en compte que es tracta d'una proteïna transmembranal i que la membrana citoplasmàtica d'*H.salinarum* té una composició especial (Kates et al., 1982) (veure secció I.2).

Fins a l'any 1991, els mutants de bR s'obtenien mitjançant la expressió de bacterioopsina en *E.coli*, la qual s'inseria en liposomes i posteriorment s'incubava amb retinal *tot-trans* per formar bacteriorodopsina (Nassal et al., 1987). Aquesta metodologia encara que era ràpida no era fiable ja que quan posteriorment es va aconseguir la seva expressió en *H.salinarum* es va observar que algunes característiques de la bR canviaven depenent de quin mutant s'expressava. El fet de que s'inserís el retinal de manera artificial i de que l'ambient de lípids generats al liposomes fos diferent a la de la membrana hoste devien fer que aquests mutants tinguessin propietats diferents als obtinguts al bacteri original.

IV.1.2.1. Mutants R7E/E9R, Y79F i S193A

R7E/E9R Donada la proximitat d'aquests dos residus es va dissenyar un sol oligonucleòtid mutagènic que contingués les dues mutacions a l'hora. Com que la mutació a introduir es troba al mig del fragment clonat (figura III.1) és necessari la realització de dues rondes de PCR tal i com s'indica a la figura III.3. El DNA motlle que es va utilitzar a la PCR és el que conté la meitat del gen comprès entre les dianes *Bam*HI i *ACC65* (pUCBM20-*bop*^{B-A}) per tal de no tenir productes de PCR massa extensos i per tal de no haver de seqüenciar fragments tant llargs (figura IV.2). Un cop realitzades les dues rondes de PCR es reconstitueix el gen sencer i es seqüencia per la seva posterior expressió en *H.salinarum*.

Y79F En aquest cas en trobar-se la mutació prop de la diana de restricció *ACC65* només va ser necessari fer una única ronda de PCR ja que dintre de l'oligonucleòtid mutagènic s'ha inclòs la diana de restricció *ACC65* (figura III.1). Aquest cop s'utilitza com a DNA motlle el fragment del gen *bop* comprès entre les dianes *ACC65* i *Hind*III (figura IV.3).

S193A En aquest cas va ser necessari fer dues rondes de PCR ja que la mutació a introduir es troba en mig del fragment clonat. Com a DNA motlle s'ha utilitzat el plàsmid amb el fragment *bop* clonat entre les dianes *ACC65* i *Hind*III (figura IV.4).

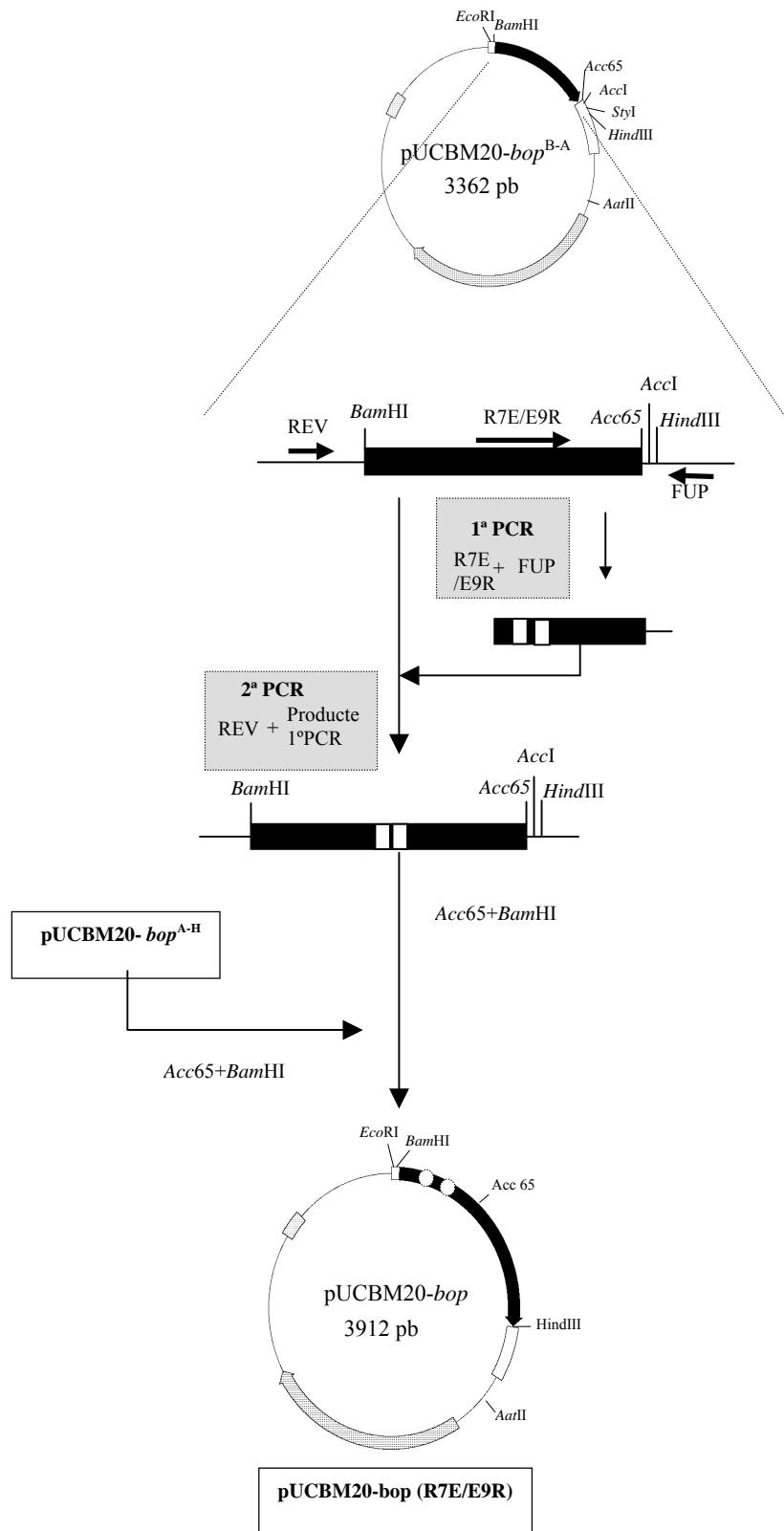


Figura IV.2. Esquema d'obtenció del mutant R7E/E9R aplicable també al cas del mutant P8G i P8W.

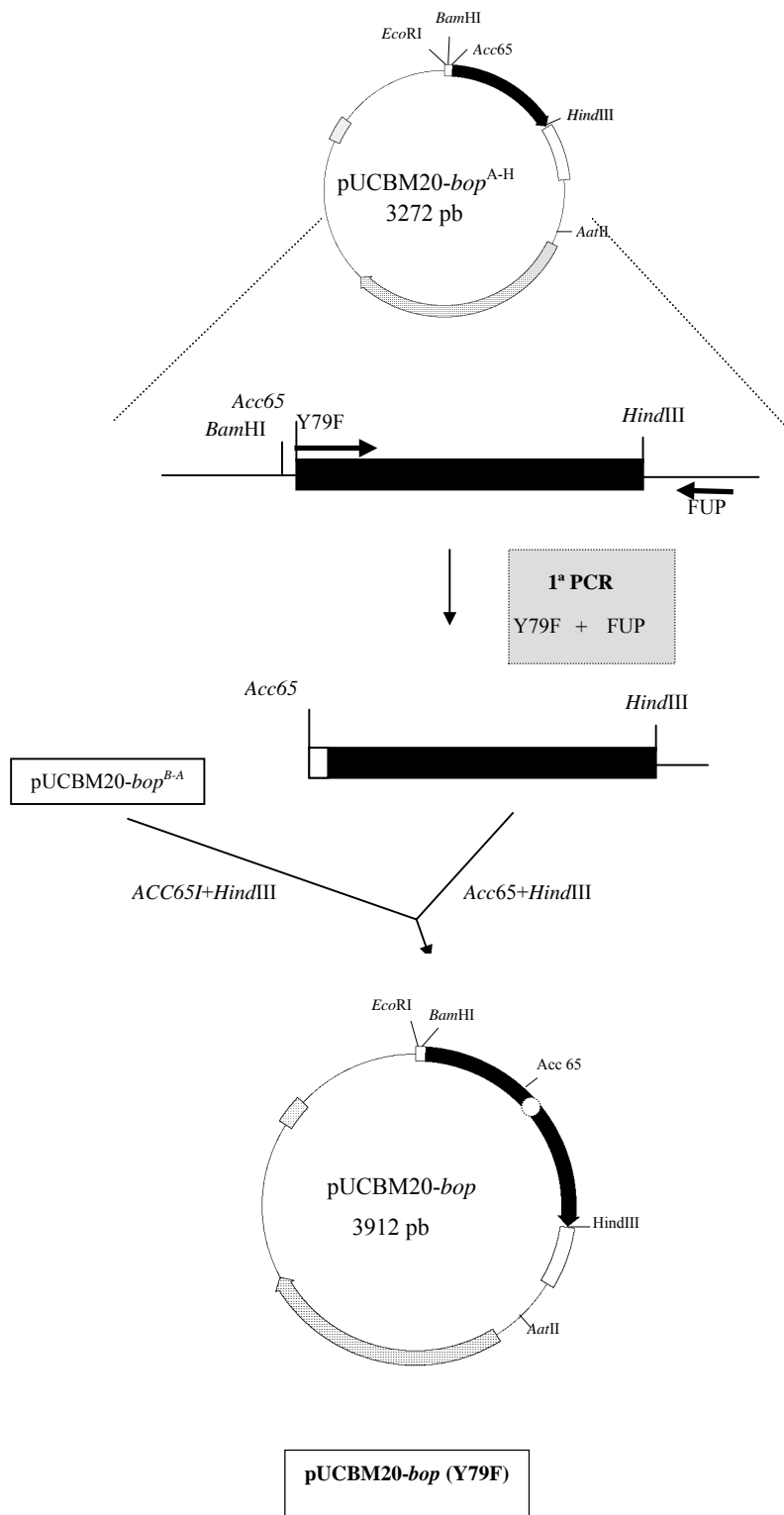


Figura IV.3. Esquema d'obtenció del mutant Y79F aplicable també al mutant P77G.

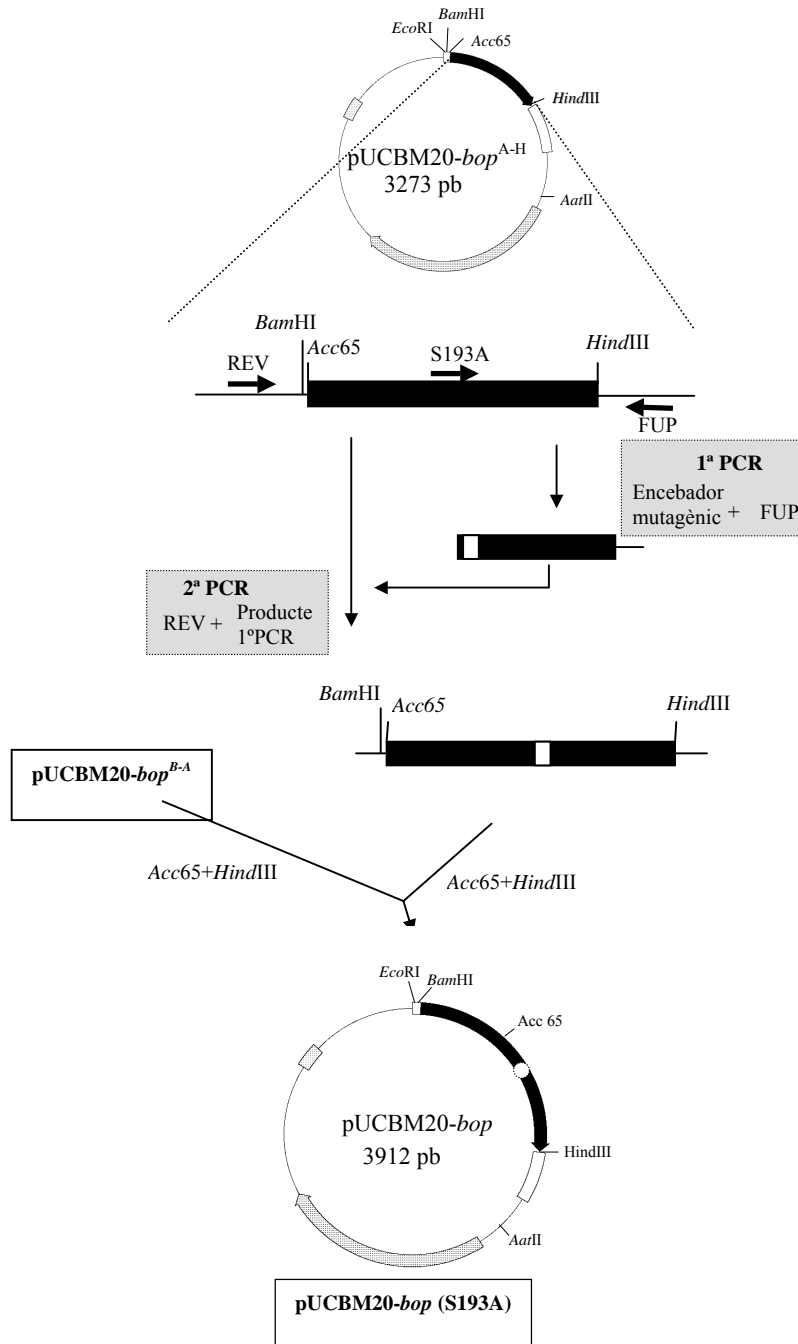


Figura IV.4. Esquema d'obtenció del mutant S193A aplicable també als mutants D96N, E194Q i P200G.

IV.1.2.2. Mutants P8G, P8W, P77G, P200G i P8G/P77G/P200G (3PG)

P8G i P8W Per realitzar aquests mutants s'ha utilitzat com a DNA motlle el fragment del gen comprès entre les dianes *BamHI* i *Acc65*. Com que el nombre de rondes de PCR realitzades han sigut dos, l'esquema de construcció es el mateix que per al cas del mutant R7E/E9R de la figura IV.2.

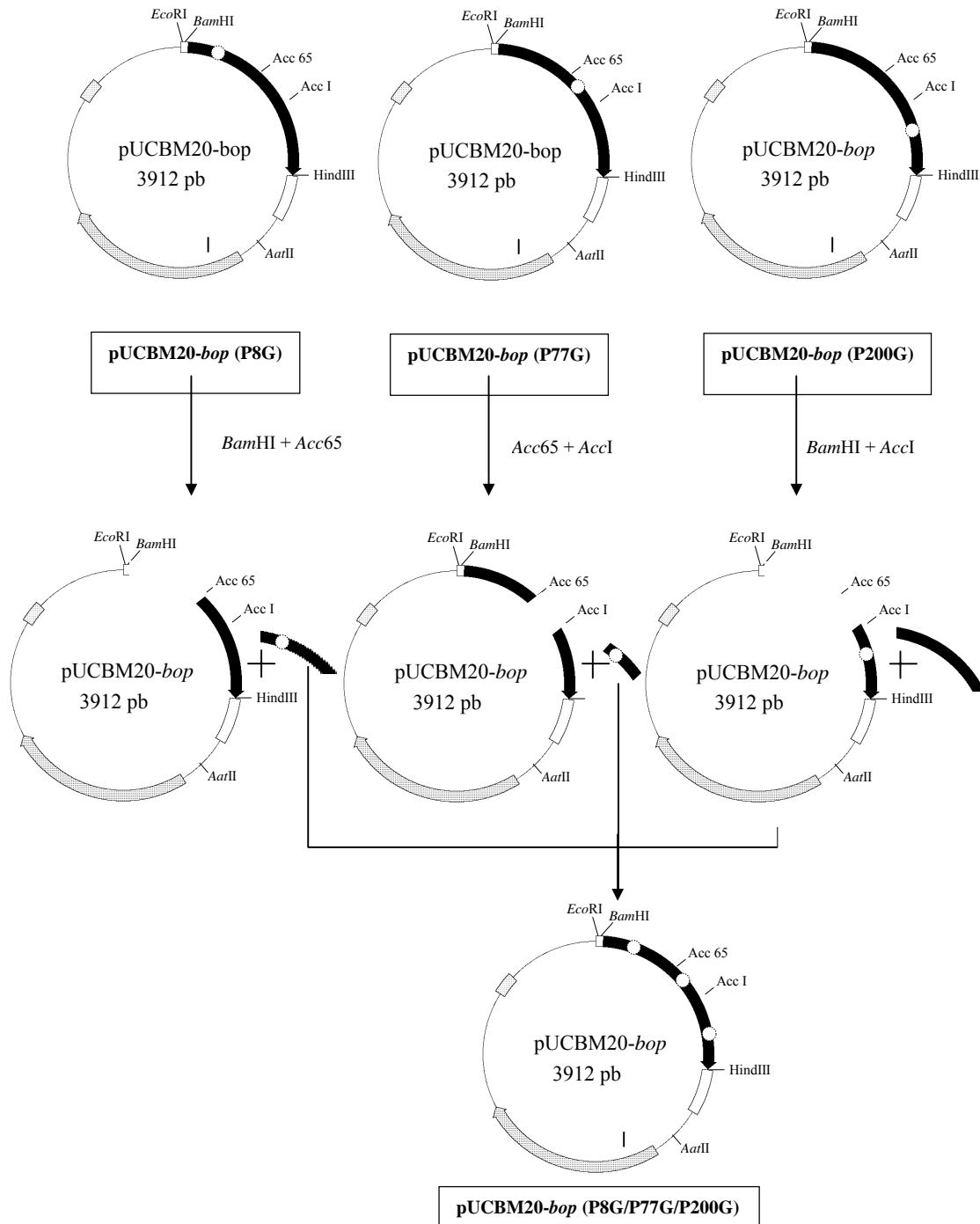


Figura IV.5. Esquema de construcció del triple mutant P8G/P77G/P200G.

P77G per realitzar aquest mutant es va a dur a terme el mateix protocol que en el cas del mutant Y79F esquematitzat a la figura IV.3.

P200G Ja que la mutació a introduir es troba en mig del fragment *Acc65/HindIII* (figura III.1) són dues les rondes de PCR necessàries com en el cas dels mutants D96N, E194Q i S193A (figura IV.4).

P8G/P77G/P200G (3PG) El triple mutant es va realitzar aprofitant les dianes úniques de restricció existents entre les diferents mutacions mitjançant l'empalmament de cadascuna de les mutacions individuals per digestió amb enzims de restricció i lligació (figura IV.5).

IV.1.2.3. Mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q

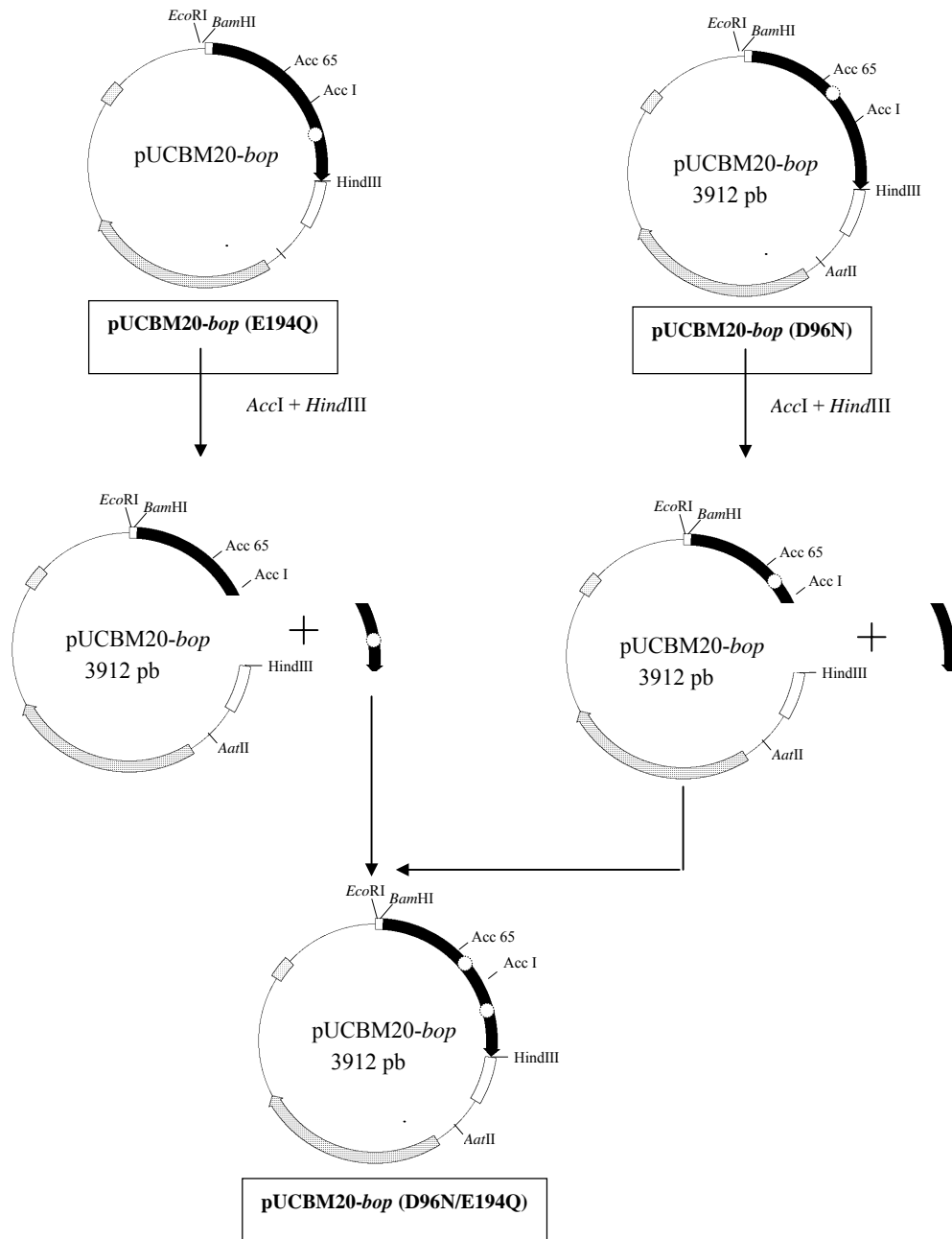


Figura IV.6. Esquema de construcció del mutant D96N/E194Q.

D96N El DNA motlle utilitzat és el fragment del gen *bop* comprés entre les dianes *Acc65* i *HindIII* clonat al plàsmid pUCBM20. Així doncs el mecanisme d'introducció de la mutació és el mateix que l'emprat pel mutant S193A (figura IV.4).

E194Q Aquest mutant va ser construït per una anterior companya del grup (Sanz., 2000). El mecanisme que va utilitzat és l'esquematitzat a la figura IV.4.

D96N/E194Q El doble mutant va ser construït a partir dels mutants individuals aprofitant l'existència d'una diana de restricció única, *AccI* (figura III.1) entre la mutació D96N i E194Q (veure figura IV.4)

VI.1.2.4. Obtenció de les *bR* mutants

Un cop que s'ha comprovat la presència de la mutació correcta, mitjançant la seqüenciació del gen (veure secció III.2.8), es realitza un escalat de creixement d'*H.salinarum* fins a deu litres (veure secció III.1.5). Ja des del moment en el que es procedeix a l'extracció de membrana púrpura es poden observar canvis entre els diferents mutants, com és la densitat del sediment o el color de la membrana púrpura.

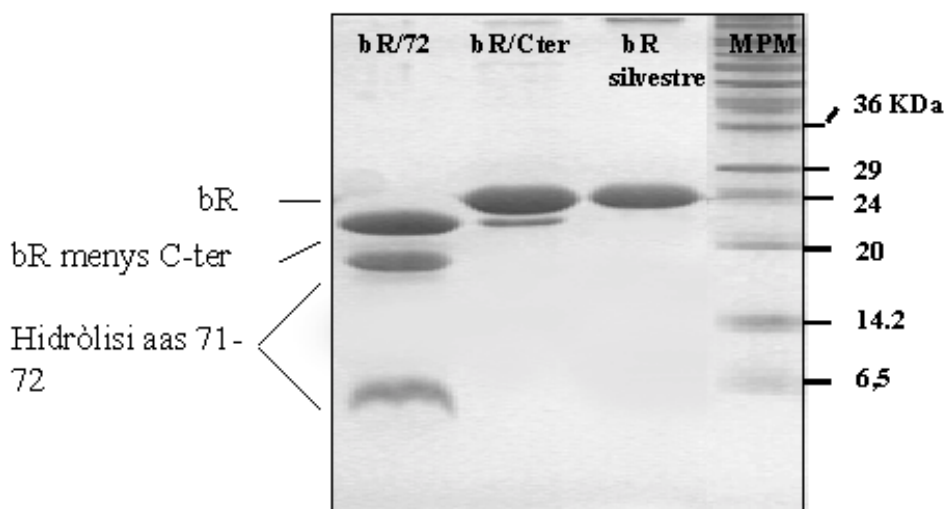


Figura IV.7. Mobilitat electroforètica en SDS-PAGE en un gel del 15 % d'acrilamida de (de dreta a esquerra): marcador de pes molecular, bR silvestre, bR amb l'extrem C terminal hidrolitzat, bR tant amb hidròlisi a l'extrem C terminal com entre els aminoàcids 71 i 72. Estan indicats els pesos moleculars en KDa de les bandes més importants de marcador, en aquest cas Wide Range de Sigma.

Un cop que s'ha extret la MP es realitza un espectre d'absorció en el espectrofotòmetre UV-visible entre 250 i 800 nm d'una mostra prèviament adaptada a la llum (veure secció III.3.5) ja que el coeficient d'extinció molar és diferent per la forma

adaptada a la llum i a la foscor. D'aquesta manera no solament determinem la concentració de la mostra (veure secció III.3.3) sinó que també comprovem la puresa de la MP obtinguda mitjançant la relació A_{285}/A_{570} , la qual s'ha de trobar per sota de 2, i l'absència de bandes corresponents a altres pigments de la membrana com la bacterioruberina (veure secció I.2).

A més d'aquest control també es duu a terme una electroforèsi en gel de SDS-PAGE no solament per comprovar la presència única de la bacteriorodopsina, sinó també per detectar si la proteïna es troba en la seva forma nativa i no hi ha presència ni de precursors ni es troba hidrolitzada entre els aminoàcids 71 i 72 o de l'extrem C-terminal (figura IV.7.)

La bR té un pes molecular de 26 KDa, però el seu recorregut electroforètic no es correspon amb el marcador de pes molecular. Això es degut a que les proteïnes utilitzades al marcador són solubles i la bR no ho es; amb SDS s'aconsegueix una desnaturalització parcial de la proteïna produint-se solament una certa descompactació de les hèlices.

Cal dir que l'eficiència de producció de bR depèn de cada mutant. De bR salvatge s'obtenen normalment uns 20 mg/l, en el cas dels mutants s'obtenen generalment uns 10 mg/l, excepte pels mutants P8G i 3PG on només s'aconsegueix com a molt uns 0,5 mg/l. Sembla ser que quan es substitueix la prolina 8 per una glicina s'impedeix la formació de bR, potser degut a la dificultat de la seva inserció en la membrana citoplasmàtica. El mutant P8W però, té un nivell d'expressió de la bR normal demostrant doncs, que l'absència de formació de bR als mutants P8G i 3PG no és degut a l'absència d'aquesta prolina sinó a la presència d'una glicina en aquesta posició. Seria interessant estudiar en el futur en quin nivell s'inhibeix la síntesi de la bR en aquests mutants.

IV.2. Estudi dels mutants R7E/E9R, Y79F i S193A

Aquests residus es troben localitzats a la regió extracel·lular de la bacteriorodopsina (figura IV.8). Tots aquests grups es troben propers a la via de pas del protó i formen ponts d'hidrogen amb molècules d'aigua i grups involucrats en la xarxa de ponts d'hidrogen entre la BS i la regió extracel·lular de la bR (veure secció I.10.1).

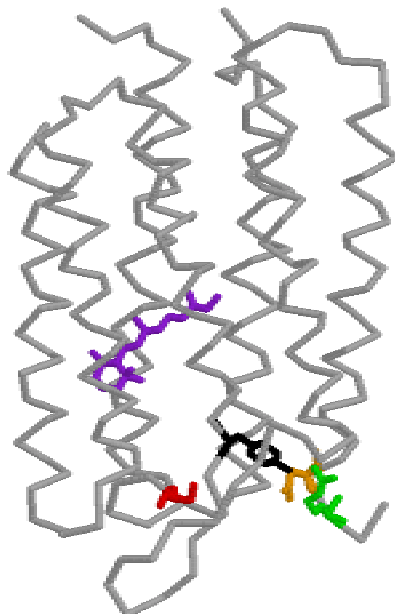


Figura IV.8. Model de la bR a partir de l'estructura resolta per Luecke et al (1999a) on es troben indicats en púrpura la molècula de retinal, en vermell la Ser 193, en verd l'Arg 7, en groc el Glu 9 i en negre la Tyr 79.

IV.2.1. Objectiu de les mutacions

El doble mutant R7E/E9R s'ha construït amb la intenció d'estudiar si la inversió de la càrrega positiva i negativa d'aquests grups pot influir en l'establiment de ponts d'hidrogen amb la tirosina 79 per un costat, i amb les aigües 415, 416 i 417 i la metionina 60 per altre costat (figura I.16. i I.20).

Per tal d'obtenir una aproximació de les interaccions que es podrien donar en aquests mutants s'han realitzat visualitzacions moleculars mitjançant el programa Swiss Prot PDB Viewer (figura IV.9). Aquest visualitzador es troba hospedat al servidor de la base de dades de proteïnes "swiss prot", i incorpora la funció de mutar aminoàcids de l'estructura.

L'orientació dels aminoàcids mutats representats es correspon amb la conformació de mínima energia, encara que aquesta no té perquè proporcionar la correcta orientació dels residus mutats. Aquest fet, junt amb el fet de que la visualització molecular no preveu canvis ni dels altres aminoàcids no mutats ni de les molècules d'aigua, fa que les interaccions i orientacions obtingudes per la visualització puguin ser diferents a les existents en la realitat. Per poder tenir una millor aproximació

dels canvis que es produeixen en mutar residus de la bR, s'haurien de portar a terme càlculs de dinàmica molecular.

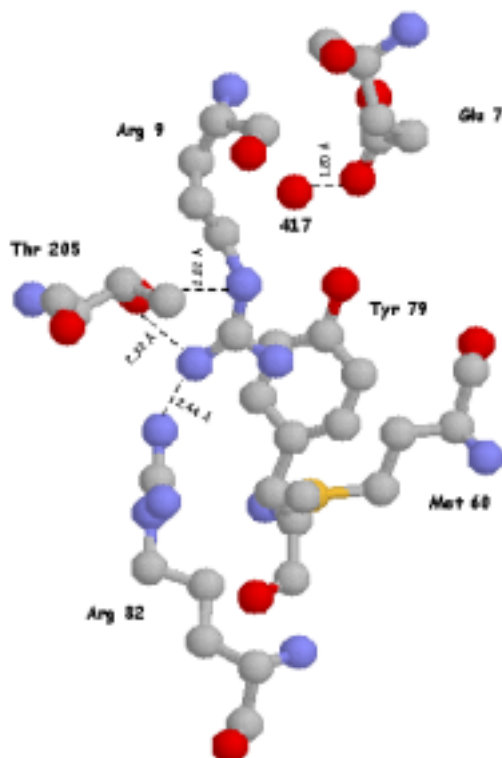


Figura IV.9. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen que es produirien en el mutant R7E/E9R. En vermell estan representats els àtoms d'oxigen, en blau els de nitrogen i en groc el de sofre. Estructura de Luecke et al. (1999a).

L'aproximació donada per visualització del mutant R7E/E9R (figura IV.9) mostra que les mutacions podrien produir un canvi important en les interaccions per pont d'hidrogen trencant-se la interacció dels dos grups amb la tirosina 79. El glutàmic 7 no establiria un pont d'hidrogen amb la metionina 60 com ho fa l'arginina en la mateixa posició, però sí amb l'aigua 417. L'arginina 9 establiria uns ponts d'hidrogen nous amb l'arginina 82 i amb la treonina 205. Així doncs amb la introducció d'aquesta mutació es produiria un trencament de les interaccions entre les hèlices A-B i A-C, formant-se noves interaccions entre les hèlices A-C, via l'arginina 82, i A-F, via la treonina 205.

El mutant Y79F s'ha construït amb un objectiu similar. L'absència del grup hidroxil de la fenilalanina 79 impediria que aquesta formés un pont d'hidrogen amb l'arginina 7 i el glutàmic 9 trencant-se així la interacció entre les hèlices A i C. Per altra banda la unió amb les aigües 404 i 405 es trobaria inalterada ja que aquesta es dona mitjançant l'oxigen i el nitrogen de l'enllaç peptídic (figura IV.10).

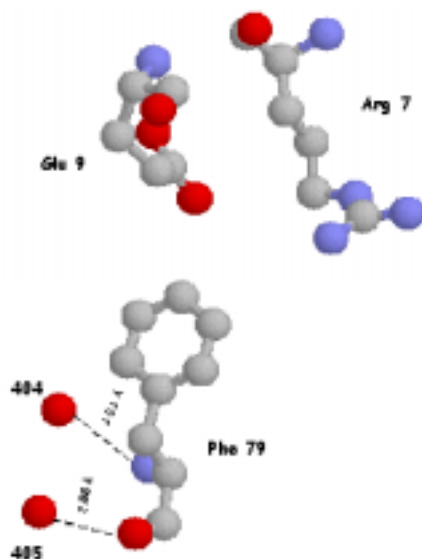


Figura IV.10. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen del mutant Y79F. En vermell es troben representats els oxígens i en blau els nitrògens. Estructura de Luecke et al. (1999a).

El motiu d'estudiar el mutant S193A ha sigut obtenir informació sobre la seva participació en el mecanisme d'expulsió del protó al medi extracel·lular. En principi, l'únic pont d'hidrogen que es trencaria en realitzar la mutació seria l'establert entre l'OG de la serina i l'OE1 del glutàmic 204 (figura I.17). L'altra interacció del glutàmic 204 amb l'alanina es trobaria intacte ja que en aquest enllaç s'hi troba involucrat el nitrogen de l'enllaç peptídic de la serina que hi continua estant en mutar-la per una alanina (Figura IV.11).

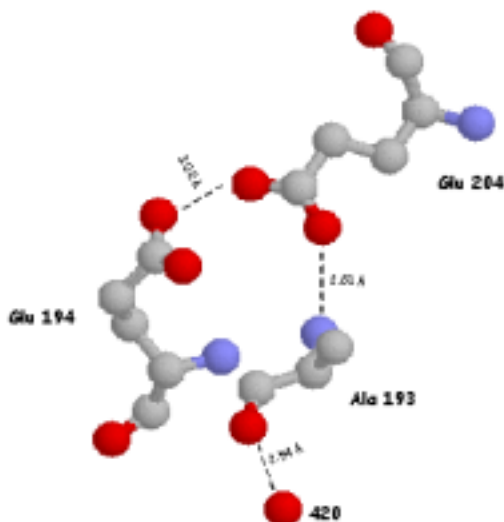


Figura IV.11. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen del mutant S193A. En vermell es troben representats els oxígens i en blau els nitrògens. Estructura de Luecke et al. (1999a).

IV.2.2. ESTUDI ESTRUCTURAL

IV.2.2.1. Espectre d'absorbància i adaptació llum-foscor.

La bR posseeix un espectre d'absorbància en el rang del UV-visible amb dues bandes característiques. La més ampla, compresa entre 500 i 700 nm, es correspon amb l'absorbància del retinal en el seu entorn natural a la bacteriorodopsina (figura IV.12.A), i la més estreta, compresa 250 i 300 nm, es correspon amb l'absorbància dels triptòfans i tirosines de la proteïna.

El màxim d'absorbància de la bR depèn de l'estat en que es trobi, adaptat a la llum (LA) o adaptat a la foscor (DA) (veure secció I.5.2). La forma DA es caracteritza per presentar un màxim d'absorbància a 558 nm i un coeficient d'extinció molar, ϵ , de $58000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La il·luminació d'aquesta forma dóna lloc a la forma LA que presenta un màxim d'absorbància 10 nm desplaçat cap al vermell, 568 nm, i un augment aproximat del 10 % de la ϵ , $63000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (figura IV.12.A).

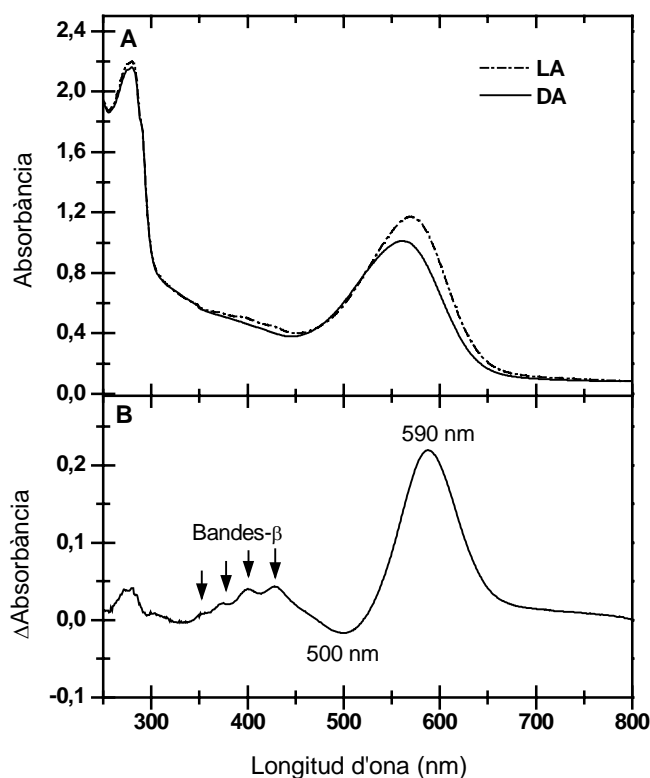


Figura IV.12. (A) Espectres d'absorció de la bR silvestre en la seva forma adaptada a la llum (LA), línia discontinua, i a la foscor (DA), línia continua, en 150 mM KCl, pH 7 i temperatura ambient. (B) Espectre de diferència entre les formes LA i DA.

En l'espectre de diferència entre les formes LA i DA (figura IV.12.B) s'observa, a més d'una banda negativa a 500 nm i una banda positiva a 590 nm, la presència de

quatre petites bandes d'absorció entre 350 i 450 nm anomenades bandes β . Aquests canvis es produeixen com a conseqüència del canvi d'isomerització del retinal des de *13-cis/tot-trans* (2:1) a 100 % *tot-trans* en passar de la forma DA a LA (veure secció I.5.2).

L'espectre d'absorbància característic de la bR ve donada per les característiques de l'entorn del retinal, sobre tot pel contraió de la BS (veure secció I.5.1). Qualsevol alteració en aquest entorn pot produir una deslocalització electrònica diferent del retinal, canviant el seu espectre d'absorbància. Així doncs, la introducció de mutacions en la bR pot alterar l'entorn del cromòfor traduint-se en un màxim d'absorbància diferent. Ja que les mutacions que s'estudien en aquest treball poden alterar la xarxa de ponts d'hidrogen entre l'Asp 85 i la part extracel·lular, indirectament podrien alterar l'entorn del retinal. Es per aquest motiu que la primera característica dels mutants a tenir en compte és el seu espectre d'absorbància.

Els mutants R7E/E9R i Y79F presenten uns màxims d'absorbància normals tant per la forma DA com LA (taula IV.2), indicant que les mutacions introduïdes, tot i que podrien alterar la xarxa de ponts d'hidrogen, sembla ser que no afecten de manera important l'entorn del retinal en cap de les dues formes. El mutant S193A però, presenta uns màxims lleugerament alterats indicant la influència d'aquesta mutació sobre l'entorn del retinal.

Taula IV.2. Màxim d'absorbància (en nm) de mostres de bR en 150 mM KCl, pH 7, i temperatura ambient per a les formes LA i DA.

Mostra	Adaptat a la llum	Adaptat a la foscor
bR silvestre	568	558
R7E/E9R	568	559
Y79F	569	560
S193A	570	562

Per altra banda el temps d'adaptació a la foscor també és una característica que cal tenir en compte per determinar el possible efecte de les mutacions sobre l'entorn del retinal. La bR silvestre adaptada a la llum, retorna a la seva forma adaptada a la foscor en mitja hora a temperatura ambient o en unes 12 h a 4° C, en absència d'il·luminació (veure secció I.5.2). El temps d'adaptació a la foscor és similar en els mutants R7E/E9R i Y79F, corroborant així l'absència de canvis importants en l'entorn del retinal en

realitzar aquestes mutacions. El mutant S193A però, mostra una alteració important en el temps de adaptació a la foscor, sent necessari de l'ordre d'un mes a 4° C o de tres dies a temperatura ambient per obtenir la forma adaptada a la foscor. Aquesta mutació així doncs, no solament produeix un petit desplaçament en el màxim d'absorbància sinó que també produeix una alteració en la cinètica d'isomerització del retinal des de *13-cis* a *tot-trans*.

IV.2.2.2. Comportament de la bR front l'acidificació del medi

Quan es disminueix el pH del medi d'una mostra de bR silvestre adaptada a la foscor, s'observa que el màxim d'absorbància de la proteïna es va desplaçant des de 558 a 605 nm (figura IV.13.A). Aquesta forma que absorbeix a 605 nm és l'anomenada forma blava obtinguda com a conseqüència de la protonació de l'aspàrtic 85 (veure secció I.8.3). Aquest fenomen es coneix com a transició púrpura – blau degut al color característic de les dues formes.

Com ja s'ha comentat a la introducció (veure secció I.5.1) l'Asp 85 forma part del contraió de la BS de manera que canvis en el seu estat de protonació afecten de manera important l'entorn del retinal, la qual cosa es tradueix en un canvi de l'espectre d'absorbància de la bR.

Els espectres de diferència [$bR_{pHi} - pH_{neutre}$] (figura IV.13.B) mostren un màxim a 632 nm com a conseqüència de l'aparició de forma blava en disminuir el pH, i un mínim a 543 nm per la desaparició de la forma púrpura, amb un punt isobèstic a 592 nm. Els espectres representats a aquesta figura són de la titració realitzada en 75 mM de Na_2SO_4 en comptes de en 150 mM de KCl com es fa freqüentment. Encara que en totes dues condicions les característiques dels espectres són les mateixes, s'ha representat l'experiment realitzat en absència d'ions clor per tal d'evitar la formació de bR púrpura àcida (veure secció I.9.1) i així poder observar més clarament la forma blava de la proteïna. La representació dels canvis d'absorbància a 630 nm en funció del pH dóna una gràfica, l'ajustament de la qual a una equació sigmoïdal, dóna un punt d'inflexió que equival al pK_a de la transició púrpura-blau, o el que és el mateix, el pK_a de l'Asp 85 (Figura IV.14).

El pK_a obtingut no es el pK_a real de l'aspàrtic 85, sinó que és l' aparent. Això és degut al fet de que el pH mesurat per l'elèctrode no és el mateix que el pH existent a la superfície de la membrana, ja que el fet de que la membrana púrpura es trobi

carregada negativament fa que s'exerceixi una atracció electrostàtica dels protons del medi, generant-se així un pH superficial menor que el del medi. Així doncs el pK_a real es trobaria per sota de l'estimat.

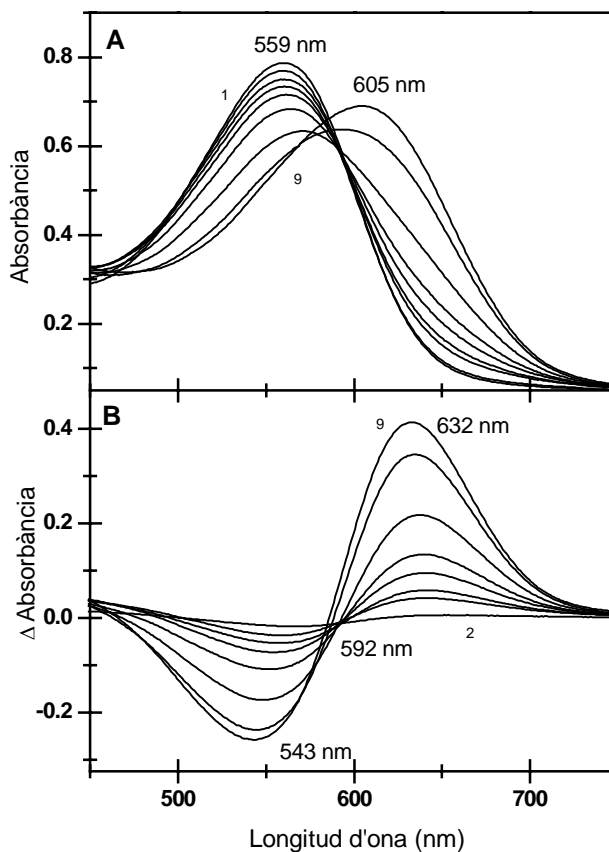


Figura IV.13. (A) Espectres d'absorció de la bR silvestre a diferents pH en 75 mM de Na_2SO_4 i adaptada a la foscor. Valors de pH_i (de l'1 al 9) pH 6,0; 4,5; 3,3; 3,1; 2,8; 2,5; 2,2; 1,9 i 1,6. (B) Espectres de diferència entre pH_i i pH 6,0.

Al nostre laboratori es calcula sistemàticament aquest pK_a com a mínim sota tres condicions de força iònica del medi diferents: 150 mM KCl, H_2O i bR desionitzada i en determinades ocasions en 75 mM de Na_2SO_4 . El sentit de fer l'experiment en aquestes condicions és determinar si la major o menor presència de cations afecta de diferent manera al pK_a de l'Asp 85.

A la taula IV.3 es mostren els valors de pK_a en aquestes tres condicions per als diferents mutants i bR silvestre. Fixant-nos només als valors de la proteïna silvestre, s'observa com a mesura que es va disminuint la concentració d'ions en el medi i per tant en la proteïna es va produint un augment en el pK_a de la transició. En el cas de l'augment de 0,5 unitats de pH entre 150 mM KCl i H_2O és deu a que quan hi ha presència de K^+ al medi, aquests es disposen al voltant de la superfície de la MP

apantallant les càrregues negatives. Quan la bR està suspesa en medi aquós mancat de K^+ aquestes càrregues negatives es troben desapantallades i es produeix un augment de la càrrega superficial negativa, d'aquesta manera els protons del medi serien més atrets per la superfície produint-se així una disminució del pH superficial. D'aquesta manera encara que amb l'elèctrode es mesuri un pH de 3,2 en el medi aquós, en realitat al voltant de la membrana seria de 2,7. Així doncs es suposa que el pK_a real o intrínsec seria el mateix en 150 mM de KCl i en aigua.

Taula IV.3. pK_a de la transició púrpura-blau en diferents condicions per la bR silvestre i bR mutants. Amb asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre. Els valors que no tenen especificat l'error es deu a que aquest és inferior a 0,1.

Mostra	150 mM KCl	H ₂ O	Desionitzada
bR silvestre	2,7	3,2	5,5
R7E/E9R	2,4*	3,9 ± 0,1*	5,5 ± 0,1
Y79F	3,1*	5,0*	5,9*
S193A	2,4*	4,1 ± 0,2*	4,7*

En el cas de la bR desionitzada el pK_a de l'Asp 85 presenta una diferència de 2,3 unitats de pH comparat amb el pK_a en H₂O. Aquest gran increment es deu en part a l'encara major disminució del pH superficial en extreure tots els cations de la proteïna (Kimura et al., 1984), però majoritàriament seria degut als canvis produïts a la bR quan s'extrauen els cations units als seus lloc d'unió (Jonas et al., 1991).

A la figura IV.14. es mostren les corbes de la transició púrpura-blau per als tres mutants i bR silvestre adaptats a la foscor, en 150 mM KCl a temperatura ambient.

R7E/E9R: El pK_a de l'Asp 85 en 150 mM KCl en aquest mutant disminueix 0,3 unitats de pH respecte a la bR silvestre. Aquest fet indicaria que la mutació està alterant sensiblement l'entorn de l'aspàrtic 85, suficientment com per a canviar el seu pK_a . En H₂O hi ha un petit augment del pK_a segurament degut a que els cations extracel·lulars tenen una menor afinitat pels seus llocs específics d'unió i en aigua aquests cations es separarien parcialment, en equilibri amb els cations dissolts en aigua. El pK_a de la forma desionitzada és igual a l'obtingut a la bR silvestre indicant que la mutació en sí no produiria cap canvi en el pK_a de l'Asp 85, i que segurament les diferències obtingudes en 150 mM de KCl i H₂O es produeixen com a conseqüència de l'alteració dels llocs d'unió dels cations en aquest mutant.

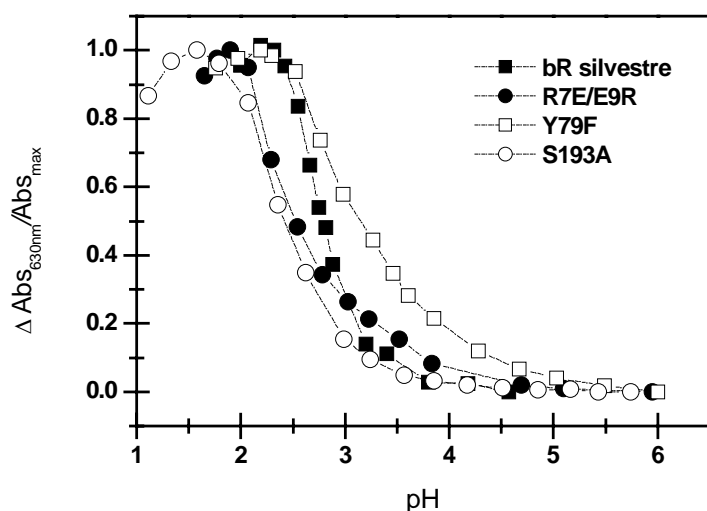


Figura IV.14. Representació de l'increment d'absorbància a 630 nm en funció del pH dels mutants indicats, adaptats a la foscor i en 150 mM KCl.

Y79F: Les dades de pK_a de a la taula IV.3, mostren com la substitució de la tirosina 79 per una fenilalanina dóna lloc al major canvi en el pK_a de l'Asp 85 comparat amb els altres mutants, en les tres condicions estudiades. En 150 mM KCl s'observa un increment de 0,4 unitats de pH comparat amb la bR silvestre; aquest petit canvi es traduiria en el canvi d'entorn de l'Asp 85 que es produiria en mutar la tirosina 79. El canvi més important es produeix quan el mutant es suspèn en H_2O ja que hi ha una diferència d'1,8 unitats de pH comparat amb la bR silvestre. El fet de que la forma desionitzada del mutant Y79F presenti un pK_a 0,4 unitats de pH per sobre de l'obtingut per la bR silvestre indica que la introducció de la mutació produeix canvis independents de la presència o de l'absència de cations a la proteïna. Com que la diferència entre el mutant i la bR silvestre en 150 mM KCl i desionitzada és la mateixa, 0,4 unitats de pH, fa suposar que l'absència de cations no agreuja les diferències entre ambdues mostres. El fet però, de que en H_2O el mutant presenti un pK_a tan elevat fa pensar que aquest augment no seria solament degut a un efecte directe de la mutació sobre l'entorn de l'Asp 85, sinó que també podria ser degut a una unió més feble dels cations en aquest. Així doncs, quan es suspèn la bR en H_2O aquests cations tendeixen a separar-se de la bR en equilibri amb l'aigua, de manera que el contingut de cations del mutant en H_2O seria menor que en cas de la bR silvestre.

S193A: Pel que fa a aquest mutant també es produiria un canvi en l'entorn del retinal com mostra la disminució del pK_a de l'Asp 85 tant a 150 mM KCl com en la forma desionitzada. El fet de que en H_2O el pK_a sigui una mica elevat amb respecte la

bR silvestre, fa pensar que la seva mutació també afectaria sensiblement l'afinitat dels cations en la part extracel·lular. La menor diferència entre el pK_a en aigua i forma desionitzada en aquest mutant respecte a la bR silvestre recolçaria aquesta idea.

Resum i interpretació del resultats d'acidificació.

- La mutació R7E/E9R afecta indirectament el pK_a de l'Asp 85 via una menor afinitat dels cations. La menor afinitat del possible catió localitzat al voltant del glutàmic 9 (Sanz et al., 2001) podria ser el responsable dels canvis en l'entorn del retinal. La menor diferència entre el pK_a en H_2O i la forma desionitzada (1,6) comparat amb la bR silvestre (2,3) recolzaria aquesta hipòtesi.
- La mutació Y79F altera directa i indirectament el pK_a de l'Asp 85. Aquest mutant presentaria una menor afinitat dels cations que el mutant R7E/E9R sent la diferència entre aigua i forma desionitzada tan sols de 0,9.
- El mutant S193A no solament indueix una alteració del pK_a de l'Asp 85 sinó que també és el mutant que semblaria tenir la menor afinitat de cations dels tres mutants tal i com ho mostra la baixa diferència de 0,6 unitats de pH entre les condicions de titració en aigua i desionitzada.

IV.2.2.3. Comportament de la bR front l'alcalinització del medi

En alcalinitzar el medi d'una suspensió de bR poden observar-se una sèrie de canvis espectroscòpics com a conseqüència de l'aparició i desaparició de diferents espècies. A la figura IV.15 es mostren els espectres d'absorbància i diferència en alcalinitzar el medi d'una mostra de bR silvestre en 150 mM KCl. En la figura IV.15.A es pot apreciar com a mesura que es va incrementant el pH es produeix un desplaçament del màxim d'absorbància cap al blau i una posterior aparició d'una espècie absorbent cap a la regió de 350 nm.

Els espectres de diferència de la figura IV.15.B mostren com hi ha involucrades tres espècies diferents en el procés d'alcalinització, l'espècie absorbent a 570 nm corresponent a la forma púrpura, la forma de 470 nm anomenada forma vermella (veure secció I.9.2) i la forma a 365 nm corresponent a l'aparició de retinal fora del seu entorn normal en la proteïna i per tant a la pèrdua del color de la proteïna, anomenat per aquest motiu forma blanquejada.

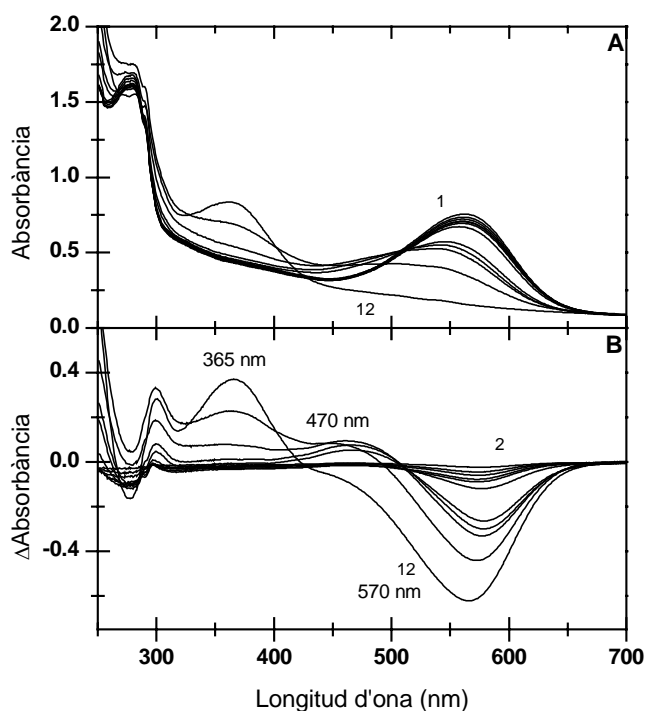


Figura IV.15. (A) Espectres d'absorció de la bR silvestre en alcalinitzar el medi des de pH 6 fins pH 12,7 en 150 mM KCl i sobre mostres adaptades a la foscor. Valors de pH_i (de l'1 al 12) 6,0; 7,7; 9,2; 9,7; 10,5; 11,0; 11,7; 12,1; 12,2; 12,4; 12,7 i 12,8. (B) Espectres de diferència de pH_i menys pH 6,0.

Per tal de determinar en quin moment apareix cadascuna d'aquestes espècies, a la figura IV.16 s'ha representat llur evolució en funció del pH. A partir de pH 11 es pot començar a observar una important desaparició de la forma púrpura que dona lloc a les formes vermella i blanquejada. La forma vermella apareix sensiblement abans que el retinal lliure, ja que aquesta primera espècie seria precursora de la segona. El pK_a d'aparició de la forma 365 nm es troba al voltant de 12,7 i es considera el pK_a de desnaturalització de la bR.

Així doncs en augmentar el pH del medi el primer canvi evident que s'observa és l'aparició de la forma vermella absorbint a 470 nm. Aquesta espècie es correspon amb una bR amb Base de Schiff desprotonada tal i com indiquen estudis d'espectroscòpia de Raman (Druckmann et al., 1982). Aquesta forma vermella és reversible ja que si es baixa el pH per sota d'11 es recupera la bR púrpura en la seva totalitat. Aquesta forma és estable però no indefinidament ja que al cap del temps acaba donant l'espècie de 365 nm. El pK_a d'aparició de forma vermella, de desprotonació de la BS per tant, donada per la corba representada a la figura IV.16 dona un valor de 12,3.

Com que per sobre d'aquest valor es comença a produir la desnaturalització de la bR, l'aparició de la forma vermella es veu emmascarada quan part d'aquesta forma es comença a convertir en forma blanquejada. Així doncs, encara que a partir de pH 12,6 es comença a veure un descens en la quantitat de forma vermella, en realitat aquesta es continuaria formant i per lo tant el pK_a de la BS es trobaria per sobre de 12,3. Diversos treballs de fet, determinen el pK_a de la BS per sobre de 12,4 (Druckmann et al., 1982; Balashov et al., 1991) i no estableixen cap valor concret. El càlcul de la corba de titració duta a terme per Druckmann et al. (1982) donen un valor de pK_a real de la forma vermella al voltant de 13,3.

Balashov et al. (1991) van determinar que la forma vermella es forma en dues fases, la primera d'elles amb un pK_a de 9,0 on es formaria el 6 % de bR vermella, mentre que a la segona, amb un pK_a per sobre de 12,1, es formaria el 94 % restant. De fet, si fem aquest càlcul a partir de la corba de forma vermella de la figura IV.16 veiem com a un pH al voltant de 10 hi ha un 1 % de bR_{470nm}.

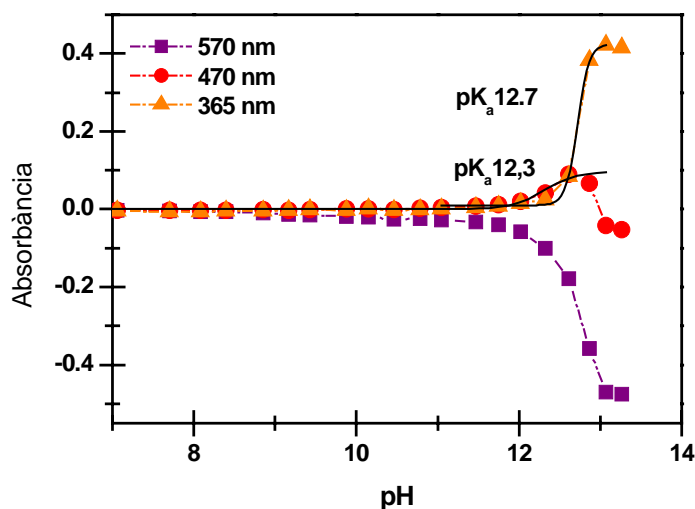


Figura IV.16. Representació del canvi d'absorbància a 563 nm, 465nm i 363nm en funció del pH per la bR silvestre en 150 mM KCl adaptada a la foscor i a temperatura ambient. Cada gràfica està ajustada a una funció sigmoïdal el punt d'inflexió de la qual és el pK_a de desaparició de cada forma.

Un cop formada la bR blanquejada el procés és reversible únicament durant els 30 primers segons; passat aquest temps el procés és totalment irreversible (Druckmann et al., 1982). Encara no està clar si aquesta espècie apareix com a conseqüència de la ruptura de la BS i conseqüent alliberament del retinal, o degut a una desnaturalització de

la proteïna, produint-se una obertura de les hèlixes que permetrien l'entrada de molècules d'aigua, canviant així l'entorn del retinal i per tant el seu espectre d'absorció.

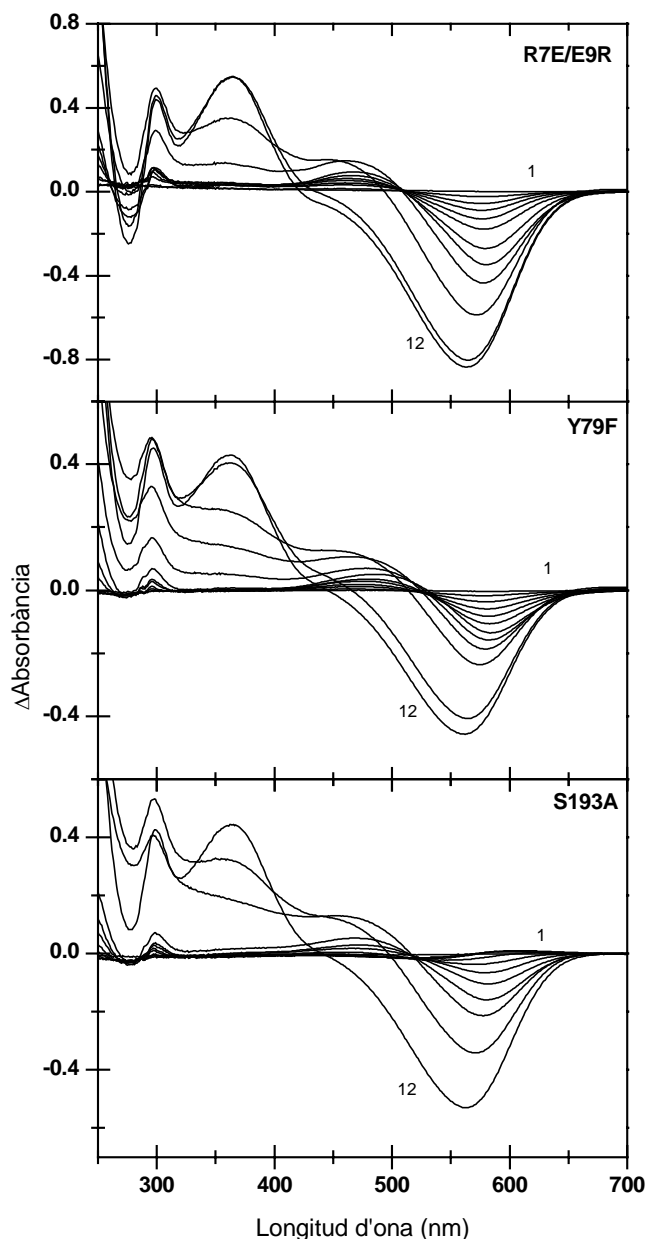


Figura IV.17. Espectres de diferència entre pH_i , indicats a sota, i pH neutre. Els espectres d'absorció es varen obtenir a partir de mostres resuspeses en 150 mM de KCl i adaptades a la foscor dels mutants R7E/E9R, Y79F i S193A. On: R7E/E9R amb pH_i (de l'1 al 12): 6,3; 7,4; 8,5; 9,4; 10,4; 11,0; 11,5; 11,8; 12,3; 12,6; 12,9 i 13,1. Y79F amb pH_i (de l'1 al 12): 6,4; 7,6; 8,7; 9,4; 10,6; 11,3; 12; 12,5; 12,8; 13,0; 13,2 i 13,4. i el mutant S193A amb pH_i (de l'1 al 12): 6,3; 9,2; 9,5; 10,2; 10,9; 11,4; 11,8; 12,0; 12,3; 12,6; 12,9 i 13,1.

A la figura IV.16 es pot apreciar que abans de produir-se una important disminució de bR púrpura a partir de pH 11, s'observa un petit descens en la quantitat

de forma púrpura. Aquest descens és quasi inapreciable sota les nostres condicions de treball, ja que per detectar-lo més clarament s'ha de treballar a valors de concentració per sobre de 40 μM . Aquesta petita disminució de bR púrpura, que s'observa en alcalinitzar el medi, ha sigut descrita per Balashov et al, (1991) com l'aparició de tres transicions. La primera d'elles es correspon amb un petit desplaçament d'1,5 nm del màxim d'absorbància cap al vermell formant-se la denominada forma alcalina amb un pK_a de 9,0 en 150 mM de KCl que es diferent al 6 % de forma vermella formada. Aquesta espècie vindria com a conseqüència de la desprotonació d'una tirosina. La segona petita transició, pK_a 9,5, es correspon amb una transició púrpura-blau degut a l'augment del pK_a de l'Asp 85 des de 2,6 a 7,2 en desprotonar-se el grup alliberador del protó (veure secció I.7.1), i que es troba acoblat a l'aspàrtic 85 (Balashov et al., 1993, 1995, 1996). Abans de començar a aparèixer forma vermella apareix encara una tercera transició constituïda per la desprotonació de dues tirosines quan s'incrementa el pH per sobre de 10. Aquestes tirosines tenen un pK_a de 10,3 i 11,3 en 150 mM KCl (Balashov et al., 1991).

A la figura IV.17 estan representats els espectres de diferència dels mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en incrementar el pH des de pH neutre fins a valors de pH al voltant de 13. A les gràfiques es pot apreciar com en tots tres mutants hi ha un comportament front a l'alcalinització del medi molt similar al obtingut a la bR silvestre. Observant l'evolució de cadascuna de les espècies representades a la figura IV.18 però, s'evidencien certes diferències en el pH d'inici d'aparició de la forma vermella en els mutants R7E/E9R i Y79F. Es pot observar que l'increment de la forma vermella en aquest mutants es produeix al voltant de pH 8, unes tres unitats de pH per sota de la bR silvestre. El fort increment però, de la forma 470 nm es continua donant a pH 11. Aquest fet indicaria que hi haurien petites proporcions de molècules de bR que estarien desprotonant la seva BS. La ruptura dels ponts d'hidrogen establerts per aquest dos grups podria provocar un canvi en l'entorn del retinal que produís una certa disminució en el pK_a de la BS.

Fent el mateix càlcul de formació de bR vermella que es va fer per la bR silvestre a pH 10 s'observa que en el mutant R7E/E9R es forma un 31 % de bR vermella a aquest pH, comparat amb l'1 % obtingut a la bR silvestre. En el mutant Y79F es forma un 24 % de forma vermella, en aquest cas també molt incrementat respecte a la bR silvestre. Així doncs, en aquest dos mutants no solament hi ha una

aparició de forma vermella a valors del pH més petits que a la bR silvestre sinó que a més apareix en una proporció entre 20 i 30 vegades major. En canvi, el mutant S193A no presenta pre-formació de forma vermella.

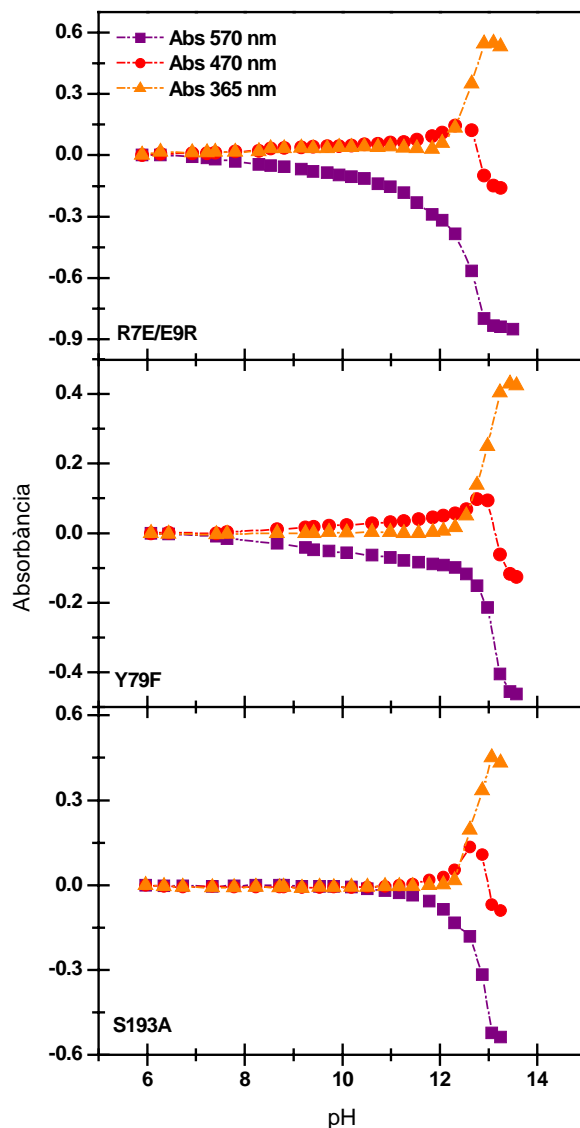


Figura IV.18. Representació del canvi d'absorbància a 570 nm, 470 nm i 365 nm en funció del pH per als mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en 150 mM KCl, temperatura ambient i adaptats a la foscor. Els valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV16.B.

A la taula IV.4 estan representats els valors de pK_a de desnaturalització de la bR silvestre i els diferents mutants extret a partir de les sigmoïdals ajustades a les corbes d'aparició de la forma blanquejada. De la taula se'n pot extreure que aquestes mutacions pràcticament no produeixen canvis en el pK_a de desnaturalització de la proteïna. Això indicaria que l'aparició de bR vermella a valors més petits del pH en aquest dos

mutants, no es tradueix en una desestabilització de la proteïna, suggerint que aquesta forma vermella és molt més estable que la bR vermella formada a pH elevats.

Taula IV.4. Valors de pK_a de desnaturalització alcalina de la bR silvestre i bR mutants adaptats a la foscor en 150 mM KCl i temperatura ambient.

Mostra	pK_a desnaturalització
bR silvestre	$12,8 \pm 0,1$
R7E/E9R	$12,6 \pm 0,1$
Y79F	$13,0 \pm 0,1$
S193A	$12,6 \pm 0,2$

Aquest fet doncs indicaria que la desnaturalització de la bR no solament ve donada per la desprotonació de la BS, sinó que hi ha d'haver altres processos produïts a pH alcalins que no apareixen a pH neutres que ajuden a la desnaturalització. Potser la desprotonació de les tirosines (Balashov et al.,1991) és una condició necessària per que la desprotonació de la BS doni lloc a la desnaturalització de la proteïna.

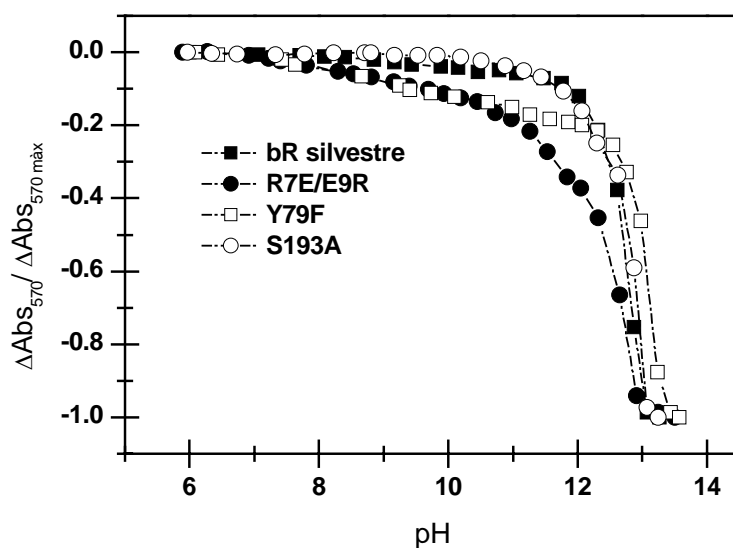


Figura IV.19. Representació dels canvis d'absorbància a 570 nm en funció del pH per la bR silvestre i els mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en 150 mM KCl, adaptats a la foscor i temperatura ambient. Aquests valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV.17. Els valors han estat normalitzats entre 0 i -1.

Cal fer notar també que la representació del canvi d'absorbància a 570 nm en funció del pH (figura IV.19) mostra clarament una igualtat en el pK_a de desnaturalització de les bR mutants, però el que és més interessant és l'apreciació de

que els mutants R7E/E9R i Y79F presenten una major disminució de l'absorbància a 570 nm com a conseqüència de l'aparició precoç de forma vermella, de manera més important en el mutant R7E/E9R.

IV.2.2.4. Reacció de la hidroxilamina amb la Base de Schiff

Quan la bR silvestre s'incuba amb hidroxilamina sota condicions d'il·luminació, aquesta és capaç de penetrar dintre de la proteïna i reaccionar amb la BS hidrolitzant l'enllaç del retinal amb la proteïna obtenint-se el retinal lliure per un costat i la bacterioopsina per l'altra (Oesterhelt et al., 1971; Oesterhelt et al., 1973c). El cromòfor però no s'allibera en forma de retinal sinó en forma de retinal-oxima: retinal unit covalentment a la hidroxilamina (Oesterhelt et al., 1971; Oesterhelt et al., 1974b) que es queda unida a la membrana. Quan aquesta incubació es realitza a les fosques l'accessibilitat de la hidroxilamina és molt petita de manera que el temps de reacció de la hidroxilamina és molt llarg (Oesterhelt et al., 1973c; Subramaniam et al., 1991). En canvi, quan la incubació es duu a terme sota il·luminació, gràcies a l'obertura de les hèlices durant el fotocicle, la hidroxilamina penetra més fàcilment accelerant així, la reacció d'hidròlisi del retinal (Oesterhelt et al., 1973c).

La manera en què la presència de llum afavoreix la reacció de la hidroxilamina és un tema encara controvertit. En un principi es van realitzar diferents estudis que van proposar que la reacció de la hidroxilamina es produïa durant l'intermediari M (Oesterhelt et al., 1974b; Oesterhelt et al. 1974c). Estudis més recents però, postulen que la reacció de la hidroxilamina tindria lloc posteriorment a la isomerització del retinal des de *tot-trans* a *13-cis*, en l'intermediari K (veure secció I.6.2). Ja que aquest intermediari és molt curt seria durant l'intermediari L quan es produiria la reacció ja que estudis sobre mutants amb un intermediari M molt més llarg que la bR silvestre no tenen una reacció amb la hidroxilamina més ràpida (Subramaniam et al., 1991). Estudis recents amb anàlegs de retinal amb capacitat d'isomerització bloquejada no mostren una diferència en la velocitat de reacció de la hidroxilamina, qüestionant-se així que la isomerització sigui necessària per induir la reacció (Rousso et al., 1998).

En un principi es creia que el lloc d'entrada de la hidroxilamina dins de la bR es donava per la part extracel·lular (Subramaniam et al., 1991) degut a que aquesta part és més hidrofílica i és menys compacta que la part citoplasmàtica. No obstant, estudis de microscòpia de força atòmica (AFM) de mostres de bR tractades amb hidroxilamina van

mostrar que l'entrada de la molècula es pot donar pels dos extrems de la proteïna (Möller et al., 2000). En aquests mateixos estudis es va observar que a mesura que s'il·lumina la mostra en presència d'hidroxilamina, els fragments de membrana púrpura es van trencant en fragments cada vegada més petits. Aquest fet mostra que el retinal no tan sols determina la compactació de les hèlices de la bR sinó també la correcta ordenació de la bR en la membrana púrpura.

La bacterioopsina obtinguda mitjançant incubació amb hidroxilamina pot ser regenerada en quasi tota la seva totalitat addicionant retinal en forma *13-cis* o *tot-trans* regenerant-se més lentament amb aquesta última forma. Els isòmers *9-cis* i *11-cis* no són capaços de regenerar la forma púrpura, encara que la forma *11-cis* si que pot fer-ho sota condicions d'il·luminació passant primerament per la forma *tot-trans* (Oesterhelt et al., 1974c).

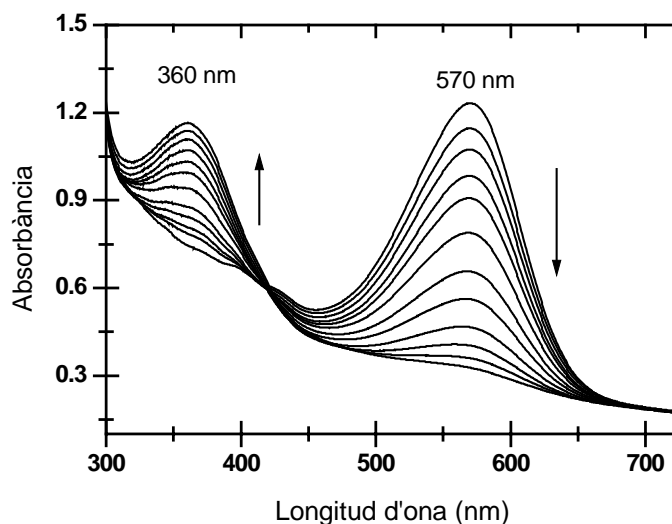


Figura IV.20. Espectres d'absorció de la bR silvestre al llarg del temps incubant en 1 M d'hidroxilamina, 150 mM KCl tampó fosfat, pH 7, 300 lux d'il·luminació i temperatura ambient. Les fletxes indiquen la direcció del canvi.

Els canvis produïts poden ser seguits espectroscòpicament al llarg del temps d'incubació. A la figura IV.20 es presenten els espectres d'absorbància de bR silvestre en 150 mM de fosfat sòdic, 1 M d'hidroxilamina, pH 7,0 en presència de 300 lux de llum blanca i temperatura ambient. La presència de dues úniques bandes indica que es dona una única transició en aquest procés, on la banda corresponent a la membrana púrpura es va transformant en la banda corresponent a retinal lliure en forma de retinal-oxima.

La representació dels canvis d'absorbància a 570 nm en funció del temps dona una gràfica decreixent monoexponencial i l'equació ajustada dona el temps mitjà d'hidròlisi completa del retinal (figura IV.21).

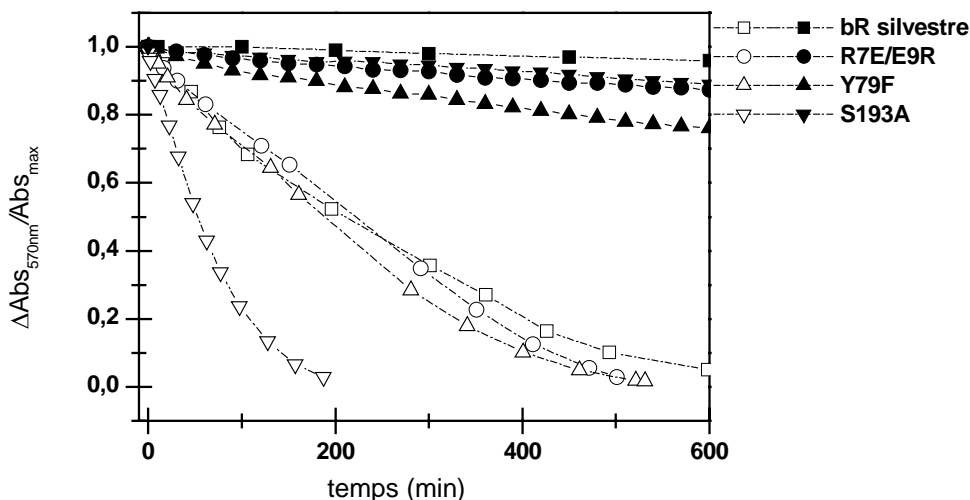


Figura IV.21. Cinètiques de desaparició de la banda a 570 nm en presència de 1 M d'hidroxilamina, 150 mM tampó fosfat, pH 7,0 i temperatura ambient. Els símbols en negre es corresponen a la incubació realitzada sota condicions de foscor i els símbols buits en condicions d'il·luminació a 300 lux. Per a la bR silvestre i els mutants R7E/E9R, Y79F i S193A.

Es varen realitzar experiments d'incubació amb hidroxilamina en absència i presència d'il·luminació amb els diferents mutants per tal de determinar l'accessibilitat de la BS per la hidroxilamina i així deduir indirectament canvis estructurals en la proteïna.

Taula IV.5. Valors de $t_{1/2}$ per la bR silvestre i mutants del procés de reacció amb la hidroxilamina sota condicions d'il·luminació i de foscor. A partir dels ajustos a exponencials de primer ordre s'han obtingut els valors de τ . El valor de $t_{1/2}$ s'obté multiplicant el valor de la τ per $\ln 2$. Amb asterisc estan indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

Mutant	$t_{1/2}$ (min) llum	$t_{1/2}$ (min) foscor
bR silvestre	180 ± 17	10540 ± 600
R7E/E9R	175 ± 11	$3122 \pm 12^*$
Y79F	$148 \pm 10^*$	$1693 \pm 26^*$
S193A	$49 \pm 2^*$	$3583 \pm 101^*$

L'accessibilitat de la hidroxilamina pel retinal en aquests mutants en condicions de foscor es veu força facilitada (figura IV.21). A la taula IV.5 es pot observar que la velocitat de reacció de la hidroxilamina en els mutants R7E/E9R i S193A és més del

doble de ràpid que en la bR silvestre, fet que es veu més incrementat en el cas del mutant Y79F. La ruptura de la interacció per pont d'hidrogen entre les hèlices A-B i A-C en el mutant R7E/E9R (figura IV.9) podria ser el causant d'una menor compactació i/o major inestabilitat d'aquestes hèlices, malgrat que es podria veure contrarestada parcialment per l'establiment de noves interaccions entre les hèlices A-C i A-G. Per altra banda, l'augment d'accessibilitat observat al mutar la tirosina 79 per una fenilalanina es podria deure a la ruptura de la doble interacció per pont d'hidrogen entre la fenilalanina 79 amb l'arginina 7 i el glutàmic 9 (figura IV.10). El mutant S193A en perdre una de les dues interaccions entre els residus 193 i 204 (figura IV.11) debilitaria la interacció entre les hèlices F i G disminuint la compactació de les hèlices i afavorir així la penetració de la hidroxilamina dintre de la proteïna.

Observant les dades obtingudes sota il·luminació, podem veure que la velocitat de reacció de l'hidroxilamina en el mutant S193A és també més elevada que per la bR silvestre, indicant que durant el fotocicle hi ha una major mobilitat de les hèlices. Els altres dos mutants, però, presenten un valor de temps mitjà molt semblant a la bR silvestre.

Estudis de reactivitat de la hidroxilamina en condicions de foscor sobre monòmers de bR mostren que hi ha una important acceleració en la velocitat de reacció de la hidroxilamina comparat amb la bR inclosa en la membrana púrpura (Subramaniam et al., 1991). Aquest fet indicaria que les interaccions establertes entre els monòmers i lípids dels trímers contribuirien a una major compactació de les hèlices. El fet de que aquests tres mutants presentin una major reactivitat per la hidroxilamina a les fosques fa pensar, que els ponts d'hidrogen en els qual participen, no solament podrien ser importants en la compactació de les hèlices si no que també podrien participar en la formació d'interaccions entre els diferents monòmers i/o amb els lípids voltants.

IV.2.2.5. Estabilitat tèrmica de la bR

IV.2.2.5.1. Espectroscòpia UV-Vis

Quan s'incrementa la temperatura d'una mostra de bR es produeixen una sèrie de canvis abans de la seva desnaturalització. A la figura IV.22 es mostren els espectres d'absorbància (A) i diferència (B) d'una mostra de bR silvestre en aigua, pH 7,0 en

funció de la temperatura. Es pot observar que a mesura que es va incrementant la temperatura van apareixent i desapareixent diferents espècies. A la figura IV.23 es representa l'evolució de cadascuna de les espècies en funció de la temperatura. La primera espècie que apareix és l'anomenada forma blava, absorbint a 630 nm, que comença a aparèixer sobre els 50° C. Aquesta espècie es formaria com a conseqüència de l'alliberament de cations en incrementar la temperatura i la subseqüent protonació parcial de l'Asp 85 en incrementar el seu pK_a en la seva forma desionitzada. La següent espècie en aparèixer, vers els 70° C, és la forma absorbint a 450 nm (Brouillette et al., 1987). A 80° C es comença a produir la desnaturalització de la bR en termes d'obertura de les seves hèlices donant lloc a l'espècie absorbent a 385 nm corresponent al retinal hidrolitzat, situat fora del seu entorn proteic normal (Jackson et al., 1978; Broillette et al., 1987). Als 95° C s'hauria produït la màxima desnaturalització de la proteïna amb una T_m de 90° C, donada pel punt d'inflexió de l'ajust sigmoidal de la corba d'aparició de retinal lliure (figura IV.23).

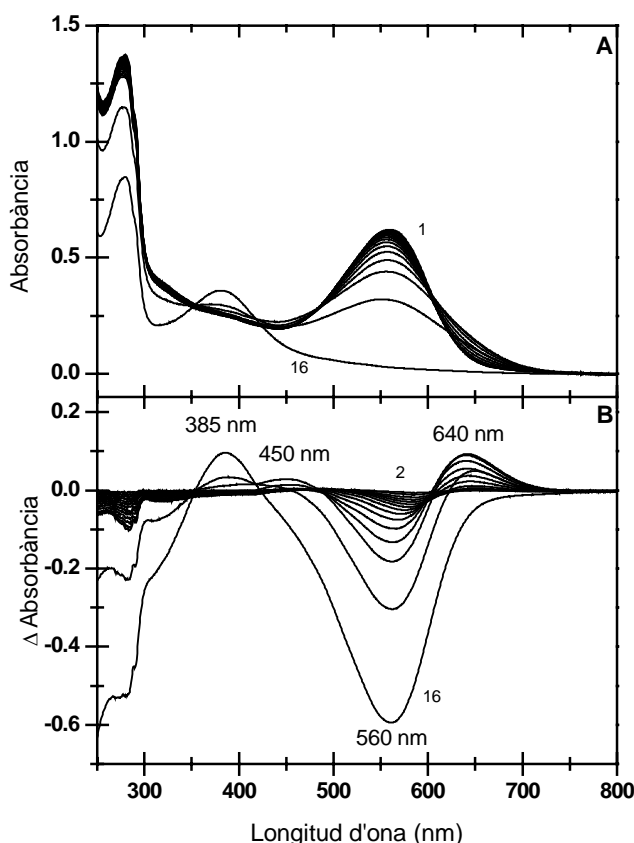


Figura IV.22. (A) Espectres d'absorbància en funció de la temperatura per una mostra de bR silvestre en aigua, pH 7,0 i adaptada a la foscor. De l'1 al 16 espectres creixents de 5 en 5° C des de 20 a 95° C. (B) Espectres de diferència dels espectres de A i l'espectre a 20° C.

L'estudi de l'estabilitat tèrmica de la bR a pH 4,0 (figura IV.23) mostra una aparició de forma blava molt més primerenca que a pH 7,0, on a 20° C la seva aparició ja es troba començada, ja que a pH més baix els cations estarien units més dèbilment a la proteïna. Sota aquestes condicions de pH no s'aprecia cap aparició de forma vermella. La forma de bR desnaturalitzada comença a aparèixer als 60° C amb una T_m de desnaturalització de 68° C, uns 20° per sota que a pH 7,0. Aquest increment en la desestabilització tèrmica de la bR a pH àcid es degut probablement a la protonació de diferents grups i al desplaçament d'alguns cations dels seus llocs d'unió.

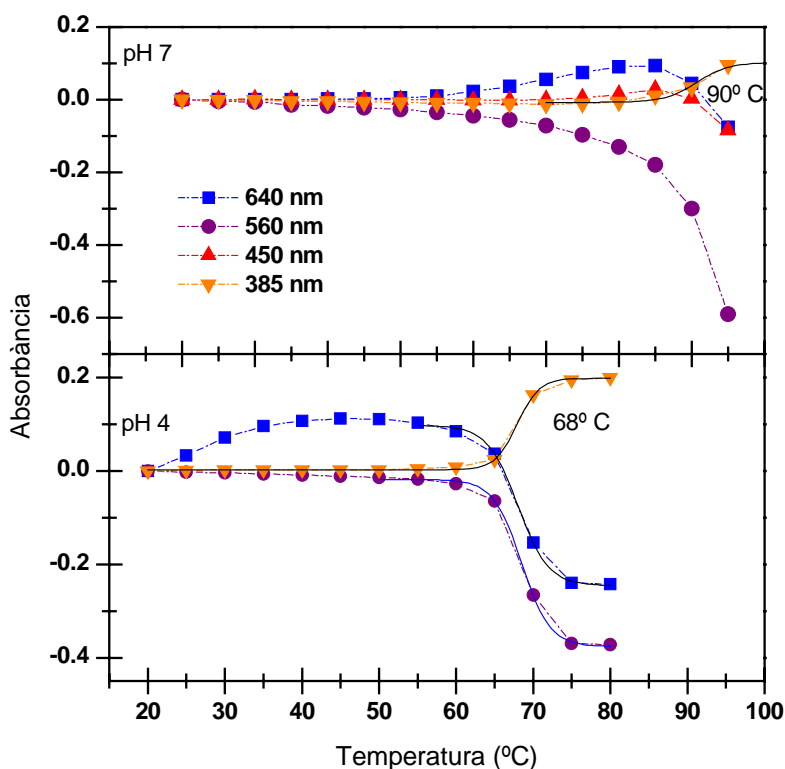


Figura IV.23. Representació dels canvis d'absorbància a les longitud d'ona 640, 560, 450 i 385 nm en funció de la temperatura de la bR silvestre, a pH 7 i 4. La corba de representació de la forma de 385 nm té ajustada una funció sigmoide, el punt d'inflexió de la qual determina la T_m de la desnaturalització.

A la figura IV.24 estan representats els espectres de diferència per als mutants R7E/E9R, Y79F i S193A a pH 7. En tots tres casos es pot veure un increment en la proporció de forma blava comparat amb la bR silvestre (figura IV.22). A més d'aquest fet, els mutants R7E/E9R i Y79F presenten una absència quasi total de forma vermella, que desapareix totalment al mutant S193A.

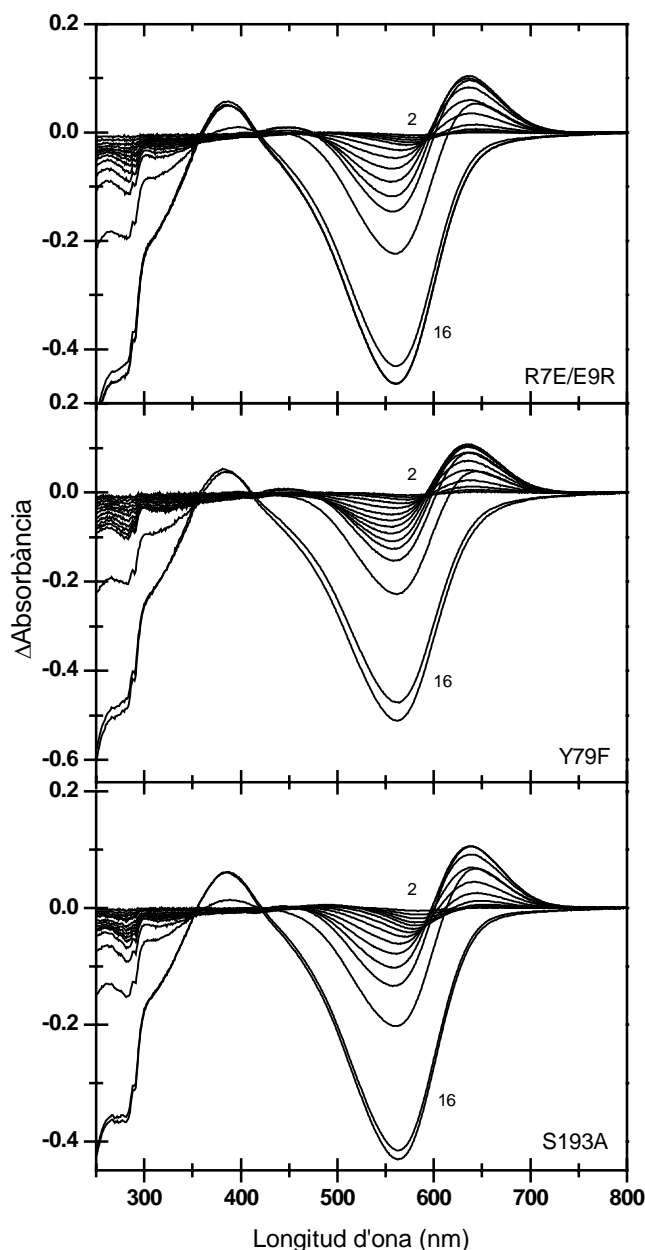


Figura IV.24 Espectres de diferència del mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en funció de la temperatura a pH 7, aigua i adaptats a la foscor. Del 2 al 16 increment de temperatura de 5° C des de 25 a 95°C.

La representació de l'evolució de cadascuna de les espècies en funció de la temperatura (figura IV.25) mostra com a pH 7,0 el mutant R7E/E9R comença a presentar un augment de la forma blava a partir del 40° C. En el cas del mutant Y79F aquest increment es dona als 35° C. Aquest fet indicaria una unió més feble dels cations en aquests dos mutants. A pH 4,0 aquest mutant presenta una total absència de forma blava (figura IV.25 i IV.26). Aquest fet és obvi tenint en compte que el pK_a de l'Asp 85 en aigua d'aquest mutant és 5,0 i per tant a pH 4,0 la bR ja es troba en la forma blava. El

mínim observat a l'espectre de diferència del mutant Y79F de la figura IV.26.B no es troba a 574 nm com a la bR silvestre (figura IV.26.A) sinó a 607 nm. Al mutant a més apareix una nova espècie absorbint a 513 nm, l'origen de la qual és desconegut (figura IV.25 i IV.26.B).

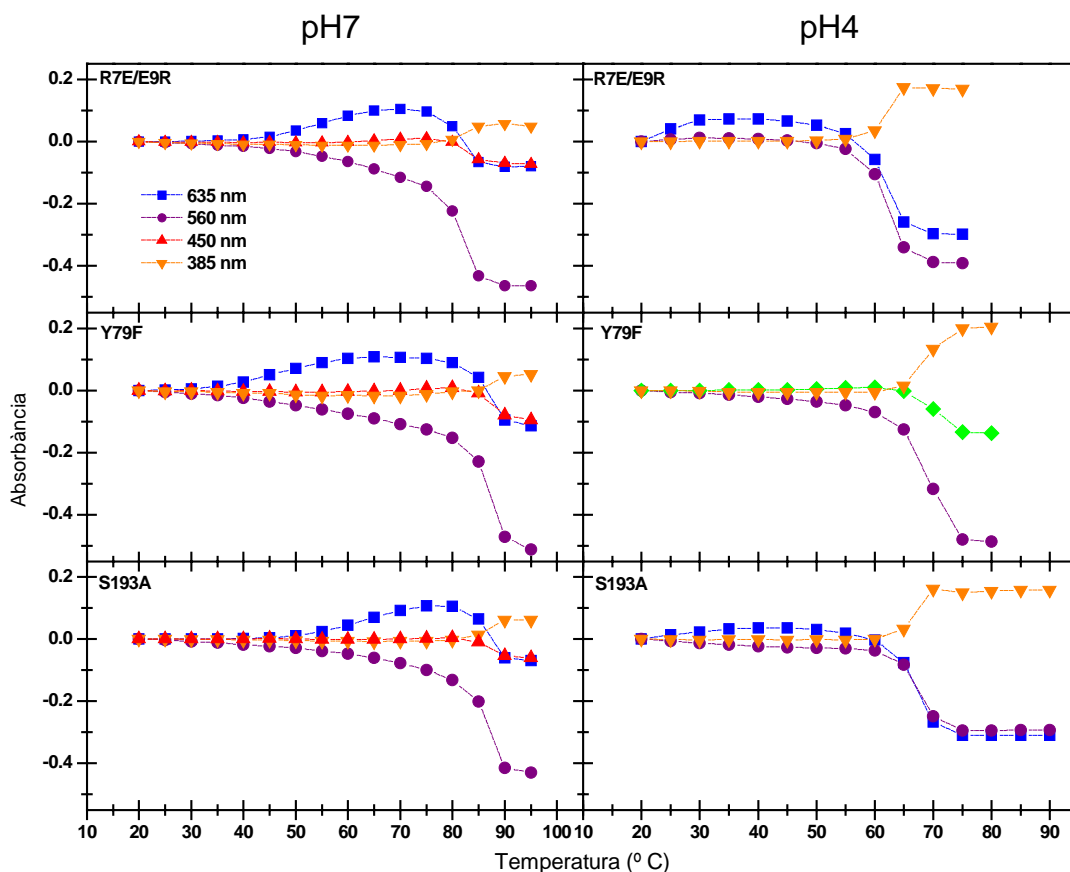


Figura IV.25 Representació dels canvis d'absorbància a les longitud d'ona 635, 560, 450 i 385 nm en funció de la temperatura de les bR mutants R7E/E9R, Y79F i S193A a pH 7 i 4, adaptats a la foscor. En el cas del mutant Y79F, en púrpura el màxim d'absorbància representat és a 605 nm i el rombe en verd es correspon amb els canvis d'absorbància a 513 nm.

Taula IV.6. Valors de T_m de desnaturalització de la bR silvestre i mutants en H_2O a pH 7,0 i 4,0. Amb asterisc estan indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

Mostra	pH7	pH4
bR silvestre	$90,5 \pm 0,2$	$68,1 \pm 0,3$
R7E/E9R	$81,6 \pm 0,7^*$	$61,3 \pm 0,7^*$
Y79F	$87,0 \pm 0,5^*$	$69,4 \pm 0,7$
S193A	$86,0 \pm 0,5^*$	$66,6 \pm 0,8^*$

Els valors de T_m de desnaturalització de la taula IV.6 mostren una lleugera disminució d'aquest valor en tots tres mutants comparat amb la bR silvestre, sent una mica més pronunciat al mutant R7E/E9R. Així doncs, la introducció d'aquestes mutacions produeixen una menor estabilitat tèrmica de la proteïna segurament degut a la menor compactació de les hèlices en produir-se la ruptura dels enllaços per pont d'hidrogen.

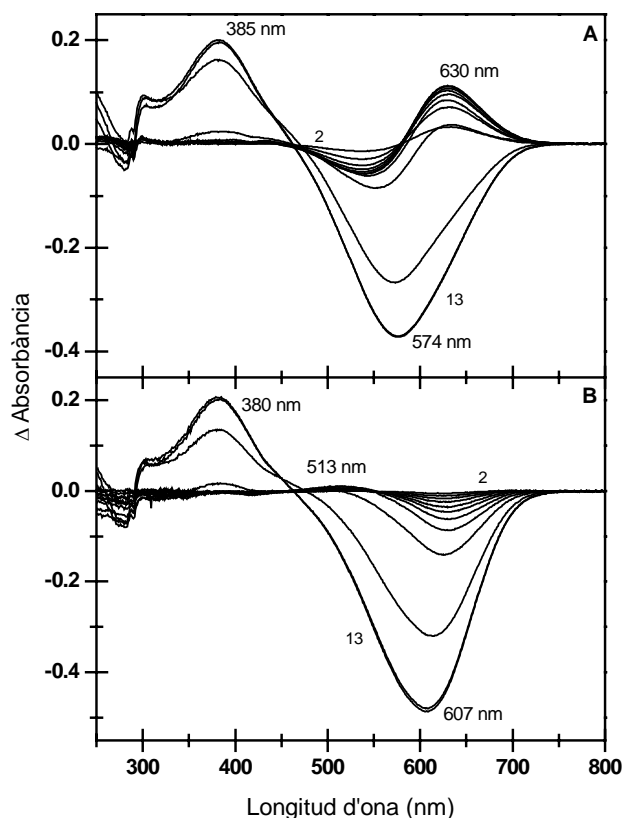


Figura IV.26. Espectres de diferència en funció de la temperatura per la bR silvestre (A) i mutant Y79F (B) en aigua, pH 4,0 i adaptats a la foscor. Del 2 al 13 increment de temperatura de 5° C des de 25 a 80° C.

IV.2.2.5.2. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

Els experiments de DSC permeten visualitzar processos de desnaturalització cooperativa en les proteïnes induïdes per la temperatura que, en el cas de la bR nativa es presenta en forma de dues transicions tèrmiques (figura IV.27). La primera d'elles és l'anomenada pre-transició amb un pic a 82° C i la segona és coneguda com a transició principal que es troba a 99° C, en H₂O pH 6,5 (Jackson et al., 1978; Shen et al., 1993).

La pre-transició és de caràcter reversible i prové de la desorganització de la xarxa hexagonal de la MP (Jackson et al., 1978; Kataoka et al., 1982) tal i com mostren estudis de difracció de raigs X sobre mostres de bR a diferents temperatures (Müller et

al., 2000). L'estructura trimèrica, però, es trobaria intacta (Hiraki et al., 1981). La desestructuració de la MP vindria com a conseqüència de la pèrdua de cations en incrementar la temperatura com ho demostra la total absència de la pre-transició en mostres amb bR desionitzada (Cladera et al., 1988). Quan a la bR desionitzada se l'hi va afegint quantitats creixents de cations, es produeix la reaparició de la pre-transició (Cladera et al., 1988). La regeneració d'aquesta transició s'ha comprovat que és independent del tipus de catió regenerant (Heyes et al., 2002).

La transició principal és irreversible i es deu a la desnaturalització de la bR (Jackson et al., 1978). Estudis de fluorescència i digestió amb papaïna indiquen que la desnaturalització de la bR a aquestes temperatures impliquen una menor compactació de les hèlices, produint-se solament una desnaturalització parcial en forma de descompactació de les hèlices (Brouillette et al., 1978) com a conseqüència del trencament de interaccions inter-helix. Posteriorment, estudis de difracció de raigs X corroboren la parcial desnaturalització de la bR que encara estaria ordenada en forma de trímers encara que no tan perfectes (Müller et al., 2000). Així doncs, la desnaturalització de la bR a aquestes temperatures és parcial (20-30 %), on estan involucrats un 45-65 % de hèlices α i un 13-16 % de girs reversos (Azuaga et al., 1996). La T_m d'aquesta transició també és catió depenent, ja que en la bR desionitzada disminueix aquesta T_m fins a 90° C a pH 6,5 (Cladera et al., 1988; Kresheck et al., 1990).

Les condicions d'hidratació de la mostra afecten de manera important l'estabilitat tèrmica de la bR (Shen et al., 1993), ja que estudis de raigs X sobre films de bR deshidratats mostren una T_m tant de la pre-transició com de la transició principal per sobre de 140° C. Aquest gran increment segurament és degut a que a la bR deshidratada es produeixen més interaccions que estabilitzarien la proteïna.

La T_m de la pre-transició i transició principal són pH depenent, de manera que a valors del pH àcids o alcalins aquestes T_m són més baixes que a pH neutre (Brouillette et al., 1987). La disminució del pH per sota de 1,5 produeix però, un augment de la T_m segurament com a conseqüència de l'aparició de bR púrpura àcida (veure secció I.9.1) (Kresheck et al., 1990).

La Bacterioopsina té solament una transició al voltant dels 80° C a pH 6,5. Quan s'afegeix retinal *tot-trans* a la BO es recupera la transició a 100° C, però no apareix la pre-transició (Maglova et al., 1990; Cladera et al., 1992). L'elevada estabilitat tèrmica de la bR vindria com a conseqüència de dos factors, per una banda per les interaccions

hidrofòbiques entre el retinal i alguns grups, sobre tot aromàtics, i per altra banda per la xarxa de ponts d'hidrogen originada al voltant de la BS. La ruptura de totes aquestes interaccions com a conseqüència de l'increment de la T^a , produiria canvis conformacionals cooperatius observables per DSC (Cladera et al., 1992).

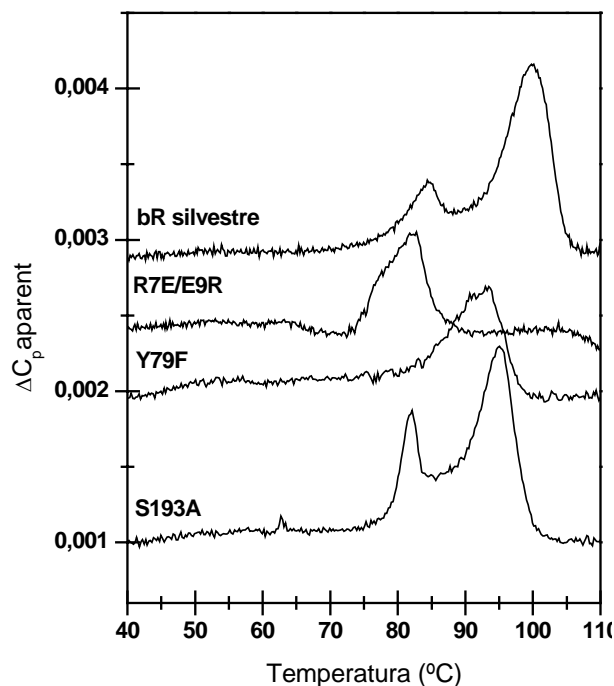


Figura IV.27. Termogrames obtinguts per la bR silvestre i mutants en escalfar les mostres des de la temperatura de 25° C a 110° C i una vegada corregits per a la línia base. La velocitat d'escombrat és de 1,5° K/min. Les mostres es troben dialitzades en front H₂O i a un pH de 6,5.

S'han realitzat desnaturalitzacions tèrmiques per als mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en H₂O a pH neutre (figura IV.27). Els valors de la T_m de les pre-transicions i transicions principals estan indicats a la taula IV.7. La pre-transició per als casos dels mutants R7E/E9R i Y79F, tot i ser quasi inapreciable (figura IV.27), es troba present a tots els escans tèrmics realitzats, per la qual cosa es consideren pre-transicions i no soroll de fons.

Els valors de T_m de desnaturalització però, no coincideixen amb el valor obtingut als experiments d'estabilitat tèrmica de l'apartat IV.2.2.5.1. Aquest fet ve com a conseqüència de que les condicions experimentals tals com la velocitat d'escombrat i el temps d'estada a cada temperatura incubant són diferents en els dos experiments. A més, mitjançant l'espectroscòpia UV-Vis l'únic que podem observar són canvis a nivell de l'entorn del retinal, mentre que mitjançant DSC el que s'obtenen són dades calorimètriques del conjunt de la proteïna.

El doble mutant R7E/E9R és el que presenta una menor estabilitat tèrmica comparat amb la bR silvestre, coincidint amb l'obtingut als experiments d'estabilitat tèrmica seguits per espectroscòpia UV-visible (veure secció IV.2.2.5.1). La disminució de la T_m principal en aquest mutant no es deu solament a una possible disminució en el nombre de cations units, ja que el valor d'aquesta T_m es troba 8° C per sota del valor obtingut per la bR desionitzada. A més aquesta transició és menys cooperativa que a la bR silvestre, explicable per l'absència de les interaccions per pont d'hidrogen entre els grups 7 i 9 amb la tirosina 79 i la metionina 60. Per altra banda, la quasi inexistent pre-transició indicaria una estructura paracristal·lina alterada de la membrana púrpura, fet que recolzaria la hipòtesi d'un menor contingut en cations en aquest mutant.

Taula IV.7. Valors obtinguts per DSC de les T_m de les transicions tèrmiques que tenen lloc a la bR silvestre i mutants en aigua i pH 6,5. Amb asterisc estan indicats els valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

Mostra	T_m pre-transició	T_m transició principal
bR silvestre	82,3 ± 2,6	98,8 ± 1,5
R7E/E9R	52,6 ± 1,3 / 63,2 ± 0,3*	82,4 ± 0,5*
Y79F	50,1 ± 2,4*	91,5 ± 1,5*
S193A	81,1 ± 0,8*	93,4 ± 0,7*

En el cas del mutant Y79F, també es produeix una disminució en les dues T_m (taula IV.7). El fet de que hi hagi una pre-transició menys evident dóna suport al fet de que aquest mutant pugui presentar una menor quantitat de cations units. Així doncs, la menor T_m de la transició principal pot venir donada per aquesta disminució en el contingut de cations. Aquest petit canvi podria venir a més com a conseqüència del pK_a augmentat de l'Asp 85 en aigua en aquest mutant, ja que en haver-hi una major proporció de membrana blava l'estabilitat tèrmica seria menor. La desnaturalització de la bR, com en el cas del mutant R7E/E9R, és menys cooperativa que a la bR silvestre.

El mutant S193A presenta una lleugera disminució en ambdues T_m . Com en el cas del mutant Y79F, la presència d'un pK_a de l'Asp 85 més elevat que a la bR silvestre en aigua podria produir una major inestabilitat tèrmica a pH 6,5 en aquest mutant que a la bR silvestre. Aquesta hipòtesi es trobaria recolzada pel fet de que la cooperativitat no varia en aquest mutant comparat amb la bR silvestre. La evident pre-transició indicaria

que el mutant té una estructura paracristal·lina normal, amb un contingut en cations normal, tot i que el fet de que presenti una major cooperativitat i una lleugera menor T_m que la bR silvestre indicaria.

IV.2.3. ESTUDI FUNCIONAL

IV.2.3.1. Cinètica de l'intermediari M

La tècnica de fotòlisi de llampec ha sigut una eina molt important en la identificació dels diferents intermediaris del fotocicle i en el coneixement del temps de vida mitja de cadascun d'ells. L'intermediari de major facilitat d'estudi per aquesta tècnica és l'intermediari M ja que en posseir un màxim d'absorbància diferenciat de la resta de intermediaris (figura IV.28) es pot estudiar separatament sense risc de solapament.

L'interès de l'estudi d'aquest intermediari és determinar si la introducció de les diferents mutacions produeix una acceleració o enlentiment en la formació i/o desaparició d'aquest intermediari, ja que és durant aquest intermediari quan es produeix la desprotonació (formació de M) i reprotonació de la BS (desaparició de M).

La cinètica d'aparició i desaparició d l'intermediari M es duu a terme doncs enregistrant els canvis d'absorbància a 410 nm (màxim d'absorbància de l'intermediari M) en funció del temps un cop s'ha fet incidir un pols de làser sobre la mostra (veure secció III.8). Les dades presentades a continuació s'han obtingut a partir de mostres de bR silvestres i mutants a una concentració de 15 μM , 1 M KCl, adaptades a la llum, temperatura ambient i a valors de pH 6,5 i 10,0. A la figura IV.28 es presenta la cinètica de l'intermediari M de la bR silvestre a aquests valors de pH on es pot observar que l'aparició i desaparició d'aquest intermediari és pH dependent.

La velocitat d'aparició i desaparició de l'intermediari es calcula mitjançant l'ajust d'exponencials (veure secció III.8). En el cas de la formació de l'M, l'ajust és biexponencial amb dos components: un primer ràpid que es correspon amb la formació d' M_1 i un segon més lent que es correspon amb la formació de l'intermediari M_2 (Váró et al., 1991b) (figura IV.30). Els dos components tenen un comportament diferent respecte al pH del medi ja que com es pot observar pels valors de τ de la taula IV.8, el component més ràpid, de l'ordre de 3 μs és pràcticament independent del pH, mentre que el segon component varia fortament segons el pH del medi, des de 68 μs a pH 6,5 fins a 20 μs a pH 10. L'acceleració d'aquest component podria ser degut a la

desprotonació d'algun grup a elevat pH, possiblement el CAP, i la necessitat de realitzar l'expulsió del protó cap al final del fotocicle (veure secció I.7.2).

La proporció de cadascun dels dos components també varia en funció del pH, sent el component lent (M_2) majoritari a pH neutre i minoritari a pH més bàsics. La proporció de cada component és sinònim de la seva acumulació, la qual cosa depèn dels temps de vida mitja dels intermediaris immediatament anterior i posterior, de manera que l'acumulació d' M_1 depèn de la vida tant d'L com d' M_2 . Així doncs en augmentar el pH del medi i formar-se M_1 més ràpidament que a pH neutre el que es produiria seria una menor acumulació d'L i major acumulació d' M_1 (Zimányi et al., 1992a).

Taula IV.8. Valors de τ de la cinètica d'aparició i desaparició de l'intermediari M en 1 M de KCl i temperatura ambient a pH 6,5 i 10,0 per a la bR silvestre i els mutants. Amb asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre. Entre parèntesis s'indica el percentatge de cadascun dels dos components.

Mostra	Formació M (μ s)		Desaparició M (ms)	
	pH 6,5	pH 10	pH 6,5	pH 10
bR silvestre	$3,6 \pm 0,7$ (10 %)	$2,3 \pm 0,4$ (75 %)	$3,5 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,5$ (54 %)
	68 ± 11 (90 %)	20 ± 3 (25 %)		67 ± 18 (46 %)
R7E/E9R	$9,1 \pm 1,7$ (12 %)*	$0,6 \pm 0,2$ (55 %)*	$2,2 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,2$ (52 %)
	$62 \pm 2,0$ (88 %)	$7,7 \pm 0,5$ (45 %)*		36 ± 6 (48 %)*
Y79F	$5,4 \pm 2,3$ (12 %)	$8,7 \pm 0,5$ (45 %)*	$3,6 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,2$ (52 %)
	95 ± 12 (88 %)*	84 ± 13 (55 %)*		75 ± 13 (48 %)
S193A	$2,5 \pm 1,2$ (15 %)	$2,6 \pm 1,5$ (35 %)	$4,3 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,6$ (56 %)
	$53 \pm 7,5$ (85 %)	$34 \pm 4,3$ (65 %)*		33 ± 4 (44 %)*

La desaparició de l'intermediari M es correspon amb la desaparició del component M_2 i és de caràcter monoexponencial a pH àcids i neutres, però es torna biexponencial a pH bàsics (Taula IV.8). Aquesta biexponencialitat és deguda a la presència de dos components, M^f per al component ràpid, i M^s per al lent. El component lent comença a ser detectable a partir de pH 8,0 (Otto et al., 1989) i la seva τ va disminuint a mesura que es va augmentant el pH del medi (Ohno et al., 1981; Fukuda et al., 1992). L'origen del component lent prové del retorn d'N a M a pH bàsics (Otto et al., 1989; Váró et al., 1990). Aquest fet és degut a que la reacció $N \rightarrow O$ és fortament dependent del pH, de manera que quan més elevat és el pH la desaparició d'N és més

lenta i per tant es va acumulant (Kouyama et al., 1988). Així doncs les formes M^f i M^s són la mateixa espècie però amb diferent origen (Ames et al., 1989).

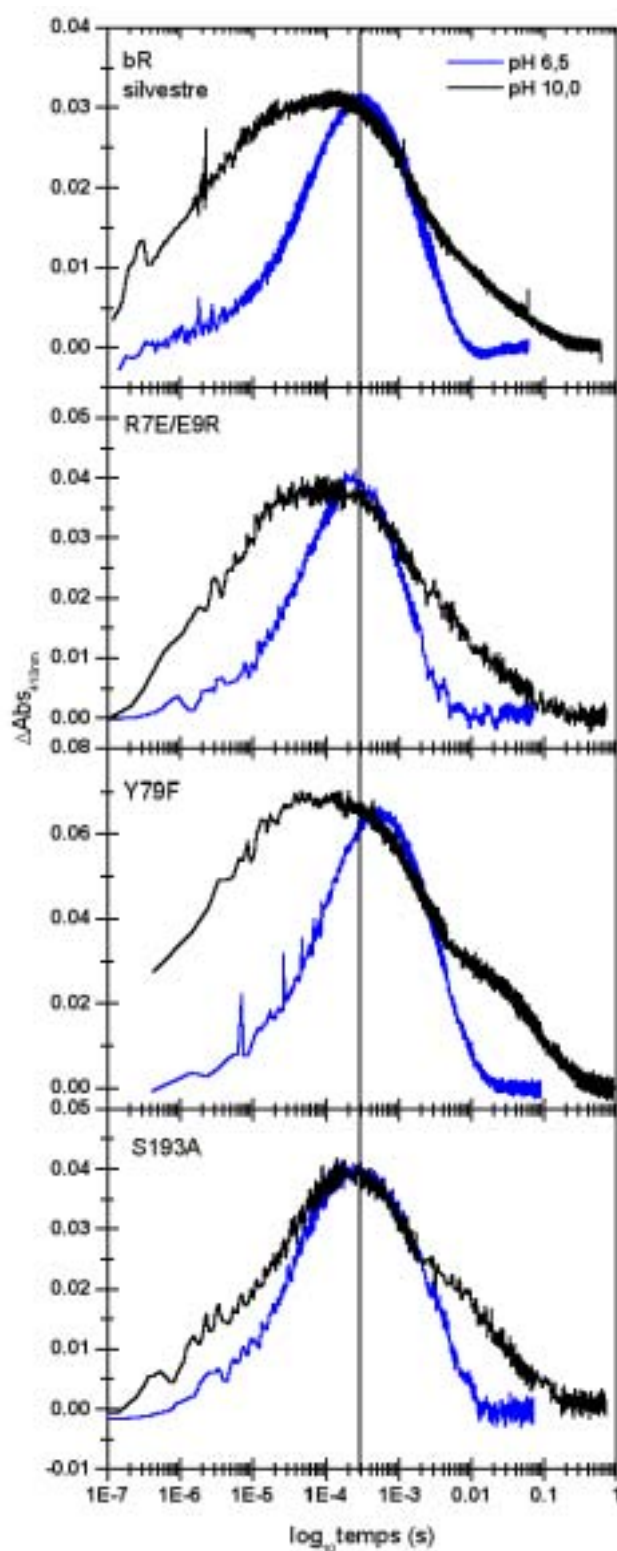


Figura IV.28. Cinètica de l'intermediari M de la bR silvestre i dels mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en 1 M de KCl i temperatura ambient a pH 6,5 i 10,0.

L'observació de les cinètiques de l'intermediari M de la figura IV.28 i els valors de τ de la taula IV.8, mostren que el mutant R7E/E9R presenta una cinètica amb certes propietats lleugerament diferenciades de l'intermediari M obtingut a la bR silvestre. En aquest cas a pH neutre ens trobem amb que el doble mutant presenta un enlentiment i acceleració de la formació d' M_1 a pH neutre i bàsic respectivament. El segon component però, corresponent a M_2 pateix una important acceleració a pH bàsic. La desaparició d'M es veu accelerada en el seu segon component a pH bàsic

El mutant Y79F per altre costat, té un intermediari M on s'observa principalment un enlentiment en l'aparició de d' M_2 a tots dos pH i de l' M_1 només a pH bàsic. Aquest fet indicaria que la reorientació de la BS cap al costat citoplasmàtic i l'obertura de les hèlices a aquesta regió es veu enlentida en realitzar aquesta mutació ja sigui perquè s'inhibeix la mateixa reorientació de la BS o bé perquè s'enlenteix la desprotonació del CAP. El fet de que a pH bàsic augmenti el temps de formació d' M_1 podria ser degut a una disminució del pK_a de l'Asp 85 durant el fotocicle causant per lo tant que aquest grup trigui més temps en prendre el protó des de la BS.

La mutació S193A mostra principalment una cinètica d'M amb una menor dependència al pH del medi tal i com es pot apreciar a la figura IV.28, degut sobretot a una aparició més tardana d' M_2 a pH 10 i a una desaparició més precoç d'M a pH 10 (taula IV.8). Aquest diferent comportament es degut principalment als valors d' M_2 tenint un M_1 pràcticament inalterat.

L'estudi de les proporcions de cadascun dels components mostra que a pH bàsic tots els mutants presenten una proporció alterada de la formació d' M_1 i M_2 . La menor acumulació d' M_1 en aquests mutants comparat amb la bR silvestre a aquest pH indica una vida mitja alterada dels intermediaris immediatament posterior i anterior a l' M_1 . En el cas del mutant R7E/E9R aquesta menor acumulació seria explicada per una més ràpida aparició d' M_2 . En el cas dels mutants Y79F i S193A la formació d' M_2 es veu retardada. Així doncs, la menor acumulació d' M_1 segurament deu ser deguda a una alteració en la cinètica de desaparició d'L. En el cas del mutant S193A l'acumulació d' M_1 és menor que als altres mutants, i és sobretot per aquest motiu que a les cinètiques de la figura IV.28 sembla com si hi hagués una important diferència en el temps d'aparició d' M_1 en aquest mutant comparat amb la bR silvestre.

La desaparició d'M per altre costat mostra una quasi normalitat en tots els mutants amb excepció de la velocitat de desaparició d' M^s per als mutants R7E/E9R i

S193A. En aquests mutants aquesta velocitat es duplica comparat amb la bR silvestre. Aquests resultats indicarien una alteració en l'equilibri $N \rightarrow O$, potser indicant que en aquests mutants la desaparició d'N no s'enlenteix tan importantment a pH bàsics com a la bR silvestre.

La determinació de la intensitat d'absorbància a 410 nm, aparició d'M, per a cadascun d'aquest mutants mostra que els mutants R7E/E9R i Y79F presenten una eficiència de realització del fotocicle del 100 %. Això vol dir que a la mateixa concentració de bR, en il·luminar la mostra, comencen a iniciar el fotocicle el mateix nombre de molècules en aquests mutants que a la bR silvestre. El mutant S193A però, mostra una menor eficiència, on només el 75 % de les molècules de bR inicien el fotocicle.

IV.2.3.2. Bombeig de protons detectat amb piranina

La piranina és una molècula l'absorbància de la qual a 460 nm depèn del seu estat de protonació (veure secció III.8 i figura III.15). Aprofitant aquesta característica és possible detectar canvis en el pH del medi com a conseqüència del bombeig de protons quan la bR està realitzant el fotocicle. Per a aquesta determinació s'ha fet servir la mateixa tècnica de fotòlisi de llampec però en aquest cas detectant canvis d'absorbància a 460 nm al llarg del temps, en una suspensió de bR a una concentració de 15 μM , 1 M KCl, 50 μM de piranina i pH 7,2. Es treballa a aquest valor de pH perquè es correspon amb el pK_a de la piranina a 1 M de KCl (veure secció III.8), de manera que petits canvis en l'estat de protonació del colorant siguin fàcilment detectables.

A la figura IV.29 A es mostren els canvis d'absorbància de la piranina en funció del temps, un cop que s'ha fet incidir el pols de làser sobre la mostra de bR. Es pot observar que a partir dels 20 μs comença a haver-hi una disminució d'absorbància a 460 nm, indicant que el grup hidroxil de la piranina s'està protonant com a conseqüència de la disminució del pH del medi en produir-se la desprotonació del CAP durant M (veure secció I.6.2). L'increment d'absorbància que s'observa a partir de 1,5 ms, per contra, indica que el grup hidroxil del cromòfor es comença a desprotonar com a conseqüència de l'augment del pH del medi en captar un protó la bR durant l'intermediari O (veure secció I.6.2). Aquests fets són doncs una evidència indirecta del bombeig de protons que té lloc a la bR.

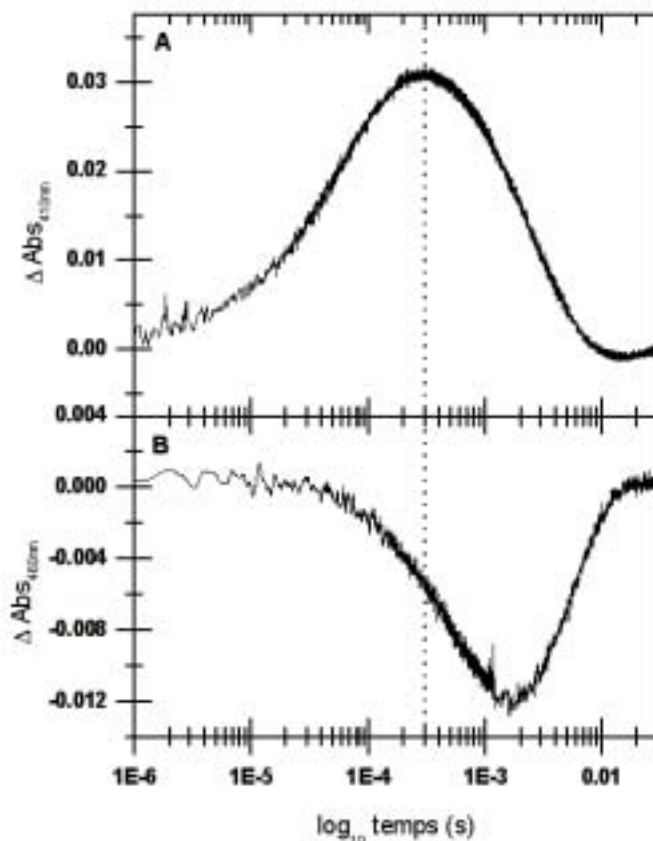


Figura IV.29. (A) Cinètica de l'intermediari M representat en forma d'absorbància a 410 nm en funció del temps. (B) Cinètica del bombeig de protons representat en forma de canvis d'absorbància a 460 nm de la piranina en funció del temps. Ambdues gràfiques corresponen a una mostra de bR silvestre en 1 M KCl, pH 7,2, 50 μ M de piranina i temperatura ambient.

La comparació de l'evolució de l'intermediari M (figura IV.29.A) amb els canvis de pH del medi (figura IV.29.B) mostra com l'expulsió del protó al medi es dona cap a la meitat de la corba d'aparició d'M. La captació del protó per altra banda es dona cap a la meitat de la desaparició de l'intermediari M. Aquesta comparativa però és un artefacte, ja que experiments amb fluoresceïna, cromòfor unit covalentment a la bR, mostren que en realitat l'alliberació del protó al medi es realitza un ordre de magnitud abans que el detectat per la piranina (Heberle et al., 1990; Heberle et al., 1992). Així doncs l'alliberació del protó es realitzaria quan l'intermediari M es comença a formar, i la captació del protó es començaria quan l'intermediari M comença a desaparèixer (als 0,2 ms). Això no vol dir però, que la captació del protó es doni en el pas de l'intermediari M a l'N, ja que en el moment en el que comença a desaparèixer M₁ comença a aparèixer N i després O (figura IV.30). Així doncs hi ha un solapament en el temps de diferents intermediaris, de manera que a 1,5 ms, moment en el que es comença

a captar el protó des del medi, coexisteixen diferents intermediaris, per un costat restes d'M i N que va desapareixent, i intermediari O i BR que es van formant. Així doncs a partir de la figura IV.30 es pot apreciar com al voltant dels 1,5 ms, moment de captació del protó, es produeix un inici en la caiguda de l'intermediari N i formació de l'O. La comparació de la cinètica de bombeig considerant el valor de 0,2 ms en comptes d'1,5 es troba lleugerament desacoblat a la cinètica dels intermediaris representats a la figura IV.30. Aquest fet és esperable tenint en compte que la força iònica emprada en els experiments de la figura IV.30 (100 mM de KCl) és molt menor que els emprats als experiments de piranina (1 M KCl).

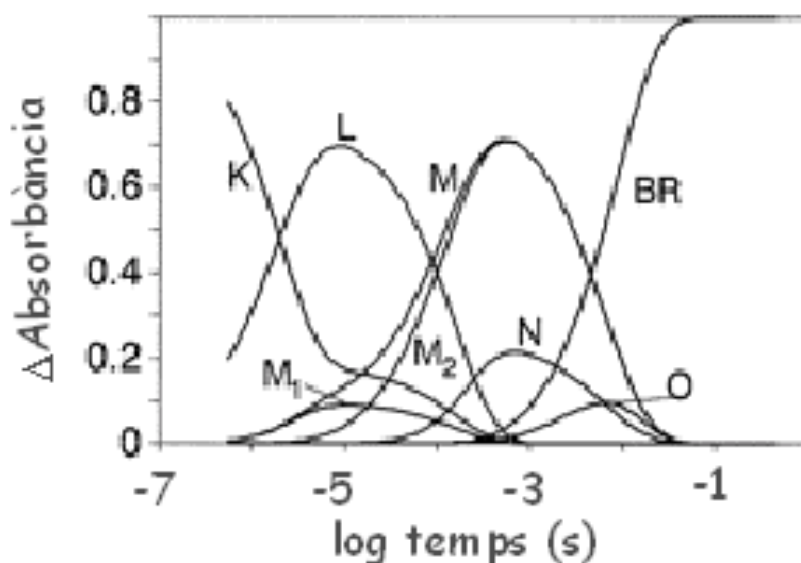


Figura IV.30. Canvis d'absorbància de cadascun dels intermediaris al llarg del temps sobre una mostra de bR a temperatura ambient, pH 7,0 i 100 mM de NaCl. Gràfica adquirida de Ludmann et al (1998).

El senyal donat per la piranina per als diferents mutants (figura IV.31) mostra que la mutació R7E/E9R no produeix cap alteració en la cinètica de bombeig de protons a aquest pH. El mutant Y79F però, presenta un petit retardament en la captació del protó amb un petit desplaçament del pic negatiu des de 1,5 ms a la bR silvestre a 2 ms. La mutació S193A no solament afecta la captació del protó retardant-se fins a 3 ms, sinó que a més l'expulsió del protó es retarda des de al voltant de 20 μ s a uns 100 μ s.

L'estudi de la intensitat donada per la piranina mostra que els mutants R7E/E9R i Y79F presenten una eficiència de bombeig del 90 % i el mutant S193A del 25 %. Aquest darrer mutant doncs, presenta una important alteració en la capacitat bombejadora de protons de la proteïna.

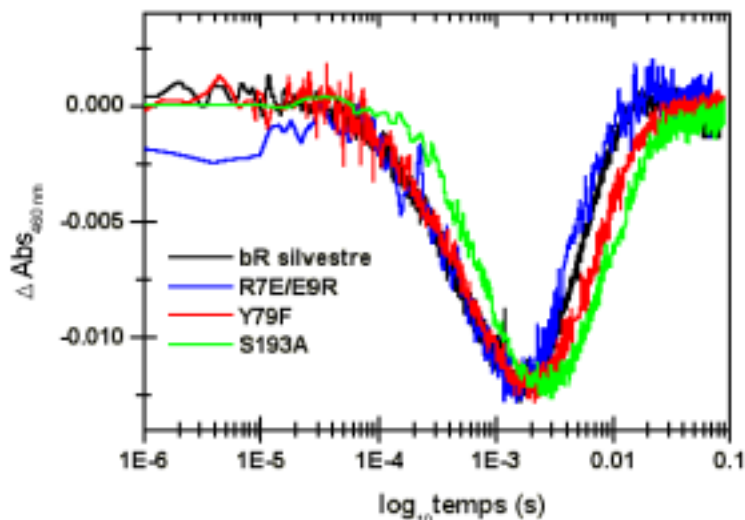


Figura IV.31. Cinètica de bombeig de protons en forma de canvis d'absorbància a 460 nm de la piranina en funció del temps per bR silvestre, R7E/E9R, Y79F i S193A en 1M de KCl, pH 7,2; 50 μ M de piranina i temperatura ambient. Les dades han estat normalitzades per a una mateixa intensitat de senyal.

IV.2.3.3. Fotocorrents

La bR orientada produeix un senyal elèctric quan s'irradia amb un pols de llum làser, degut al moviment de càrregues i bombeig de protons durant el fotocicle. Aquest senyal està compost de tres components anomenats B1, B2 i B3 (figura IV.32).

El component B1, amb un temps de vida menor a 100 ps, és degut al moviment de càrregues en el sentit oposat al del bombeig de protons, es a dir, des del costat extracel·lular al citoplasmàtic, i es correspon a la isomerització des de *tot-trans* a *13-cis* del retinal durant l'intermediari K (veure secció I.6.2). Aquest component és l'anomenat primer component negatiu.

El component B2 dóna un senyal positiu amb un temps de vida d'uns 40 μ s la formació del qual es correspon amb la transició K-L i la seva desaparició amb la transició L-M. El component B2 estaria compost tant pel moviment de càrregues com de l'expulsió del protó al medi. Quan es treballa a forces iòniques per sobre de 40 mM de KCl hi ha una bona correlació entre B2 i la transició L-M (figura IV.32.bis). En condicions de força iònica inferiors es comença a produir un desacoblament a pH àcids i bàsics (Liu., 1990). Des de pH àcid a neutre la caiguda de B2 pot ser ajustada a una monoexponencial, a pH cada vegada més bàsics però, l'ajust comença a esdevenir bi i triexponencial. La dependència de la desaparició de B2 del pH ve com a conseqüència

dels mecanismes d'alliberació del protó, ja que quan el CAP s'inhabilita aquesta dependència desapareix (Misra., 1998).

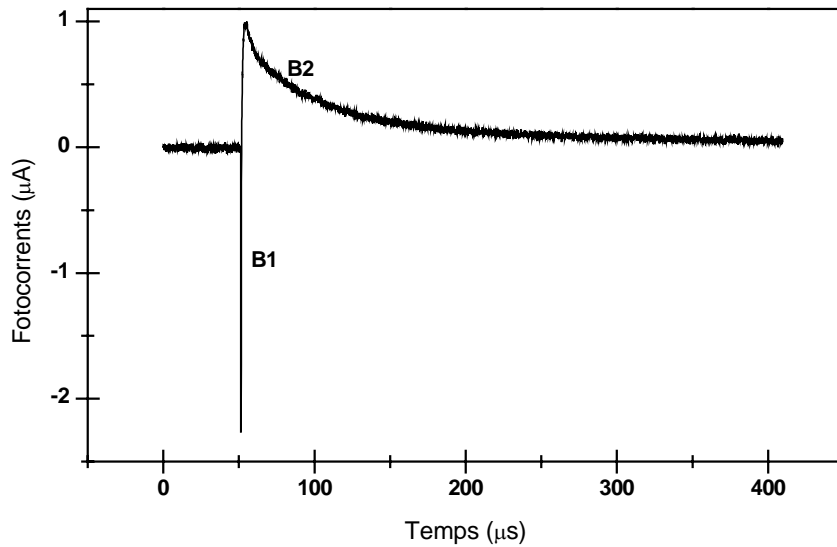


Figura IV.32. Representació del corrent en funció del temps de la bR silvestre orientada en gel de poliacrilamida, a pH 7,0 i 100 mM de KCl. A l'escala presentada solament es poden apreciar els components B1 i B2.

B3 és el segon component positiu i té un temps de l'ordre de milisegons i té una menor amplitud que els altres dos components. Aquest component no s'aprecia als nostres experiments ja que el detector de senyal utilitzat no permetia enregistrar cap senyal més enllà de 500 μ s. El B3 pot ser causat per l'entrada del protó al costat citoplasmàtic de la bR.

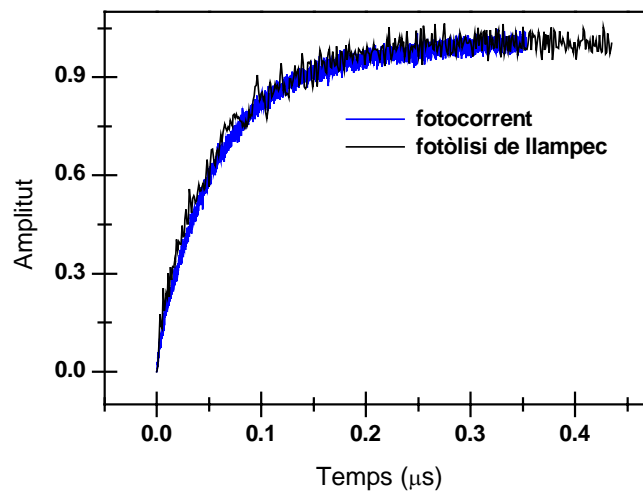


Figura IV.32.bis. Superposició del senyal obtingut per fotòlisi de llampec de l'intermediari M i el component B2 invertit, de fotocorrents de la bR silvestre en 100 mM KCl i pH 6,8. Els dos espectres han estat normalitzats entre 0 i 1.

L'estudi de les corrents generades per la bR a diferents valors del pH (figura IV.33), mostra que totes les corbes de desaparició de B2 obtingudes s'ajusten a una biexponencial. Aquesta biexponencialitat té el seu origen en la participació de dos components diferents, que a pH neutre consisteixen en un més ràpid i minoritari de l'ordre de 7 μ s i altre més lent i majoritari de 70 μ s. A mesura que es va incrementant el pH del medi el component lent va disminuint la seva amplitud de manera que el component més ràpid va sent més majoritari. A pH per sobre de 8,5 desapareix quasi completament el component lent obtenint-se dos component ràpids de (a pH 10,5) 0,4 i 4 μ s sent el primer component majoritari.

Les condicions de força iònica sota les que es realitzen aquests experiments són menors que els utilitzats comunment al nostre laboratori (150 mM i 1M KCl). Això es degut a que concentracions salines més enllà de 100 mM de KCl interfereixen en el senyal elèctric. En les condicions de salinitat emprades hi ha una relativa independència del component B2 en funció del pH entre pH 5 i 8, però a valors inferiors o superiors es produeix una disminució important en el temps de vida mitja del component B2. La representació de la constant de caiguda de B2 forçada a un ajust monoexponencial per tal de determinar la τ del component majoritari, dóna lloc a una corba sigmoïdal (figura IV.34), el punt d'inflexió del qual proporciona el pK_a de la transició des d'una caiguda de B2 lenta a ràpida.

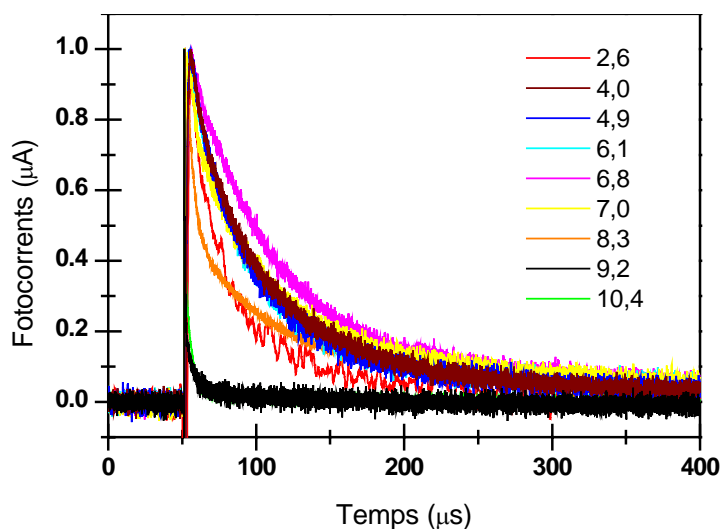


Figura IV.33. Representació del fotocorrent en funció del temps del component B2 de la bR silvestre a diferents pH en 100 mM KCl.

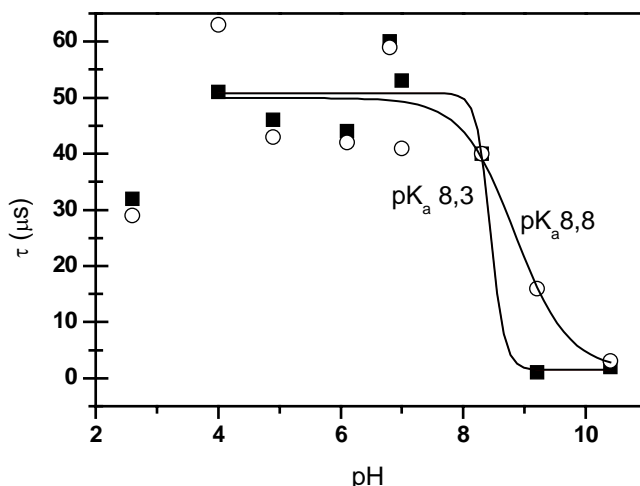


Figura IV.34. Representació de la constant de caiguda del component B2, quadrat negre, i la formació de l'intermediari M, rodona buida, en funció del pH per la bR silvestre en 100 mM de KCl.

L'acceleració en la caiguda de B2 produïda a pH per sobre de 8,5 podria ser deguda a l'aparició d'un fotocicle alternatiu a pH elevat, ja que en inhabilitar-se el CAP l'alliberació del protó o bé s'ha de portar a terme des d'un altre grup i segurament cap al final del fotocicle o bé s'inhabilita la capacitat de bombejar protons de la proteïna. Aquest fet doncs produiria una acceleració en la desaparició de B2 per formar B3. Així doncs aquest pK_a , 8,3, es correspondria amb el pK_a del CAP a l'estat basal en aquestes condicions de força iònica (veure més endavant a la secció IV.4.3.3 i V).

A pH per sota de 5 s'observa que també hi ha una disminució del temps de caiguda del component B2. Aquest fet ve acompanyat d'una menor amplitud del senyal, que seria conseqüència de la impossibilitat de desprotonació del CAP a aquest pH ja que el seu pK_a és 5,8. Així doncs a pH per sota del seu pK_a el CAP no pot alliberar el protó al medi extracel·lular i es queda permanentment protonat de manera que l'expulsió del protó s'ha de realitzar des d'un altre grup diferent del CAP (veure secció I.7.2). Com que l'alliberació del protó a pH àcids no es donaria durant M és lògic que la vida mitja d'aquest intermediari, i conseqüentment de B2, sigui menor que a pH neutre.

La comparació de les constants de formació de l'intermediari M i caiguda de B2 de la figura IV.34 mostra com coincideixen considerablement, amb una diferència entre els pK_a de 0,5 unitats de pH, desplaçament que es pot considerar com error experimental, amb probable excepció del mutant Y79F, on hi ha una diferència de quasi una unitat de pH.

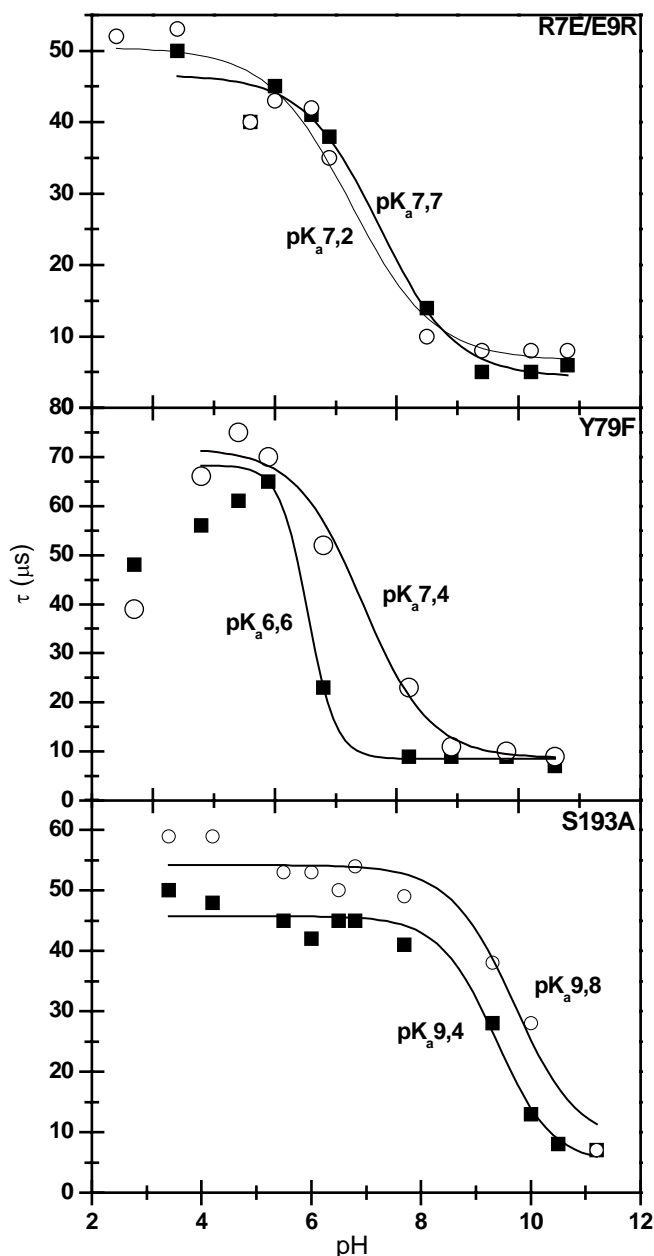


Figura IV.35. Representació de la constant de caiguda del component B2, quadre negre, i de la formació de M, cercle buit, en funció del pH per les bR mutants R7E/E9R, Y79F i S193A en 100 mM de KCl.

El pK_a del CAP en aquestes mateixes condicions per als diferents mutants (figura IV.35) mostra que tant en el mutant R7E/E9R com en el mutant Y79F es produeix una certa disminució en el pK_a del CAP. Això indicaria que l'alteració de la xarxa de ponts d'hidrogen d'aquests mutants canvia l'entorn del CAP modificant lleugerament el seu pK_a . En el cas del mutant S193A l'efecte és contrari, augmentant aquest pK_a en 1,1 unitats comparat amb la bR silvestre, de manera que aquesta mutació també modificaria l'entorn del CAP però en aquest cas generant un entorn segurament més hidrofòbic.

En el cas dels mutants R7E/E9R i S193A a més s'observa que la corba sigmoïdal és més ampla comparat amb la bR silvestre, i també es pot apreciar que no hi ha un efecte d'augment de la velocitat de desaparició del component B2 a pH àcid. Aquest fet podria indicar la presència d'un pK_a menor del CAP durant M en aquest mutants comparat amb la bR silvestre.

IV.2.3.4. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)

La radiació d'infraroig té la capacitat d'excitar diferents grups d'enllaços dependent de la seva longitud d'ona (veure secció III.10). A la regió compresa entre 1700 i 1800 cm^{-1} s'obtenen les bandes corresponents a la vibració de tensió de l'enllaç C=O corresponents als grups carboxílics, tant dels aspàrtics com dels glutàmics. A la regió 1500-1700 cm^{-1} (amida I i amida II), apareixen les bandes corresponents a les freqüències dels enllaços peptídics donant doncs informació sobre l'estructura secundària de la proteïna. En aquestes regions es pot obtenir informació de diverses estructures secundàries com són les hèlices α , làmines β , girs reversos i estructures no ordenades. En la regió compresa entre 1580 i 850 cm^{-1} s'obté informació sobre el cromòfor, i també sobre alguns residus de proteïna (Terpugov et al., 2001).

En aquest treball, utilitzem els espectres de diferència estàtics, és a dir, la diferència entre espectres de la mostra il·luminada i sense il·luminar. D'aquesta manera, podrem determinar canvis en les bandes d'infraroig corresponents a la bR en un dels intermediaris del fotocicle, respecte a la bR en el seu estat basal (BR). El sistema d'obtenció d'espectres consisteix en la il·luminació continua d'un film de mostra de bR a un pH, humitat i temperatura determinats. Dependent del valor d'aquestes tres variables, en il·luminar la mostra l'intermediari atrapat és diferent ja que dependent de les condicions s'allarga la vida mitja d'un o altre intermediari. Amb aquest sistema només podem atrapar normalment els intermediaris N i M, encara que en alguns mutants es poden trobar barreges d'altres intermediaris com a resultat de l'alteració del seu fotocicle.

D'acord amb aquest procediment, un cop obtinguts els espectres de diferència, l'aparició de bandes positives a la zona 1700-1800 cm^{-1} , per exemple, és conseqüència de la protonació de grups carboxílics que es trobaven desprotonats a l'estat basal, i per contra, l'aparició de bandes negatives a aquesta mateixa regió es deu a la desprotonació de grups carboxílics que a l'estat basal es trobaven protonats. Són moltes les bandes de

diferència obtingudes en tot el rang d'infraroig. La determinació dels grups involucrats en cadascuna d'aquestes bandes ha sigut una feina facilitada per l'obtenció de bR mutants. Per exemple, la comparació dels espectres d'infraroig del mutant D85N i la bR silvestre va permetre assignar la banda positiva a 1762 cm^{-1} obtinguda en l'espectre de diferència de l'intermediari M de la bR silvestre a la protonació de l'aspàrtic 85 (Braiman et al., 1988).

Taula IV.9. Bandes característiques dels espectres de diferència de l'intermediari M i N en la bR silvestre (Braiman et al., 1988; Rotschild., 1992). Els símbols (+) i (-) indiquen el signe de la banda (positiu o negatiu respectivament).

Zona de l'espectre	Parts que absorbeixen	M	N	Bandes principals	Assignació de les bandes
1800-1700 cm^{-1}	Grups COOH de les cadenes laterals dels grups carboxílics	(+)	(+)	1762 cm^{-1}	Asp 85 protonat, entorn M
			(-)	1755 cm^{-1}	Asp 85 protonat, entorn N
		(-)		1742 cm^{-1}	Asp 96 desprotonat
		(+)	(+)	1742 cm^{-1}	Asp 96 pertorbat
		(+)		1738 cm^{-1}	Asp 115 pertorbat
		(-)	(-)	1736 cm^{-1}	Asp 96 pertorbat
				1734 cm^{-1}	Asp 115 pertorbat
1700-1600 cm^{-1}	Amida I	(-)	(-)	1692 cm^{-1}	Canvis en girs reversos
			(-)	1670 cm^{-1}	Canvis en les hèlices
		(-)		1657 cm^{-1}	Canvis en les hèlices
			(+)	1650 cm^{-1}	Canvis en les hèlices
1600-1500 cm^{-1}	Amida II	(+)	(+)	1564 cm^{-1}	C=C del cromòfor
			(+)	1555 cm^{-1}	N-H de la proteïna i C=C del cromòfor
		(-)	(-)	1535 cm^{-1}	Vibració C=C del cromòfor
				1527 cm^{-1}	Vibració C=C dels cromòfor
1500-1000 cm^{-1}	Altres grups de la proteïna Retinal	(+)	(+)	1402 cm^{-1}	Grups COO ⁻
			(+)	1393 cm^{-1}	Vibració C ₁₅ -H cromòfor.
		(+)		1302 cm^{-1}	Vibració cromòfor.
		(-)	(-)	1201 cm^{-1}	Vibració C ₁₄ -C ₁₅ de <i>tot-trans</i>
			(+)	1186 cm^{-1}	Pic per sota línia base: retinal <i>13-cis</i> + BS desprotonada. Pic per sobre de línia base: retinal <i>13-cis</i> + BS protonada.

L'assignació de les bandes d'aminoàcids, així doncs, s'ha establert mitjançant marcatge i mutagènesi dirigida (Rotschild., 1992). Encara avui, però, hi ha moltes bandes per determinar ja que el fet de que es solapin entre elles i de que el retinal i els lípids interfereixin en les bandes de la proteïna dificulta l'assignació de bandes. A més, mutacions en un aminoàcid poden donar lloc a canvis estructurals que afectin a altres grups de la proteïna, afectant doncs altres bandes. Per discriminar les bandes degudes a la proteïna i al retinal s'han comparat els espectres d'infraroig amb espectres de Raman on només és visible el retinal; a més també va ser possible determinar les bandes del retinal marcant-lo isotòpicament (Smith et al., 1985).

La interpretació de les diferents bandes a més es veu dificultada pel fet de que als espectres d'infraroig no s'obtenen solament bandes positives i negatives degudes a canvis de protonació, sinó que també es poden produir canvis en l'entorn dels grups o canvis estructurals, produint un desplaçament en la seva banda d'absorbància, traduint-se en un màxim i un mínim en l'espectre de diferència.

Les bandes més importants, característiques dels intermediaris N i M de la bR silvestre que han sigut assignades fins el moment es troben indicades a la taula IV.9.

IV.2.3.4.1. Espectres de diferència de l'intermediari M

A pH 10, -30°C i il·luminació constant, és possible aïllar l'intermediari M del fotocicle de la bR silvestre (figura IV.36). El nivell d'humitat del film afecta el fotocicle, acumulant-se en aquestes condicions certa proporció de N quan més humit és el film (veure secció IV.10). És per això que per obtenir un intermediari M pur és necessari treballar en condicions d'humitat mínimes (veure secció III.10.b).

Les bandes clau que indiquen que l'intermediari atrapat a la figura IV.36 és l'M són: la banda positiva 1762 cm^{-1} que prové de la protonació de l'Asp 85 en desprotonar-se la BS (Braiman et al., 1988); el pic de 1186 cm^{-1} indica l'aparició de la forma *13-cis* del retinal (Fodor et al., 1988) i en trobar-se per sota de la línia base indica que la BS es troba desprotonada; els pics positiu i negatiu de a 1738 cm^{-1} i 1732 cm^{-1} són pics compostos provinents de la superposició de dos parells de bandes, de la banda positiva i negativa a 1736 i 1742 cm^{-1} respectivament provinent del canvi d'entorn de l'aspàrtic 96 i el parell de bandes positiva i negativa 1742 i 1734 cm^{-1} respectivament provinent del canvi d'entorn de l'Asp 115 (Braiman et al., 1988; Pfefferlé et al., 1991; Sasaki et

al., 1994); els pics negatius a 1527 i 1200 cm^{-1} indiquen la desaparició de la forma *tot-trans* del retinal (Smith et al., 1987; Gerwert et al., 1990).

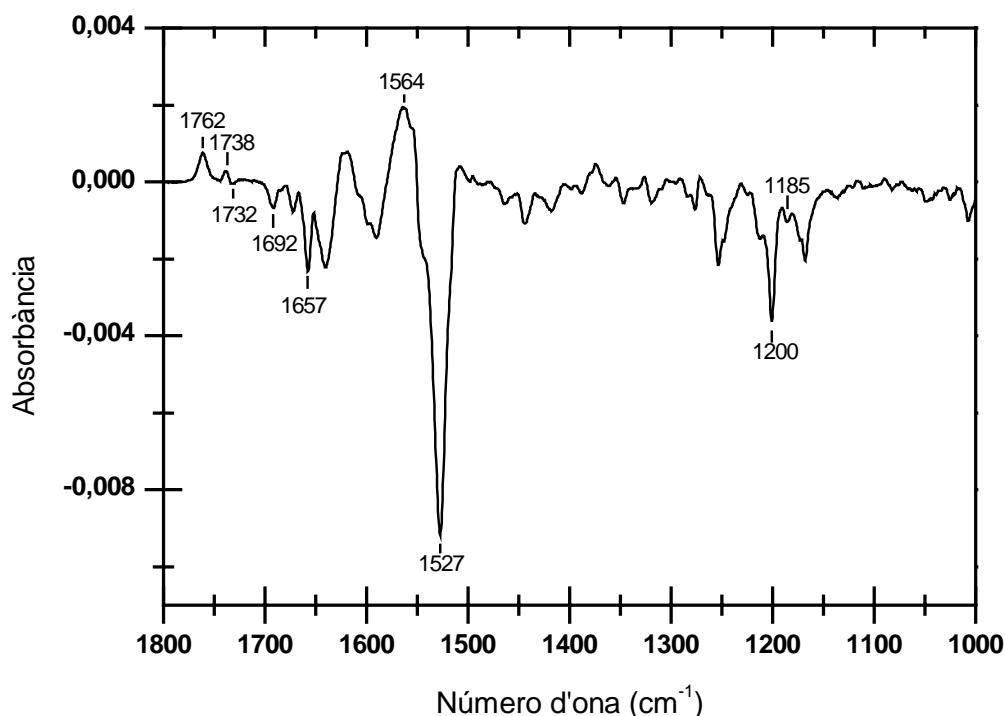


Figura IV.36 Espectre de diferència de la bR silvestre obtingut a partir de film sec de MP a pH 10, 150 mM KCl i -30°C . L'intermediari atrapat és l'M.

La comparació del intermediaris M dels diferents mutants, atrapats sota aquestes mateixes condicions (figura IV.37) mostra petites diferències comparat amb la bR silvestre. En el mutant R7E/E9R es poden apreciar algunes diferències en les bandes de l'amida I, indicant canvis estructurals una mica diferents de les hèlices α en aquest intermediari. En aquest mutant a més es pot apreciar un senyal més important de la banda corresponent a la protonació de l'Asp 85.

Taula IV.10. Intermediari atrapat a la bR silvestre i diferents mutants en 1 M de KCl, pH 10,0 en diferents condicions de temperatura i humitat.

Mostra	4° C		-30° C	
	Humit	Sec	Humit	Sec
bR silvestre	N	M	MN	M
R7E/E9R	N	N	MN	M
Y79F	N	M	MN	M
S193A	N	N	LM	LM

Al mutant S193A, contràriament amb el que passa al mutant R7E/E9R, es produeix una protonació menor de l'Asp 85 com s'observa per la reduïda banda a 1762 cm^{-1} , i la banda 1186 cm^{-1} lleugerament per sobre de la línia base. Sembla ser que l'intermediari atrapat sota aquestes condicions no és purament M sinó que hi ha una certa barreja amb L (taula IV.10). Aquest fet podria indicar un retardament en l'aparició d'M, i per tant de la desprotonació de la BS en aquest mutant sota aquestes condicions.

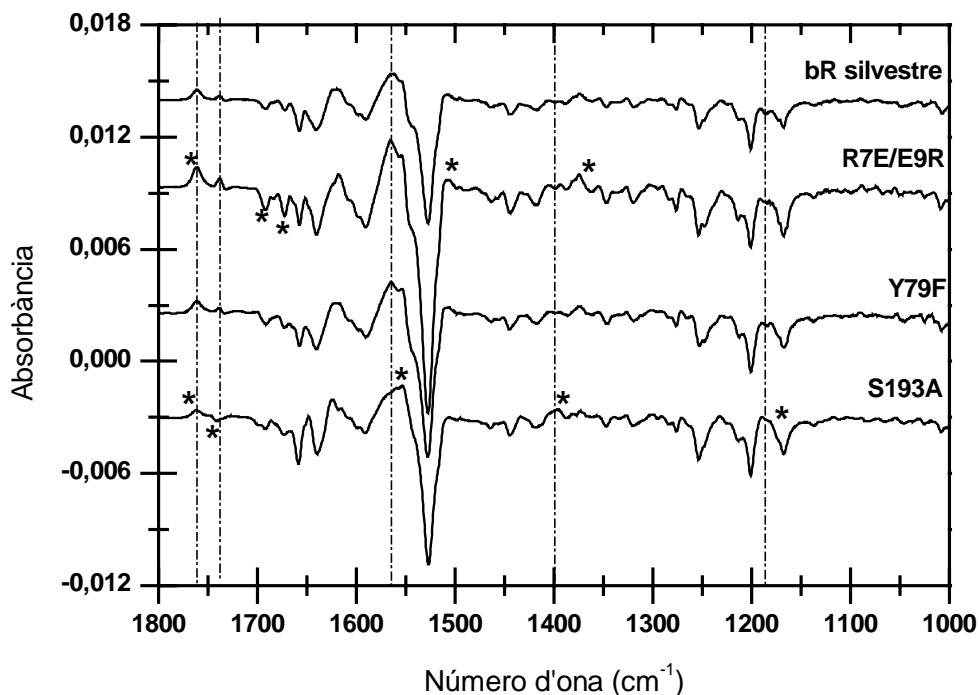


Figura IV.37. Espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants R7E/E9R, Y79F i S193A obtinguts a partir de film sec de MP a pH 10,0; 150 mM KCl i -30°C . L'intermediari atrapat és l'M. * canvis per a tenir en consideració. Els espectres es troben normalitzats a les intensitats de les bandes a 1201 i 1233 cm^{-1} .

IV.2.3.4.2. Espectres de diferència de l'intermediari N

Quan es treballa sobre films de bR silvestre a pH 10, i 4°C , el resultat obtingut depèn fortament de la humitat de la mostra. Quan el film es troba hidratat, l'intermediari que s'aconsegueix atrapar és l'N (figura IV.38). Si el film pel contrari es troba sec l'intermediari que s'acumula és l'M (taula IV.10), que acumulat sota aquestes condicions mostra un espectre de diferència bastant similar a l'obtingut a -30°C (figura IV.37).

Les bandes característiques de l'intermediari N són: la banda positiva a 1754 cm^{-1} provinent de l'Asp 85 protonat, diferent a l'obtingut en l'intermediari M (1762 cm^{-1}) degut a que en N hi ha un canvi en l'entorn de l'Asp 85 tornant-se més hidrofílic

(Braiman et al., 1996); la banda negativa a 1742 cm^{-1} procedent de la desprotonació de l'Asp 96 i acompanyat del pic positiu a 1402 cm^{-1} ; el pic positiu a 1649 cm^{-1} provinent dels canvis estructurals que es produeixen en les hèlices durant l'intermediari N; el pic a 1555 cm^{-1} degut a canvis en el cromòfor i estructura de la proteïna (Braiman et al., 1991; Pfefferlé et al., 1991; Ormos et al., 1992). i per últim el fet de que el pic de 1186 cm^{-1} es trobi per sobre de la línia base indicant que la BS es troba protonada.

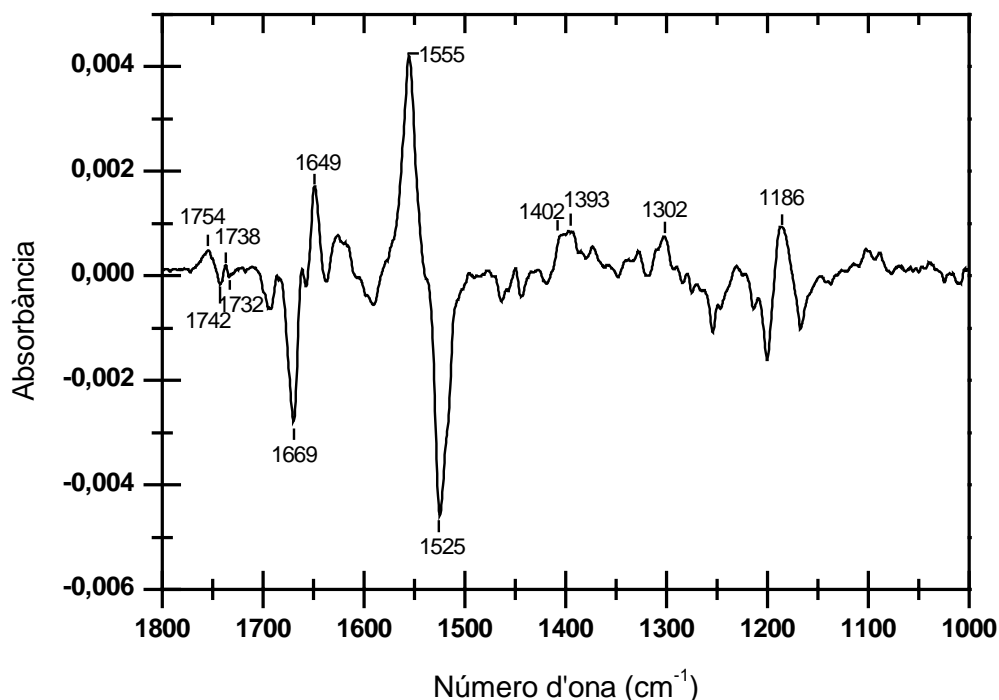


Figura IV.38. Espectre de diferència de la bR silvestre obtingut a partir de film humit de MP a pH 10, 150 mM KCl i 4°C . L'intermediari atrapat és l'N.

L'intermediari N dels mutants representats a la figura IV.39 són molt similars a l'obtingut per la bR silvestre sota les mateixes condicions excepte per els petits canvis indicats mitjançant asteriscs. En el cas del mutant R7E/E9R, a l'igual que en l'intermediari M, es produeixen canvis estructurals diferenciats en les hèlices α , a més de que es continua observant una major intensitat de certes bandes com la corresponent a la protonació de l'Asp 85.

Els mutants Y79F i S193A per altra banda també presenten petits canvis en l'amida I com el fet de que al mutant S193A el petit pic a 1660 cm^{-1} es trobi per sota de la línia base en comptes de trobar-se a la mateixa alçada. El pic a 1400 cm^{-1} marcat amb un asterisc al mutant S193A, és el que en la taula està indicat com a un doble pic compost per les bandes 1402 i 1393 cm^{-1} . El primer d'ells es correspon amb l'aparició

de la vibració CO_2^- provinent de la desprotonació de l'aspàrtic 96 durant aquest intermediari. El segon pic es correspon amb la vibració de l'enllaç $\text{C}_{15}\text{-H}$ del retinal el qual s'incrementa durant l'intermediari N (Maeda et al., 1992). Observant aquest pic compost del mutant Y79F a la figura IV.39 es pot apreciar que la intensitat del pic a 1402 cm^{-1} és menor que la de 1393 cm^{-1} . Aquest fet sembla que no ve donat per una menor intensitat de la banda 1402 si no més aviat per una major intensitat de la banda a 1393 cm^{-1} .

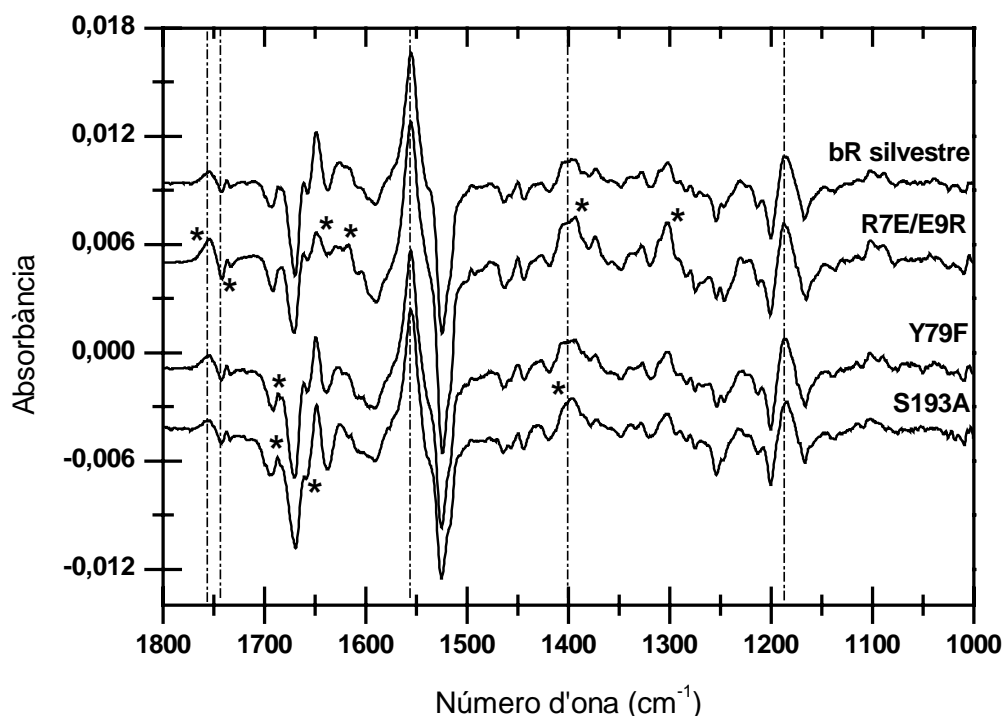


Figura IV.39. Espectre de diferència de la bR silvestre i mutants R7E/E9R, Y79F i S193A obtinguts a partir de film humit de MP a pH 10, 150 mM KCl i 4°C . L'intermediari atrapat és l'N. * canvis per a tenir en consideració.

IV.3.4. Discussió

La major accessibilitat del retinal per la hidroxilamina a les fosques al mutant R7E/E9R (taula IV.5) evidencia una estructura menys compacta comparat amb la bR silvestre, segurament degut a una major obertura de les hèlices. Aquesta menor compactació es troba manifestada en la menor estabilitat tèrmica de la bR mutant tal i com s'observa tant per les dades d'espectroscòpia UV-Visible com de DSC (taules IV.6 i IV.7) produint-se una desnaturalització a temperatures menors. La major obertura per altra banda de les hèlices permetria l'entrada de molècules d'aigua al voltant de la BS

modificant el seu entorn, tal i com ho evidencia el pK_a alterat de l'Asp 85 (taula IV.3) i la desprotonació precoç de la BS a pH bàsics (figura IV.18). Aquests efectes poden ser deguts en part a una menor afinitat dels cations en aquest mutant, hipòtesi que s'obté del fet de la quasi absent pre-transició dels termogrames obtinguts per DSC (figura IV.27), i de la petita diferència entre el pK_a de l'Asp 85 en aigua i desionitzada (taula IV.3).

Estudis de fotòlisi de llampec sobre aquest mutant mostren petits canvis a nivell de vida mitja dels intermediaris, com és la formació més lenta d' M_1 a pH neutre (taula IV.8). Aquest fet indicaria que podria haver-hi un augment i/o una disminució en el pK_a de la BS o Asp 85 respectivament que produís un enlentiment en el pas del protó des de la BS a l'Asp 85. A pH bàsic però, la formació tant d' M_1 com d' M_2 es veu accelerada respecte a la bR silvestre. Aquest efecte podria ser degut a la desprotonació d'algun grup a aquest pH, que podria ser el CAP. De fet els estudis de fotocorrents mostren una disminució en una unitat de pH del pK_a del CAP al seu estat basal comparat amb la bR silvestre (figura IV.35) indicant que la mutació produeix un canvi de l'entorn del CAP fent-lo segurament més hidrofílic. La desprotonació del CAP a pH més neutres podria ser la causa de l'acceleració de la formació d' M_1 i M_2 a pH bàsic en aquests mutants.

El fet de que la cinètica de desaparició de B2 i aparició d'M es solapin perfectament en tot el rang del pH (figura IV.32.bis) permet correlacionar els moviments de càrregues amb la cinètica d'aparició d'M. La determinació de la constant de cadascun d'aquests dos elements dóna lloc a una corba sigmoïdal (figura IV.34) el punt d'inflexió de la qual dóna un valor bastant similar entre ells. Aquest pK_a l'atribuïm al CAP a l'estat basal de la proteïna. Aquesta atribució s'ha realitzat degut principalment al fet de que en inhabilitar-se el CAP mitjançant determinades mutacions, la dependència del pH desapareix (Misra et al., 1998).

Així doncs, la disminució en el pK_a del CAP en aquest mutant es tradueix en una disminució del rang de pH on es produeix un transport normal de protons. És a dir, mentre que la bR silvestre presenta un transport normal entre al voltant de pH 5 i 9, el mutant R7E/E9R presentarà aquesta normalitat entre pH segurament 5 i 8 de manera que a pH bàsics aquest mutant presentarà una menor eficiència de bombeig de protons que la bR silvestre. A pH neutres però, aquesta eficiència es presenta invariable (figura IV.31), de manera que els petits canvis cinètics detectats a nivell de l'intermediari M no afecten el bombeig de protons al menys a pH neutres.

La pràcticament normal funcionalitat d'aquest mutant és d'esperar tenint en compte que l'obertura de les hèlices només es produeix a l'estat basal de la bR, ja que en presència d'il·luminació la compactació de la bR seria normal, tal i com indica l'accessibilitat de la hidroxilamina (taula IV.5). Podria ser aquesta major mobilitat de les hèlices en absència d'il·luminació, el causant del canvi d'entorn del CAP disminuint el seu pK_a . L'acceleració de la desaparició d' M^s en aquest mutant indicaria una alteració en l'equilibri $N \leftrightarrow O$ indicant que l'Asp 96 és capaç de reprotonar-se a pH més bàsics que la bR silvestre. Aquest fet doncs podria indicar o bé un canvi en el pK_a de l'Asp 96 o bé una major obertura de les hèlices en la part citoplasmàtica permetent una major entrada de molècules d'aigua.

Així doncs sembla ser que la ruptura en les interaccions establertes entre l'hèlix A amb la B i C al mutant R7E/E9R són importants per mantenir la correcta compactació de les hèlices a l'estat basal de la bR i potser també de l'ordenació trimèrica. No obstant això, la funcionalitat del mutant es troba pràcticament intacta tal i com o mostren els estudis del fotocicle i de l'activitat bombejadora de protons.

La mutació Y79F produeix unes alteracions sobre la proteïna similars a les produïdes al mutant R7E/E9R però en major mesura, podent ser també degudes en part a la menor afinitat dels cations al mutant com indica la quasi absent pre-transició (figura IV.27). En aquest cas també s'observa una major accessibilitat del retinal per la hidroxilamina sobre tot a les fosques, indicant una major obertura de les hèlices que al doble mutant. Aquest fet es tradueix en un pK_a de l'Asp 85 encara més alterat i també una desprotonació precoç de la BS (figura IV.18).

Al mutant R7E/E9R es trenca la interacció d'ambdós grups (hèlix A) amb la tirosina 79 (hèlix C) i a més amb la metionina 60 (Hèlix B)(figura IV.9). Al mutant Y79F es produeix un efecte similar al produït en el mutant R7E/E9R, trencant-se el pont d'hidrogen que hi havia entre la tirosina 79 amb el glutàmic 9 i l'arginina 7 (figura IV.10). Així doncs l'accessibilitat per la hidroxilamina al mutant Y79F hauria de ser similar al del doble mutant. Però en realitat, la substitució de la tirosina 79 produeix una major obertura de les hèlices que al doble mutant. Aquest efecte podria ser degut a que en el mutant R7E/E9R es poden establir nous ponts d'hidrogen inter-hèlix com poden ser entre l'arginina 9 i el triptòfan 205 (hèlix G) i l'arginina 82 (hèlix C). Ja que en realitzar la mutació R7E/E9R l'únic que estem fent és canviar la posició dels residus, però aquests són totalment funcionals per establir nous ponts d'hidrogen. En el cas del

mutant Y79F, el que s'està fent és inhabilitar completament la capacitat del grup 79 de formar ponts d'hidrogen, en aquest cas, l'Arg 7 i Glu 9 quedarien lliures i podrien formar noves interaccions. Aquestes noves interaccions es podrien o bé no donar o bé ser més febles que en el cas del mutant R7E/E9R i per tant produir una major obertura de les hèlices.

La mutació Y79F, tot i produir una menor compactació de les hèlices que la mutació R7E/E9R, presenta una major estabilitat tèrmica que el doble mutant (taula IV.6 i IV.7). La major obertura de les hèlices produïda al mutant Y79F sembla doncs que altera l'entorn del retinal però no altera d'una manera tan important l'estabilitat tèrmica de la proteïna, segurament degut a que en no haver-hi la interacció amb l'arginina 7 i el glutàmic 9 aquests grups queden lliures i poden interaccionar amb altres grups, podent restaurar parcialment l'estabilitat tèrmica de la bR.

La cinètica de l'intermediari M mostra una aparició més lenta d'aquest intermediari tant a pH neutre com bàsic al mutant Y79F. Aquest retardament es produeix a nivell dels dos components d'M. Aquest fet doncs sembla indicar que hi ha hagut un canvi en els pK_a de l'Asp 85 i/o la BS. El component M_2 però pareix un més important retardament en la seva formació indicant que o bé es podria retardar l'orientació de la BS des del costat extracel·lular al citoplasmàtic o bé la desprotonació del CAP en aquest mutant. El fet de que l'alliberació del H^+ sigui normal (figura IV.31) podria indicar que en realitzar-se la mutació Y79F s'obstaculitza l'orientació de la BS. Com en el cas del mutant R7E/E9R l'únic efecte funcional important del mutant Y79F es tradueix en una disminució d'una mica més d'una unitat de pH del pK_a del CAP a l'estat basal en canviar el seu entorn.

Així doncs es conclou que la interacció per pont d'hidrogen entre la tirosina 79 amb el glutàmic 9 i 7 ajuda a mantenir la correcta compactació de les hèlices i possiblement dels trímers, i a mantenir el correcte entorn del CAP al menys a l'estat basal, i a que es produeixi el canvi d'accessibilitat de la BS durant l'intermediari M.

La substitució de la serina 193 per una alanina no solament afecta sensiblement el màxim d'absorbància de la bR (taula IV.2) sinó que a més enlenteix considerablement la cinètica d'adaptació a la foscor del mutant. Aquests efectes es deuen a una alteració de l'entorn del retinal que es tradueix també en una alteració del pK_a de l'aspàrtic 85 (taula IV.3). Aquest mutant podria tenir una menor afinitat pels cations, extret a partir de les dades de pK_a de l'Asp 85 en diferents condicions de força

iònica. Les dades de DSC, però, mostren una pre-transició pràcticament normal indicant en principi un contingut normal en cations. Estudis més en profunditat de l'afinitat dels cations en aquest mutant podrien aclarir aquest aspecte.

La ruptura d'una de les interaccions amb el glutàmic 204 (figura IV.11) sembla ser important pel compactament de les hèlices, tal i com ho indica la gran accessibilitat del retinal per la hidroxilamina (taula IV.5). Aquesta descompactació però, no produeix una important desestabilització tèrmica de la proteïna (taula IV.6 i IV.7), sinó solament petits canvis en la funcionalitat de la bR.

Les dades de cinètica de formació de l'intermediari M (figura IV.28) mostren una menor acumulació de M_1 a pH 10, degut segurament a que la formació de M_2 es veu retardada en aquest mutant. L'enlentiment en la desaparició d' M_2 en aquest cas seria degut a un petit retardament en l'expulsió del protó pel CAP (figura IV.31) i no degut a una més lenta reorientació de la BS cap al costat citoplasmàtic com de fet succeeix al mutant Y79F.

La menor dependència de l'acumulació d' M_1 del pH en el mutant S193A podria indicar l'alteració del pK_a del grup que s'estaria desprotonant a pH bàsic i que donaria lloc a una aparició més ràpida i desaparició més lenta d'M. Aquest fet es trobaria correlacionat amb el valor de pK_a més elevat, per sobre de 9, del CAP a l'estat basal (figura IV.35), de manera a pH 10 només es tindria una desprotonació parcial del grup implicat. L'increment d'una unitat de pH del pK_a del CAP a l'estat basal, observat pels experiments de fotòlisi de llampec i fotocorrents indica que la mutació S193A estaria produint un canvi en l'entorn del CAP fent-lo probablement més hidrofòbic.

Com en el cas del mutant R7E/E9R, l'augment de la velocitat de desaparició d' M^s en aquest mutant podria indicar una alteració en el procés de reprotonació de l'Asp 96.

Els canvis més importants produïts al mutant S193A no es troben en la cinètica de l'intermediari M sinó en l'eficiència del mutant en iniciar el fotocicle i bombejar protons. A la mateixa concentració de mostra i intensitat de llum, en aquest mutant solament inicien el fotocicle un 75 % de molècules comparat amb la bR silvestre. Els estudis amb piranina per altre costat mostren que en el mutant solament es produeix un 25 % de bombeig de protons comparat amb la bR silvestre. Aquestes dades doncs indiquen que en el mutant S193A 3 de cada 4 molècules irradiades inicien el fotocicle i

que d'aquestes 3 una d'elles bombeja protons. Les altres dues molècules deuen realitzar un fotocicle alternatiu on no és dona el transport de protons.

El fet de que en aquest treball solament estudiem l'intermediari M mitjançant fotòlisi de llumpec no fa possible detectar per un costat fotocicles alternatius i per l'altre cavis en l'acumulació i cinètica de la resta d'intermediaris. Així doncs, tot i que l'estudi de la cinètica d'M mostra una més o menys normalitat del fotocicle dels diferents mutants, això no vol dir que la resta del fotocicle sigui normal.