



Estudi dels canvis estructurals de la permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli* induïts per la unió dels substrats

Memòria presentada per Xavier León Madrenas per obtenir al grau de Doctor.

Aquest treball ha estat realitzat en la Unitat de Biofísica del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Esteve Padrós i Morell.

Vist i plau del director de la tesi:

Dr. Esteve Padrós i Morell

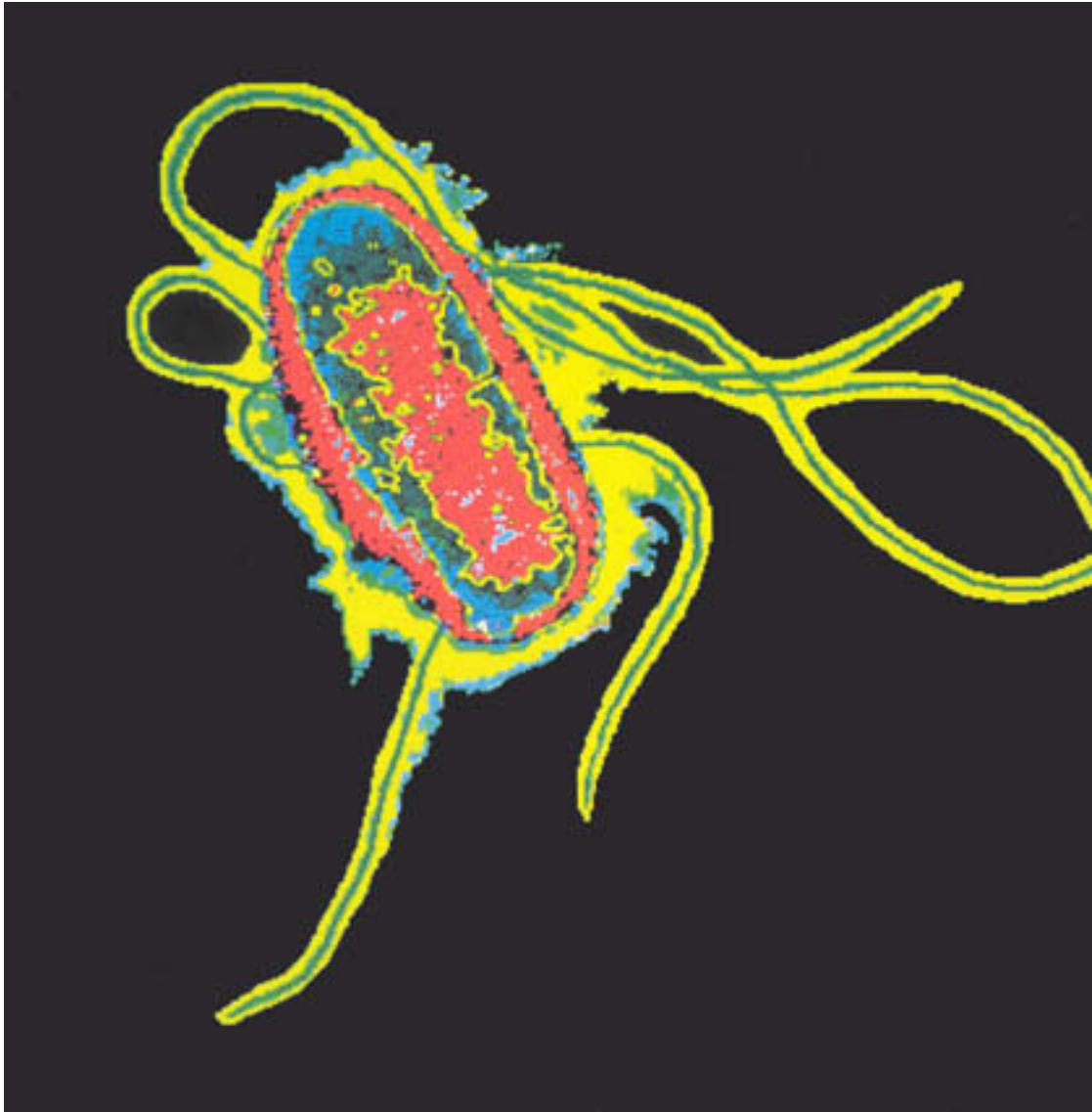


Foto: *Escherichia coli*

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Transport a través de la membrana	3
1.1.1. Tipus de transport	3
1.1.2. Transport de carbohidrats a través de la bicapa lipídica	5
1.1.3. Transport secundari	6
1.1.4. La família GPH (galactòsids-pentoses-hexurònids)	7
1.2. Estructures 3D de transportadors de membrana	9
1.2.1. Estructures 3D dels transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana	9
1.2.2. Estructures 3D de transportadors que uneixen Na ⁺	14
1.3. El transportador de melibiosa (MelB)	16
1.3.1. Funció de la MelB	17
1.3.2. El transport i els senyals elèctrics	21
1.3.3. El transport i els canvis de fluorescència	22
1.3.4. Lloc d'unió dels cations	23
1.3.5. Lloc d'unió del sucre	26
1.3.6. Connexió del lloc d'unió del catió amb el lloc d'unió del sucre	27
1.3.7. Formació de ponts salins entre Asp i Arg/Lys	28
1.3.8. Orientació de la MelB reconstituïda en liposomes	28
1.3.9. Canvis conformacionals induïts per la unió de substrats	29
1.3.10. Estructura de la MelB	30
1.3.11. La MelB reaccionada amb NEM	33
1.3.12. La permeasa sense cisteïnes (Cys-less o 3SV)	33
1.3.13. El llaç 10-11	34
1.3.14. El llaç 4-5. El mutant R141C	35
1.3.15. La MelB reconstituïda amb lípids de PC	37
1.3.16. Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia d'infraroig	38
1.3.16.1. Espectres d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de la MelB salvatge en H ₂ O i D ₂ O	38
1.3.16.2. Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats	39

1.3.16.3. Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR	40
1.3.16.3.1. Bescanvi H/D de la MelB salvatge	40
1.3.16.3.2. Bescanvi H/D del mutant R141C	41
1.3.16.4. Estudi de l'orientació de la MelB salvatge i del mutant R141C per ATR-FTIR	41
1.3.17. Estructures 2D i 3D de la MelB	43
1.4. Espectroscòpia d'infraroig	45
1.4.1 Vibració i absorció de la llum infraroja	45
1.4.2. Adquisició dels espectres i funcionament d'un interferòmetre	46
1.4.3. Tècnica d'ATR-FTIR	47
1.4.4. Bescanvi H/D	52
1.4.5. Desconvolució pel mètode de màxima entropia	53
1.4.5.1. Fonaments teòrics de la desconvolució per màxima entropia	54
1.4.6. Modes de vibració de l'enllaç peptídic	55
1.4.7. Efecte de l'estructura de la proteïna en la posició de l'amida I	56
1.4.8. Assignació de l'estructura secundària	56
1.4.9. Absorció de les cadenes laterals dels aminoàcids	57
1.5. Espectres de diferència mitjançant FTIR	59
1.5.1. Introducció	59
1.5.2. Informació que es pot treure d'un espectre de diferència	61
1.5.3. Origen dels pics dels espectres de diferència	62
1.5.4. Mètodes per a l'assignació dels pics	63
2. OBJECTIUS	65
3. MÈTODES EXPERIMENTALS	69
3.1. Materials utilitzats	71

3.2. Obtenció de la MelB, el R141C o el 3SV (Cys-less) purificats i reconstituïts	72
3.2.1. Obtenció de les vesícules invertides de membrana (IMVs) amb MelB, R141C o 3SV recombinants	72
3.2.2. Purificació de la MelB i dels mutants mitjançant resines	73
3.2.3. Reconstitució de la MelB i els mutants R141C i 3SV	75
3.3. Mesura de la concentració i de l'activitat de la MelB i els mutants	77
3.4. Comprovació de l'estat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència, columna d'exclusió molecular i espectroscòpia d'infraroig	78
3.5. Adquisició dels espectres de diferència induïts per la unió de substrats	80
3.5.1. Espectres de diferència en H ₂ O	80
3.5.2. Espectres de diferència en D ₂ O	81
3.5.2.1. Anàlisi dels espectres de diferència en D ₂ O	81
3.5.3. Correcció dels espectres de diferència	82
3.5.4. Desconvolució dels espectres de diferència mitjançant el mètode de la màxima entropia	83
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	85
4.1. Obtenció de la MelB, del mutant R141C i del mutant 3SV purificats i reconstituïts	87
4.2. Comprovació de l'activitat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència	89
4.3. Comprovació de l'estat de les mostres mitjançant espectroscòpia d'infraroig	90
4.4. Controls dels espectres de diferència	91
4.4.1. Estabilitat del film de proteoliposomes sobre el cristall d'ATR	91
4.4.2. Efecte de la diferència de força iònica	91

4.4.3 Efecte de la diferència de pH	92
4.4.4. Contribució dels tampons en els espectres de diferència	94
4.4.5. Espectres de diferència de lípids d' <i>E. coli</i> causats pels substrats	94
4.4.6. Espectres de diferència de la MelB induïts per la sacarosa	95
4.5. Espectres de diferència de la MelB deguts a la unió de substrats	97
4.5.1. Efecte de la unió de Na ⁺ i Li ⁺	97
4.5.2. Interacció de la melibiosa en presència de Na ⁺	103
4.5.3. Interacció de la melibiosa en presència de Li ⁺ o H ⁺	107
4.6. Espectres de diferència de la MelB salvatge en D₂O	110
4.6.1. Consideracions prèvies	110
4.6.1.1. Diferent grau d'intercanvi H/D induït pels substrats	110
4.6.1.2. Estimació de la intensitat de l'espectre de diferència	111
4.6.2. Nivell d'intercanvi H/D	111
4.6.3. Espectres de diferència induïts per la unió de Na ⁺	113
4.6.4. Espectres de diferència induïts per la interacció de la melibiosa	117
4.6.5. Espectres de diferència en la regió de l'amida A	122
4.7. Espectres de diferència del mutant 3SV	124
4.7.1. Espectres de diferència induïts per la unió dels cations	124
4.7.2. Espectres de diferència induïts per la interacció de la melibiosa en presència dels diferents cations	127
4.8. Espectres de diferències del mutant R141C	133
4.8.1. Espectres de diferència induïts per la unió dels cations	133
4.8.2. Espectres de diferència induïts per la unió de melibiosa en presència dels diferents cations	136
4.9. Espectres de diferència de la MelB WT reaccionada amb NEM	142
4.9.1. Espectres de diferència de la MelB-NEM induïts per la unió de melibiosa en presència dels diferents cations	142

4.10. Espectres de diferència de la MelB salvatge reconstituïda amb fosfatidilcolina d'ou (EPC)	147
4.10.1. Composició lipídica dels proteoliposomes	148
4.10.2. Espectres de diferència induïts per la unió de Na ⁺	148
4.10.3. Espectres de diferència induïts per la interacció de melibiosa en presència de Na ⁺	151
5. DISCUSSIÓ GENERAL	155
5.1. Controls per a l'obtenció dels espectres de diferència	157
5.2. Espectres de diferència induïts per la unió de substrats. Canvis en l'estructura secundària i terciària	159
5.2.1. Espectres de diferència de la permeasa sense Cys: 3SV	159
5.2.2. Accessibilitat de les estructures que intervenen en els espectres de diferència	160
5.2.3. Canvis estructurals induïts per la unió de Na ⁺ o Li ⁺	160
5.2.4. Canvis estructurals induïts per la unió de melibiosa	161
5.2.4.1. Canvis en les hèlixs transmembrana induïts per la interacció de melibiosa	162
5.2.4.2. Efecte de la mutació R141C i la reacció amb NEM en les hèlixs α	164
5.2.4.3. Canvis en les làmines β induïts per la interacció de melibiosa	165
5.2.4.4. Canvis en les girs reversos induïts per la interacció de melibiosa	167
5.2.5. Reconstitució de la MelB amb lípids de fosfatidilcolina	167
5.3. Espectres de diferència induïts per la unió de substrats. Canvis en la protonació/entorn de les cadenes laterals	168
5.3.1. Canvis en la protonació/entorn de les cadenes laterals deguts a la unió de Na ⁺	168

5.3.2. Canvis en la protonació/entorn dels Asp i Glu deguts a la interacció de melibiosa	169
5.3.3. Canvis en la vibració d'Asn, Tyr, Trp i Lys deguts a la unió de melibiosa	171
5.4. Modificació dels llaços citoplasmàtics 4-5 i 10-11	173
5.5. Proposta del mecanisme de transport	176
5.5.1. Canvis en l'estructura secundària i terciària i en la protonació/entorn de les cadenes laterals en el transport de la MelB	178
5.5.2. Efecte de les modificacions en els llaços 4-5 i 10-11 en el transport de la MelB	179
6. CONCLUSIONS	181
7. REFERÈNCIES	187
8 PUBLICACIONS	209

Abreviatures

A, Ala	alanina
C, Cys	cisteïna
D, Asp	aspàrtic
E, Glu	glutàmic
F, Phe	fenilalanina
H, His	histidina
K, Lys	lisina
L, Leu	leucina
M, Met	metionina
N, Asn	asparragina
P, Pro	prolina
Q, Gln	glutamina
R, Arg	arginina
S, Ser	serina
V, Val	valina
W, Trp	triptòfan
X	qualsevol aminoàcid
Y, Tyr	tirosina
3SV (Cys-less)	mutant de la MelB sense cisteïnes: Cys110Ser, Cys235Val, Cys310Ser i Cys364Ser
ATR-FTIR	reflexió total atenuada-infraroig amb transformada de Fouier
DM	dodecil maltòsid
d_p	profunditat de penetració de l'ona evanescent
EPC	fosfatidilcolina d'ou
FRET	transferència d'energia de fluorescència
Ge	germani
GPH	família galactòsids-pentoses-hexurònids
H/D	hidrogen/deuteri
IMV	vesícules de membrana invertides
IRE	element de reflexió interna
ISO	vesícules amb orientació contrària a la fisiològica (inside out)
LacS	transportador de lactosa de <i>Streptococcus thermophilus</i>
LacY	transportador de lactosa d' <i>Escherichia coli</i>
LAPAO	(3-lauryl-amido)-N,N'-(dimethylamino) propylamine oxide
MelB	transportador de melibiosa d' <i>Escherichia coli</i>
MelB-NEM	permeasa de melibiosa reaccionada amb <i>N-ethylmaleimide</i>
Melibiosa	6-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucose
NEM	<i>N-ethylmaleimide</i>
MFS	superfamília de facilitadors majors
Ni-NTA	àcid nitriloacètic recobert de ions níquel
R141C	mutant de la MelB Arg141Cys
RSO	vesícules amb orientació fisiològica (right side out)
ZnSe	selenur de zinc
(^3H) α -NPG	p-Nitrofenil α -D-(6- ^3H)galactopiranòsid
α -NPG	p-Nitrofenil α -D-galactopiranòsid
$\Delta\psi$	potencial elèctric transmembrana

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Transport a través de la membrana

Les cèl·lules eucariotes i procarites estan protegides per una membrana lipídica que les aïlla del medi extern i que els hi permet mantenir un control del seu medi intern. Aquest control el realitzen mitjançant els transportadors de membrana i els canals que permeten una selecció dels substrats que han d'entrar i sortir. Aquestes proteïnes no només són importants en la membrana citoplasmàtica si no que també tenen una funció important transportant substrats en els orgànuls cel·lulars.

Aquests transportadors tenen varies funcions com: permeten l'entrada al citoplasma de nutrients per a la cèl·lula, permeten també l'excreció de productes metabòlics de dintre dels orgànuls i finalment de dintre la cèl·lula, mantenen el potencial de membrana transportant ions, etc.

1.1.1. Tipus de transport

El pas de substàncies a través de la membrana es pot realitzar de tres formes diferents:

1) Difusió passiva: el solut passa a través de la membrana (sense l'ajuda de transportadors) degut a la diferència de concentració entre el medi extern i intern, fins que arribi a l'estat d'equilibri que serà quan les concentracions exteriors i interiors s'igualin (màxima entropia). Aquest tipus de transport el poden realitzar algunes molècules petites, per les quals la membrana és permeable.

2) Transport passiu: S'anomena també difusió facilitada i encara que no fa servir energia pel transport sí que necessita de proteïnes de membrana. Aquestes asseguren la selectivitat en el pas de les molècules de solut (canals aquosos).

3) Transport actiu (figura 1.1): Necessita energia per realitzar la seva funció. Depenent d'on provingui aquesta energia el transport actiu es subdivideix en:

a) Primari: aquests transportadors fan servir l'energia de la llum (transport d' H^+ per la bacteriorodopsina) o d'alguna reacció química (transport de Ca^{2+} per l'ATPasa de Ca^{2+}) per transportar el substrat.

b) Secundari: utilitzen l'energia electroquímica (si el substrat està carregat) o només química (si el substrat no està carregat) generada per un gradient transmembrana d'un substrat per transportar un altre substrat (figura 1.1). Dintre el transport actiu secundari trobem diferents tipus de transport:

α) Uniport: quan un substrat és transportat sense la necessitat de co-transportar un ió (transportador de glucosa d'eritròcit humà).

β) Simport: quan un substrat és transportat mitjançant el gradient transmembrana originat per un altre substrat, i els dos substrats són transportats en el mateix sentit. Els co-transportadors normalment són el Na^+ o l' H^+ (les cèl·lules animals solen fer servir Na^+ ; en canvi les cèl·lules bacterianes l' H^+ (Poolman et al., 1996)). En aquest grup es troba la permeasa de melibiosa (MelB).

Els processos energètics que estan involucrats en aquest transport són:

$$\text{Força conductora} = Z\Delta p_A + \Delta\Psi - Z\Delta p_B$$

on $Z\Delta p_A$ i B són els gradients químics dels dos substrats i $\Delta\Psi$ és el potencial de membrana generat per la càrrega positiva del catió co-transportador (Poolman et al., 1996).

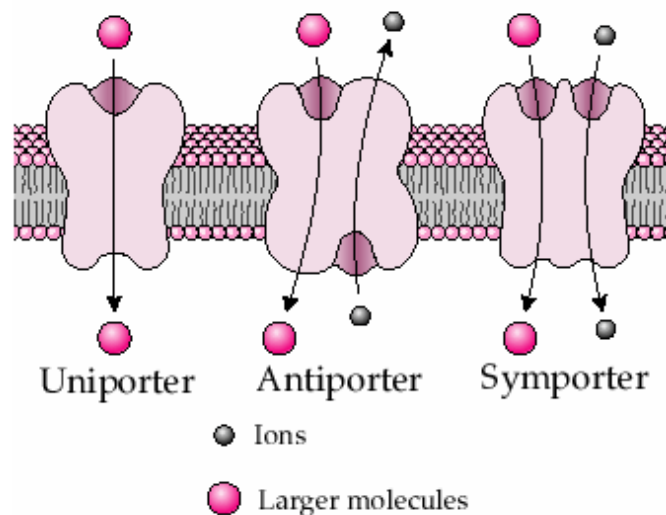


Figura 1.1. Esquema dels diferents tipus de transport actiu secundari.

La utilització d'un gradient transmembrana d'un catió a l'hora de transportar el solut, permet acumular aquest solut en contra gradient. Com a exemple, en el cas de la MelB, en presència de 10 mM de sodi l'acumulació de melibiosa en cèl·lules que no tenen α -galactosidasa té lloc fins que la

concentració a l'interior de la cèl·lula és de l'ordre de 200 cops l'exterior (Wilson i Ding, 2001).

γ) Antiport: quan els substrats són transportats en sentits oposats (intercanviador Na^+/H^+).

c) Translocació de grup: aquests transportadors transporten un substrat modificant químicament un altre.

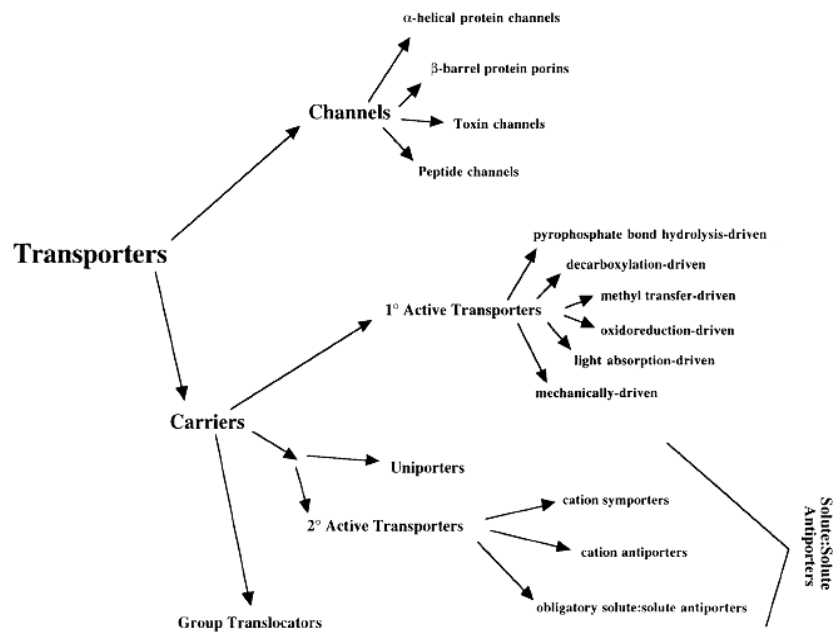


Figura 1.2. Classificació actual dels diferents tipus de transportadors de membrana de cèl·lules eucariotes i procariotes (Saier, 2000a).

1.1.2. Transport de carbohidrats a través de la bicapa lipídica

Els carbohidrats complexos constitueixen un dels quatre grans grups moleculars que formen els organismes vius. També serveixen com a font de carboni i síntesi d'energia de la majoria de les cèl·lules vives. Dins els carbohidrats complexos, tenim la glucosa que és el monosacàrid més estable i prevalent a la natura, ja que forma part de carbohidrats estructurals com la cel·lulosa i de font de carboni com el glicogen.

El transport de carbohidrats exògens cap a l'interior de la cèl·lula eucariota o procariota és el primer pas essencial per al seu catabolisme. Aquest primer pas de transport de solut però, dins les bactèries gram negatives, és el de travessar la paret cel·lular. Aquest procés es produeix normalment per difusió passiva a través de la membrana o per proteïnes

canals. En canvi, el mecanisme de transport de carbohidrats a través de la membrana plasmàtica es produeix bàsicament per proteïnes transportadores altament específiques del substrat a transportar.

1.1.3. Transport secundari

En l'última dècada hi hagut un augment en l'estudi dels transportadors secundaris (Poolman i Konings, 1993; Poolman et al., 1996; Reizer et al., 1994; Saier, 2000a). De tots els transportadors, el més estudiat i del que s'han fet més mutants és de la permeasa de lactosa (LacY) (Guan i Kaback, 2005) seguit de la MelB. La LacY forma part de la superfamília de facilitadors majors de membrana (Saier, 2000b). La MelB no està inclosa dintre aquesta família ja que no hi ha prou similitud de seqüència ni motius (Saier, 2000b).

Abans d'obtenir les primeres estructures 3D d'aquests transportadors bacterians es predeia majoritàriament una estructura secundària principalment de dos cops 6 segments transmembrana, separats per un llaç central llarg i amb els llaços citoplasmàtics més llargs que els llaços periplasmàtics (Poolman i Konings, 1993). Aquestes prediccions s'obtenien mitjançant estudis immunològics (Botfield i Wilson, 1989), de fusió de *phoA* (Pourcher et al., 1996), de proteòlisi (Gwizdek et al., 1997), tècniques espectroscòpiques (Dave et al., 2000) i d'anàlisis d'hidropatia de la seqüència primària d'aquests transportadors. Per altres transportadors es prediu que tenen 4 (sistemes d'expulsió de fàrmacs) o 6 (antiports del cloroplast) hèlixs transmembrana però que la seva estructura quaternària consta de trímers i dímers respectivament, i per tant la seva unitat funcional continua sent 12 hèlixs transmembrana (Poolman i Konings, 1993).

Els transportadors simports de Na^+ /solut estan dividits en 11 famílies (Reizer et al., 1994). Aquesta superfamília transporta molts tipus de substrats: hormones, neurotransmisors, monosacàrids, disacàrids, aminoàcids, àcids biliars, etc. Els fonaments dels mecanismes on participen l' H^+ i el Na^+ són molts semblant, i amb petites modificacions es poden passar d'un a un altre. En canvi, les famílies de transportadors estan molt ben separades entre les que fan servir H^+ i les que fan servir Na^+ . De les onze famílies hi ha algunes com les de carboxilats, fosfat inorgànic, galactòsids i alanina que poden utilitzar Na^+ o H^+ . Tots els transportadors bacterians es mouen entre 400 i 500 residus, en

canvi els eucariotes tenen mides variables de 300 fins a 720 residus encara que dintre d'una mateixa família tenen una grandària semblant.

En concret, la MelB es troba dintre de la família dels galactòsids. Aquesta família transporta els galactòsids amb l'ajuda del Na^+ (MelB) o amb H^+ (permeasa de lactosa de *Streptococcus thermophilus*). Les bacteries gram negatives fisiològicament transporten α -galactòsids (melibiosa) i les bacteries gram positives β -galactòsids (lactosa). Els transportadors de les grams positives són més grans (uns 630 residus) que els de les grams negatives (uns 470 residus). Alguns d'aquests transportadors, com és el cas de la MelB, presenten un motiu característic de la superfamília de facilitadors majors (MFS): (RK)XG(RK)(RK). Com en el cas de la MFS, es preveu que la família dels transportadors de galactòsids està formada de 12 hèlix transmembrana.

1.1.4. La família GPH (galactòsids-pentoses-hexurònids)

Poolman et al. (1996) van fer una altra classificació de transportadors on es troba la MelB i que s'anomena la família de transportadors de galactòsids-pentoses-hexurònids (GPH). Aquesta família transporta específicament galactòsids, pentoses i hexurònids mitjançant diversos cations que poden ser Na^+ , Li^+ , o H^+ . Dintre aquesta família trobem les permeases de melibiosa d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium* (que són les que comparteixen més homologia en la seva seqüència) i la permeasa de lactosa de *Streptococcus thermophilus* que és la que té menys homologia amb la MelB. Basant-se en prediccions d'estructura topològica i d'estructura secundària, es preveu que tots els membres de la GPH consten de 12 hèlixs transmembrana (Henderson, 1993).

Dintre de les hèlixs transmembrana es troben aminoàcids carregats que estan conservats, sobretot aquells que es troben en l'hèlix II. Aquests aminoàcids estarien involucrats en la unió dels cations i la presència o l'absència d'alguns d'ells en alguns transportadors donaria lloc a la diferència de selectivitat entre les permeases a l'hora d'utilitzar Na^+ , Li^+ o H^+ (Taula 1.1.). Per exemple, s'ha vist que la presència de l'Asn58 de la MelB d'*E. coli* i les Asn en posicions equivalents en els transportadors dels altres organismes, fa que el transportador tingui una especificitat pel catió Na^+ . Una altra característica de la família GPH és l'alt grau de conservació del llaç 10-11 (i de l'hèlix XI). Fins i tot

alguns dels aminoàcids del llaç 10-11 també es troben conservats en la permeasa de lactosa d'*Escherichia coli* (que no forma part d'aquesta família).

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

Substrats	MelB _{EC}	MelB _{SY}	MelB _{KP}	LacS _{ST}	GusB _{EC}
α -galactòsids					
<i>melibiosa</i>	H ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺	Na ⁺ , Li ⁺	H ⁺	H ⁺	NT
β -galactòsids					
<i>TMG</i>	Na ⁺ , Li ⁺ , (H ⁺)	Na ⁺ , Li ⁺	H ⁺ , Li ⁺	H ⁺	NT
<i>Lactosa</i>	Na ⁺ , Li ⁺	nd	Li ⁺	H ⁺	NT
Monosacàrids					
<i>D-galactosa</i>	H ⁺ , Na ⁺ , (Li ⁺)	nd	nd	H ⁺	NT
α/β -glucurònids	H ⁺ , Na ⁺	nd	nd	nd	H ⁺

Melibiosa, 6-O-galactopiranosil-D-glucosa; TMG, metil- β -D-tiogalactopiranosid; Lactosa, 4-O- β -galactopiranosil-D-glucosa; nd, no determinat; NT, no transportat. Els cations entre parèntesi volen dir que l'activació per ells és molt pobre. MelB_{EC}, permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli*; MelB_{SY}, permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium*; MelB_{KP}, permeasa de melibiosa de *Klebsiella pneumoniae*; LacS, permeasa de lactosa d'*Streptococcus thermophilus*; GusB_{EC}, transportador de glucurònid d'*Escherichia coli*. Les dades de la taula es troben descrites a Poolman et al. (1996).

1.2. Estructures 3D de transportadors de membrana

1.2.1. Estructures 3D dels transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana

L'estudi dels transportadors de membrana, i en concret dels transportadors de sucres, que són els que presenten més interès per aquest estudi, ha fet un salt molt important fa pocs anys gràcies a la cristal·lització de la permeasa de lactosa (LacY) (Abramson et al., 2003) i d'altres transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana (MFS) com són el transportador glicerol-3-fosfat d'*E. coli* (GlpT) (Huang et al., 2003) i el transportador d'oxalat (OxIT) (Hirai i Subramaniam, 2004).

Tot i que el transportador de lactosa d'*Escherichia coli*, no és un membre de la família dels transportadors de galactòsids-pentoses-hexurònids (GPH) (família a la que pertany la MelB) i per tant no presenta un grau d'homologia de seqüència significatiu, té una gran similitud funcional i estructural amb membres de la família GPH (Saier, 2000b), especialment amb la MelB. A la MelB també se li prediu un model topològic de 12 hèlixs transmembrana amb el costat N- i C-terminal a la cara citoplasmàtica, i a més comparteixen molts substrats (lactosa, melibiosa, tiometil galactòsid, α -NPG). De fet, els membres de la família GPH mostren una gran similitud amb la resta de transportadors de la família MFS. En canvi la diferència més important es troba en els cations que fan servir a l'hora de co-transportar. La MelB fa servir Na^+ , Li^+ o H^+ , però la LacY només fa servir H^+ (Saier, 2000b). A més, el lloc d'unió del catió s'ha proposat que es troba en diferents dominis (Abramson et al., 2003; Poolman et al., 1996). En resum, la LacY i MelB s'espera que tinguin una estructura similar, però amb una organització de les hèlixs diferents, sobretot aquelles que estan al voltant del lloc d'unió del catió.

Els cristalls de la LacY (3,4 Å de resolució), del GlpT (3,3 Å de resolució) i de l'OxIT (6,5 Å de resolució) mostren l'estructura esperada de 12 hèlixs transmembrana (figura 1.3), on 6 d'aquestes hèlixs es troben agrupades en el N-terminal i les altres 6 en el C-terminal, amb una cavitat formada entre les hèlixs I, II, IV i V (N-term) i VII, VIII, X i XI (C-term) en el cas de la LacY. Encara que aquestes proteïnes no tenen una seqüència molt semblant, s'ha vist que

l'estructura es troba més conservada en proteïnes de la mateixa família que no pas la seva seqüència (Vardy et al., 2004).

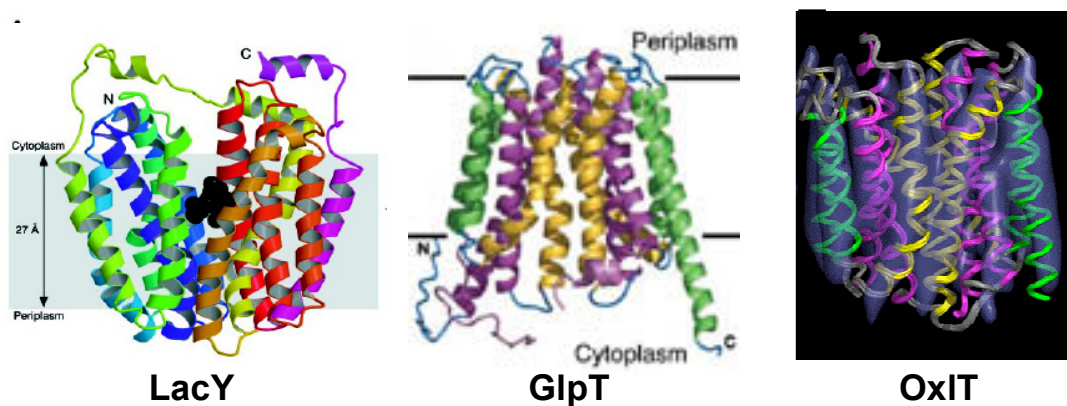


Figura 1.3. Estructures 3D de la permeasa de lactosa (LacY) (Abramson et al., 2003), del transportador glicerol-3-Phosphate (GlpT) (Huang et al., 2003) i del transportador d'oxalat (OxIT) (Hirai i Subramaniam, 2004).

Una de les característiques més rellevant d'aquest cristall de la LacY i d'altres transportadors (Locher et al., 2003) és que les hèlixs transmembrana presenten curvatures o altres tipus d'irregularitats.

El cristall de la LacY mostra un transportador amb unes dimensions de 30 x 60 Å i apareix amb un sucre homòleg de la lactosa, (β)-D-galactopiranosil-1-tio-(β)-D-galactopiranosid (TDG), unit. Aquest transportador correspon al mutant C154G que té la peculiaritat que "atrapa" a la proteïna en una conformació que està encarada cap al citoplasma (*inward-facing*). L'estructura de la LacY, i també de la GlpT, corroboren l'assumpció que el mecanisme de transport comporta l'adopció per part de la proteïna d'una sèrie de canvis conformacionals que li permeten tenir el lloc d'unió dels substrats alternativament encarat cap a un cantó o cap a un altre, però no cap els dos cantons alhora (Locher et al., 2003). Dintre d'aquests canvis conformacionals hi deuen haver canvis en les inclinacions i en les posicions de les hèlixs transmembrana. El problema és que tant la LacY com el GlpT estan cristal·litzats orientats cap al citoplasma (*inward-facing*), per tant, el primer objectiu per futurs experiments és obtenir alguna d'aquestes proteïnes en la conformació encarada cap a l'exterior (*outward-facing*). En el cas de l'OxIT la proteïna es troba en un estat que s'anomena *tancat*, degut a que el transportador no es troba obert cap a cap cantó. Per tant, Hirai i Subramaniam

(2004) proposen unes seqüències pel transport dels substrats, tant per al simport, uniport i antiport, en el que introdueixen un nou estat, a més de les dues posicions alternades cap a l'espai periplasmàtic i citoplasmàtic. Aquest nou estat correspon a una conformació en la que la proteïna es troba en un estat tancat, sense accés per cap dels costats (figura 1.4).

Symporter

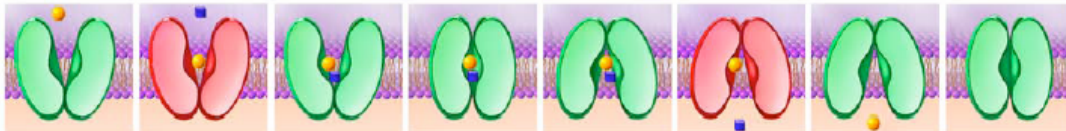


Figura 1.4. Descripció dels diferents estats en el transport simport. Els estats en vermell indiquen estats en que la proteïna no pot translocar. Els transportadors simports no poden translocar quan tenen un sol substrat unit (Hirai i Subramaniam, 2004).

El canvi en l'inclinació de les hèlixs comentat abans s'ha pogut observar, per exemple, en l'ATPasa de Ca^{2+} (que no forma part de la superfamília de facilitadors majors de membrana) (figura 1.5) on s'ha cristal·litzat el transportador amb i sense el Ca^{2+} unit. El canvi d'inclinació i el moviment de les hèlixs permet el pas del catió d'un extrem a un altre (Toyoshima i Nomura, 2002a).

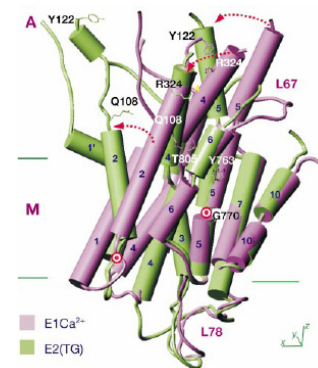


Figura 1.5. Rearranjament de les hèlixs transmembrana en l'ATPasa de Ca^{2+} . El model per l'E1 Ca^{2+} (violeta) i E2(TG) (verd) estan superposats (Toyoshima i Nomura, 2002a).

Un altre punt interessant és que el cristall de LacY no mostra estructura de làmines β , la qual s'espera en l'estructura 3D de la MelB degut als resultats obtinguts mitjançant espectroscòpia d'infraroig (Dave et al., 2000; Dave et al., 2002).

Un dels aspectes més interessants en l'estructura de la LacY és que ens permet observar els aminoàcids involucrats en la unió del sucre. Entre ells trobem que els més interessants per aquest treball són (figura 1.6):

Trp151: Aquest residu es troba en l'hèlix V i deu fer interaccions hifrofòbiques amb el sucre mitjançant el seu anell per tal d'orientar-lo. En el cas de la MelB es va observar que els mutants W299F, W342F i W299F/W342F presenten una afinitat menor pel sucre encara que no impedeixen el transport d'aquest (Mus-Veteau i Leblanc, 1996). En canvi, els mutants W116F i W118F (que es troben en l'hèlix IV) redueixen l'activitat de la MelB (Cordat et al., 2000). En un estudi comparatiu entre varies proteïnes que uneixen galactosa s'observa que totes aquestes proteïnes tenen un residu aromàtic en el lloc d'unió del sucre i proposen que el sucre pot lliscar per sobre d'aquesta cadena lateral per tal d'establir interaccions òptimes amb els altres residus que formen part del lloc d'unió del sucre (Sujatha i Balaji, 2004).

Glu126: De l'estructura es pot deduir que segurament interacciona amb el sucre mitjançant una aigua. En la MelB trobem un Asp a la posició 124 que, encara que aquest residu se suposa que està a prop o forma part del lloc d'unió del catió (Poolman et al., 1996), també podria interaccionar amb el sucre (Zani et al., 1994).

Lys358: Forma un pont d'hidrogen amb el sucre i un pont salí amb l'Asp237. En la MelB trobem que el mutant K377V té el transport de melibiosa reduït (Franco et al., 2001). Però actualment no hi ha res descrit de si forma pont salí amb l'Asp231 (que seria el més proper a l'Asp de la LacY). En canvi a aquesta Lys se li preveu que forma un pont salí amb l'Asp59 i/o amb l'Asp124 (Franco et al., 2001; Hastings Wilson i Wilson, 1998).

Glu269: Aquest residu se suposa que és responsable de l'acoblament entre el lloc d'unió del sucre en el N-term i el lloc de protonació en el C-term. En el cristall es proposa que aquest residu forma un pont salí amb l'Arg144 quan té el substrat unit. Posteriorment, es va proposar que el Glu269 forma un pont d'hidrogen amb el grup NH del Trp151 durant el transport del sucre (Vazquez-Ibar et al., 2004).

Arg144: Aquest residu se situa en l'hèlix V i forma un doble pont d'hidrogen amb els oxígens 3 i 4 del sucre. En la MelB trobem dues Arg en les posicions 141 i 149 que s'ha vist que són importants per a la unió del sucre (Abdel-Dayem et al., 2003; Ambroise et al., 2000). Concretament el mutant R149C no uneix sucre i per tant deu ser el que deu establir aquests ponts d'hidrogen. A més en altres proteïnes que uneixen galactosa (Sujatha i Balaji,

2004) s'ha observat que la presència d'un aminoàcid polar que forma un pont d'hidrogen amb el grup hidroxil O₄ de la galactosa és una característica del lloc d'unió d'aquest sucre. S'ha de tenir en compte que el O₄ de la galactosa és axial, en canvi en la glucosa és equatorial, i per tant és un dels punts més importants per determinar l'especificitat pel sucre.

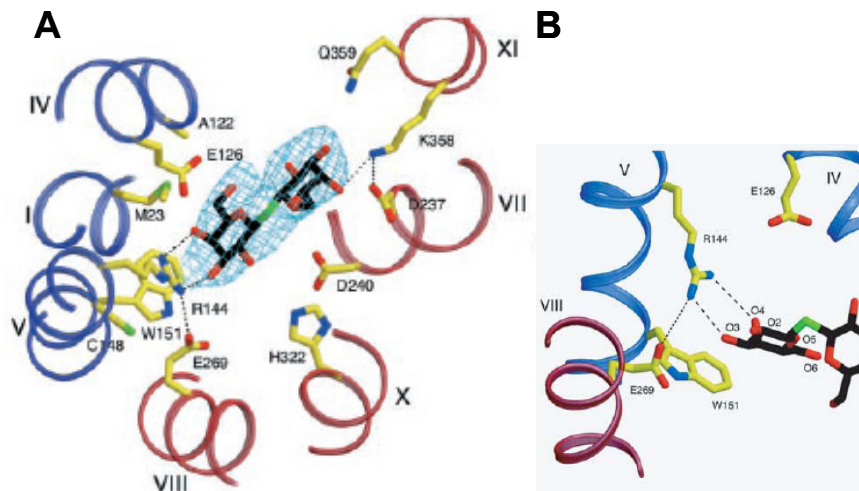


Figura 1.6. Unió del sucre en la permeasa de lactosa.

A. Residus involucrats en la unió del TDG. També es presenta el mapa de densitat electrònica per el TDG. Els possibles punts d'hidrogen i els punts salins estan representats per línies negres discontinües. Les hèlixs en el N- i C-terminal estan pintades de color blau i vermell respectivament. Els colors pels àtoms són: groc, carbonis en les cadenes laterals; negre, carbonis en el TDG; blau, nitrogens; vermell, oxígens; verds sulfurs (Abramson et al., 2003).

B. Proposta de pont d'hidrogen entre el Glu269 i el Trp151 (Vazquez-Ibar et al., 2004).

Finalment encara que no es tingui la conformació *outward-facing* de la permeasa de lactosa, mitjançant els valors obtinguts d'experiments de cross-linking entre les hèlixs es va proposar una estructura 3D per aquest estat (figura 1.6). Això s'aconseguia fent una rotació relativa de $\sim 60^\circ$ entre els dominis N- i C-terminal.

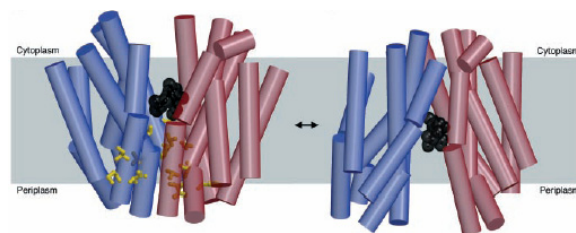


Figura 1.6. Conformacions *inward-facing* (esquerra) i *outward-facing* (dreta) de la permeasa de lactosa.

Les hèlixs transmembrana en els dominis N- i C-terminal estan presentades en blau i vermell, respectivament. Els mutants de Cys en groc presenten una major reactivitat amb el NEM degut a la unió del substrat (Abramson et al., 2003).

1.2.2. Estructures 3D de transportadors que uneixen Na^+

Un altre substrat que uneix la proteïna estudiada en aquest treball és el Na^+ . Recentment també s'han resolt les estructures 3D de dos transportadors de membrana de 12 hèlixs α que transporten Na^+ (figura 1.7).

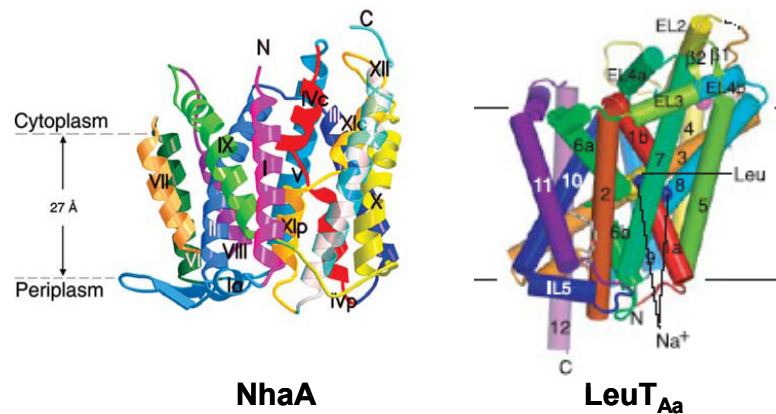


Figura 1.7. Estructures 3D del transportador antiport Na^+/H^+ (NhaA) (Hunte et al., 2005) i del transportador de Leucina depenent de Na^+/Cl^- (LeuT_{aA}) (Yamashita et al., 2005).

El primer d'ells és el transportador antiport Na^+/H^+ (resolució de 3,45 Å) (Hunte et al., 2005). El problema és que el Na^+ no està resolt en aquesta estructura, però hi ha una sèrie d'aminoàcids que es proposen que formen part del camí que segueix el Na^+ (o Li^+). Entre aquests aminoàcids trobem Glu i Asp. Un altre cop es pot observar com algunes hèlixs estan molt corbades i presenten colzes, fet que li proporcionarà flexibilitat estructural per assumir diferents conformacions. Finalment el llaç I-II té una part d'estructura de làmina β .

L'altre transportador comentat és el transportador de Leucina depenent de Na^+/Cl^- (LeuT_{aA}) (resolució 1,65 Å) (Yamashita et al., 2005). Aquest transportador pertany a la família dels transportadors de neurotransmissors que es troben dintre

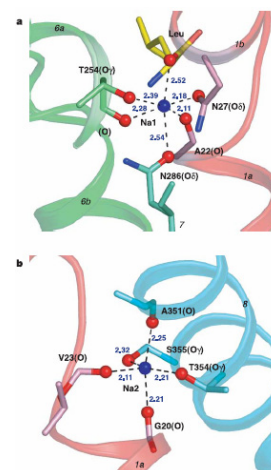


Figura 1.8. Llocs d'unió del sodi en el transportador de Leucina depenent de Na^+/Cl^- .

A. Es mostra el Na1 els residus de TM1a, TM1b, TM6a i TM7 junt amb la Leucina unida.

B. Es mostra el Na2 i els residus de TM1a i TM8.

Les distàncies (Å) estan en lletres blaves (Yamashita et al., 2005).

de la superfamília dels transportadors simports Na^+ /solut (Reizer et al., 1994) a la qual també pertany la MeIB. En el seu cristall es tornen a observar 12 hèlixs transmembrana, dues d'elles amb discontinuitats que corresponen a unes estructures més extenses. Els dos Na^+ (Na1 i Na2) que uneix la proteïna es troben a prop d'aquestes estructures extenses. El primer Na^+ es troba unit amb una coordinació octaèdrica (figura 1.8). Els aminoàcids involucrats són molt variats i no només hi participen les cadenes laterals si no que també hi participen el carboxil de la leucina i els carbonils de l'Ala22 i la Thr254. El segon Na^+ té una coordinació bipiramidal triangular (figura 1.8). És curiós que l'únic lligant portant una càrrega sencera sigui l'oxigen del grup carboxílic de la Leucina.

Les estructures de proteïnes que uneixen Na^+ mostren que els ions petits són fixats per àtoms d'oxígens que provenen de molècules d'aigua, dels carbonils de l'enllaç peptídic i de grups carboxils i hidroxils amb una mitjana de coordinació d'entre 5 i 6 (Glusker, 1991; Harding, 2004).

1.3. El transportador de melibiosa (MelB)

La MelB és un transportador simport de membrana d'*Escherichia coli* que catalitza l'acumulació d' - o -galactòsids dins el citoplasma bacterià mitjançant un gradient transmembrana d' H^+ , Na^+ o Li^+ , cations que actuen com a co-transportadors. Aquests ions competeixen pel mateix lloc d'unió i augmenten l'afinitat del sucre co-transportat, essent el Na^+ i el Li^+ millors activadors que l' H^+ (Bassilana et al., 1988; Damiano-Forano et al., 1986). És una proteïna molt hidrofòbica (70% dels residus són apolars) de 473 amino àcids i està codificada pel gen *melB* (Yazyu et al., 1984). Estudis immunològics (Botfield i Wilson, 1989; Pourcher et al., 1996), de fusió de *melB-phoA* (Botfield et al., 1992; Pourcher et al., 1996), de proteòlisi (Gwizdek et al., 1997) i FTIR (Dave et al., 2000), prediuen un model topològic de 12 hèlixs transmembrana amb el costat N- i C-terminal a la cara citoplasmàtica (figura 1.11). A més a

Periplasma

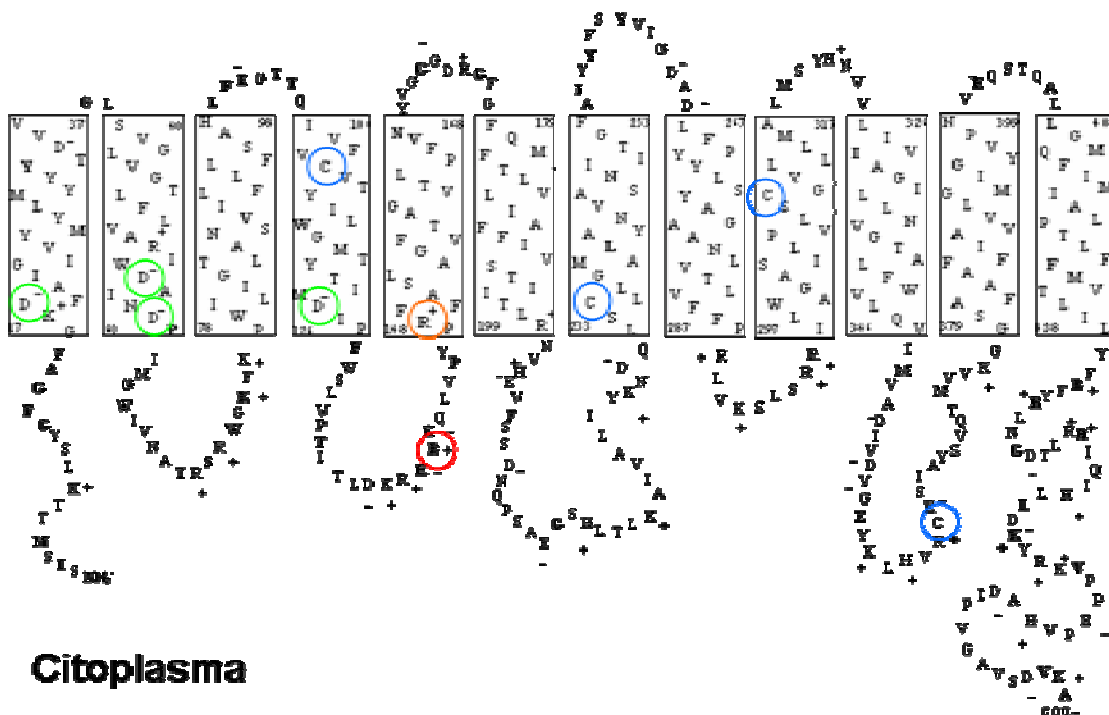


Figura 1.11. Model d'estructura secundària de la MelB proposat per Pourcher et al. (1996).

Les hèlixs transmembrana estan representades amb rectangles. En blau, les 4 Cys natives de la MelB. En verd, els 4 Asp que es proposa que formen el lloc d'unió dels cations. En taronja, l'Arg149 i en vermell, l'Arg141 importants per a la unió i translocació, respectivament, de la melibiosa.

més, cristalls bidimensionals de la MelB (Hacksell et al., 2002) i l'estructura de proteïnes de famílies pròximes com la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003) corroboren aquesta predicció. Estudis de foto-marcatge (Ambroise et al., 2000) i de mutagènesis conjuntament amb fluorescència (Cordat et al., 2000) remarquen la importància del domini hèlix IV/llaç 4-5/hèlix V per a la funció de transport de la MelB. A més, varis residus acídics i polars de les hèlixs I, II i IV semblen jugar un paper molt important en el reconeixement de l'ió (Hama i Wilson, 1993; Pourcher et al., 1993; Wilson i Wilson, 1992). També hi ha evidències que les hèlixs del costat C-terminal delimiten el lloc d'unió del sucre (Cordat et al., 1998; Ding et al., 2000; Mus-Veteau i Leblanc, 1996). Una altra propietat estructural és la modificació cooperativa de l'estructura de la MelB per efecte de l'ió o del sucre mesurat per mètodes espectroscòpics com l'infraroig i la fluorescència i mètodes bioquímics (Dave et al., 2000; Dave et al., 2002; Gwizdek et al., 1997; Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau i Leblanc, 1996).

1.3.1. Funció de la MelB

Tsuchiya i Wilson (1978) van ser els primers en demostrar, mitjançant elèctrodes específics per a cada catió, que la MelB podia co-transportar tant amb H^+ , Na^+ com amb Li^+ . Posteriorment Wilson i Wilson (1987) van observar que la selectivitat pel catió variava depenent si el galactòsid transportat era α o β . La MelB pot transportar una gran varietat de β -galactòsids com la lactosa (4-O- β -galactopiranosil-D-glucosa), l'arabinosa (L-arabinosa- β -D-galactòsid), la fructosa (D-fructosa- β -D-galactòsid) i el TMG (o- i p- nitrofenil- β -D-galactòsid) juntament amb el catió Na^+ o Li^+ . Per altra banda, els α -galactòsids com la melibiosa (6-O- α -galactopiranosil-D-glucosa), raffinosa (O- α -D-galactopiranosil-(1-6)- α -galactopiranosil- β -D-fructofuranòsid) i el α -NPG fan servir qualsevol dels tres cations, H^+ , Na^+ o Li^+ (Wilson i Wilson, 1987). El Na^+ , igual que el Li^+ , augmenta l'afinitat del transportador pel sucre α -NPG passant d'una K_d de $15\mu M$ (H^+) a $0,7\mu M$ (Na^+). Per tant, això fa que el Na^+ sigui millor activador de la unió del sucre que l' H^+ (Damiano-Forano et al., 1986). A més, degut a que els H^+ inhibeix la unió de Na^+ , els dos cations deuen competir pel mateix lloc d'unió (Damiano-Forano et al., 1986).

Bassilana et al. (1987 i 1988) van estudiar el transport de la melibiosa i el seus co-substrats en membranes sense energia. Per estudiar les diferents característiques del transport dels substrats es va mesurar en vesícules RSO (*right side out*, que correspondria a l'orientació fisiològica) l'*influx* (entrada del sucre en la vesícula), l'*efflux* (sortida del sucre), l'*exchange* (sortida del sucre degut a l'intercanvi amb un sucre exterior) i finalment el *counterflow* (entrada del sucre degut a l'intercanvi amb un sucre de l'interior). Es va veure que l'influx de la melibiosa en presència de Na^+ o Li^+ és molt petit. L'efflux de melibiosa en presència d' H^+ és el doble que l'exchange i en canvi, en presència de Na^+ són similars. Finalment, en presència de Li^+ hi ha efflux però no s'observa exchange.

Comparant l'efflux amb l'influx es va poder concloure que el primer, tant en presència d' H^+ , Na^+ o Li^+ , és entre 10 i 40 cops més ràpid que el segon. Per tant, es podia deduir que la permeasa funciona asimètricament. En el counterflow, l'acumulació de melibiosa és uns 20 cops major que en l'influx en presència de Na^+ i augmenta en presència d' H^+ . En canvi, en presència de Li^+ no hi ha counterflow.

Amb tots els resultats anteriors es va proposar un transport de substrats dividit en 6 etapes (figura 1.12), on el pas limitant del transport és l'alliberament del catió i que al mateix temps aquest alliberament depèn del catió i del sucre que estiguin format el complex terciari. Per tant, les diferències en el transport de melibiosa, en presència dels diferents substrats, vindran donades per l'estabilitat que formin el complex terciari, on l'ordre d'estabilitat seria $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+$ (Pourcher et al., 1990). Aquest mecanisme permet l'intercanvi de melibiosa entre el medi exterior i interior sense la necessitat d'alliberar el catió (exchange i counterflow).

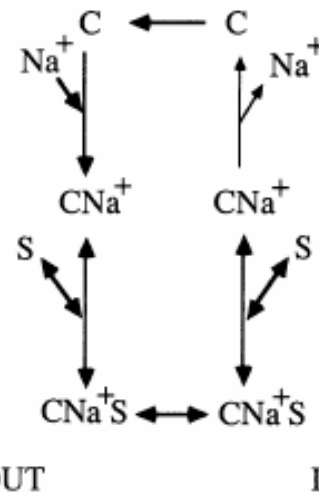


Figura 1.12. Model de transport dels substrats de la MelB en sis estats. C correspon a la MelB i S al sucre. (Bassilana et al., 1988)

A més a més de tots aquests estudis de transport de melibiosa, també es va mesurar el transport de Na^+ , trobant que l'estequiometria del transport catió/melibiosa és 1 a 1 (Bassilana et al., 1987).

Però hi havia un altre factor que podia modificar les propietats cinètiques del transport de la MelB. Estudis tant en cèl·lules com en vesícules RSO van mostrar que el potencial elèctric transmembrana ($\Delta\Psi$) incrementa l'influx de sucre (Bassilana et al., 1985; Cohn i Kaback, 1980; Lopilato et al., 1978). Aquesta activació de l'influx pel $\Delta\Psi$ ve determinada pel catió co-transportador. L'augment del $\Delta\Psi$ implica una velocitat més gran en l'influx en presència de Na^+ o Li^+ respecte el transport sense energia, sent aquest últim catió el que té un increment menor en la velocitat d'influx. En canvi, l' H^+ té una velocitat d'influx elevada en el transport sense energia, i la presència del $\Delta\Psi$ només incrementa lleugerament aquesta velocitat. Tenint en compte que l'estabilitat del complex terciari depèn del catió co-transportador, la funció principal del $\Delta\Psi$ seria la de disminuir l'estabilitat del complex terciari encarat cap al citoplasma.

Cal dir que els resultats del treball presentat corresponen a la MelB reconstituïda en liposomes. Aquesta MelB consta d'una cua d'His que permet, mitjançant una columna de bescanvi iònic, obtenir la permeasa en gran puresa (Pourcher et al., 1995). La MelB amb la cua d'His i reconstituïda en lípids d'*E. coli* catalitza la unió i el transport actiu de melibiosa depenent d' H^+ , Na^+ o Li^+ , amb característiques similars a les observades pel WT en vesícules i sense la cua d'His (Pourcher et al., 1995).

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

Mutacions i localització	Efecte funcional i/o estructural	Refències
P146S (llaç 4-5 molt proper a hèlix V), L236F i A240V (hèlix VII)	Diferents regions pels cations. Una per Na ⁺ i una altra per H ⁺ i Li ⁺ .	Kawakami et al., 1998
H94	Estabilitat a la membrana	Pourcher et al., 1992
D19C (hèlix I), D55C i D59C (hèlix II) i D124C (hèlix IV)	Pèrdua capacitat de transport amb el catió Na ⁺ . Alteració de les propietats de selecció catiònica.	Pourcher et al., 1991 Pourcher et al., 1993 Zani et al., 1993 i 1994 Poolman et al., 1996 Ding i Wilson, 2001
W116 (hèlix IV) i W128 (llaç 4-5)	Pèrdua de funció.	Cordat et al., 2000
C364 (llaç 10-11)	Lloc d'unió del NEM.	Weissborn et al., 1997
Cys-less	No té cap efecte sobre el funcionament.	Weissborn et al., 1997
R52V, R52Q i R52V (hèlix II)	No uneix H ⁺ i es redueix dràsticament el transport amb Na ⁺ . Important per a l'acoblament catió-sucre.	Franco i Wilson, 1999
R141C i E142C (llaç 4-5)	Uneixen substrats però no els transporta.	Abdel-Dayem et al., 2003 Séry, 2002
R149C (llaç 4-5-hèlix V)	Ni uneix ni transporta substrats.	Abdel-Dayem et al., 2003
R141K (llaç 4-5)	Conserva el transport.	Abdel-Dayem et al., 2003
N58 (hèlix II)	Important per unió de Na ⁺ .	Franco i Wilson, 1996 Hama i Wilson, 1996
Y28F (hèlix I), N87A (hèlix II) i Y120F (hèlix IV)	Menor afinitat pel Na ⁺ i pel sucre. Canvi en l'especificitat pel sucre.	Zani et al., 1994
K377C (llaç 10-11)	No acumula melibiosa.	Séry, 2002
D59K/K377D (hèlix II i llaç 10-11)	Acumula en presència d'H ⁺ però no en presència de Na ⁺ ni de Li ⁺ .	Franco et al., 2001
Y120, D124, M123 i P126 (hèlix IV)	Importants a l'hora de connectar el lloc d'unió del catió i del sucre.	Zani et al., 1994 Botfield i Wilson, 1988 Yazyu et al., 1985
E357C (llaç 10-11)	Inestabilitat de la proteïna dins la membrana. Canvi en l'especificitat pel sucre.	Séry, 2002
D354C (llaç 10-11)	Modifica l'eficiència de l'acoblament ió-sucre.	Séry, 2002 Ding, 2003
D351C (llaç 10-11)	No acumula sucre.	Séry, 2002
R363C (llaç 10-11)	Implicat en l'etapa de translocació dels substrats.	Séry, 2002 Ding, 2003
D35C	Pèrdua capacitat de transport amb el catió Na ⁺ .	Pourcher et al., 1993

1.3.2. El transport i els senyals elèctrics

L'activitat electrogènica durant el transport de la MelB ha estat mesurada mitjançant la tècnica SSM (solid supported membrane) (Ganea et al., 2001; Meyer-Lipp et al., 2004; Meyer-Lipp, 2005). Es va observar que en afegir Na^+ o Li^+ hi havia una resposta transitòria elèctrica ràpida d'uns 15 ms, que deu correspondre a la unió dels cations. En condicions on s'afegeix melibiosa en presència de Na^+ o Li^+ s'obtenen dues respostes transitòries, una de ràpida (≈ 15 ms) que deu reflectir la transferència de càrregues en la MelB durant la unió dels substrats i una de lenta (≈ 350 ms) que deu correspondre a la transferència de càrregues a través de la membrana durant la translocació dels substrats. En cas de no haver-hi ni Na^+ ni Li^+ (és a dir, en presència d' H^+) l'addició de melibiosa dóna lloc un altre cop a dues respostes, però ara la primera és més lenta (≈ 100 ms) i fa que la resposta total s'alenteixi. És important remarcar que amb aquestes mesures es van poder donar les primeres evidències de l'efecte cooperatiu de la unió de sucre sobre la unió de Na^+ , degut a que en presència de sucre la MelB té una afinitat més gran pel catió (Ganea et al., 2001).

En aquests experiments és curiós observar com una molècula sense càrrega, com és el cas de la melibiosa, dóna lloc a un senyal elèctric. El senyal ràpid no és degut ni a la unió de més cations, provocat per la presència de melibiosa, ni a un desplaçament del Na^+ (Meyer-Lipp et al., 2004). Per tant, aquest senyal ràpid deu correspondre a canvis conformacionals de la proteïna degut a la unió dels substrats (figura 1.13). En la resposta transitòria obtinguda en afegir els dos substrats alhora $\Delta\text{mel}\Delta\text{Na}^+$, el Na^+ contribueix un 40% en el senyal i la melibiosa un 60% (Meyer-Lipp et al., 2004).

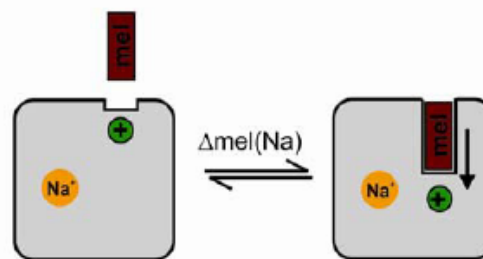


Figura 1.13. Esquema del desplaçament de càrregues degut a la unió de melibiosa (Meyer-Lipp et al., 2004).

1.3.3. El transport i els canvis de fluorescència

També s'han realitzat mesures al llarg dels temps dels canvis en el senyal d'emissió dels Trp mitjançant espectroscòpia de fluorescència resolta en el temps (Meyer-Lipp, 2005). L'addició de melibiosa en presència de Na^+ ($\Delta\text{mel}(\text{Na}^+)$) dona lloc a un augment del senyal de fluorescència que pot ser dividit en dues etapes. Una primera amb una constant de temps ràpida i una segona amb una de més lenta. Aquests valors són del mateix ordre que els observats amb la tècnica de SSM i per tant, es dedueix que els canvis conformacionals que indueixen aquests senyals deuen ser els mateixos.

A més, seguint els canvis del senyal d'un sucre fluorescent es van poder observar canvis conformacionals ràpids (amb una constant de temps de $\sim 55 \text{ s}^{-1}$) en el lloc d'unió del sucre o en la seva proximitat deguts a la unió de Na^+ (Meyer-Lipp, 2005).

Es van poder estudiar les etapes del transport mitjançant el seguiment del senyal d'una sonda fluorescent (MIANS) col·locada en el llaç 10-11. Es va trobar que, apart del procés ràpid (unió) i lent (translocació) observat tant amb SSM com amb la fluorescència, hi ha un altre procés lent, en aquest cas electroneutre, amb una constant de temps de 20 s^{-1} . Aquest procés intermediari deu correspondre a la reorientació de la permeasa amb els substrats units (Meyer-Lipp, 2005).

A partir de totes aquestes dades, les de la secció anterior i d'altres obtingudes dels mutants que es comentaran més endavant en les seves respectives seccions, es va proposar un model de transport (figura 1.14) que ampliava el model de 6 estats proposat anteriorment per Bassilana et al. (1988) (figura 1.12).

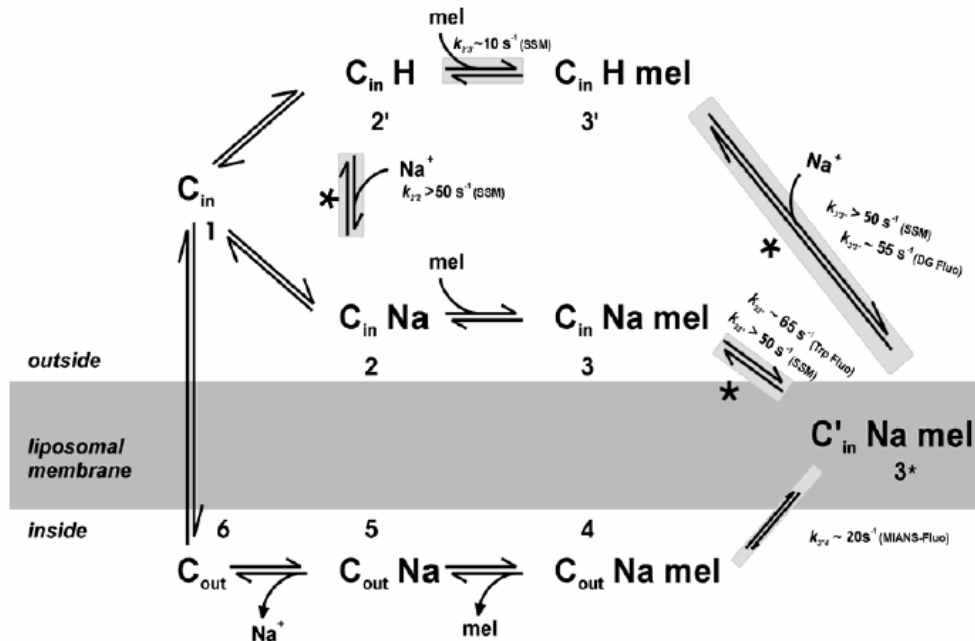


Figura 1.14. Extensió del model de transport de 6 estats per l'eflux del transportador MelB.

L'estat 1 (C_{in}) correspon a la permeasa sense substrats amb el seu espai citoplasmàtic encarat cap a l'exterior del proteoliposoma. La unió de Na^+ i melibiosa són seqüencials, primer unint-se el Na^+ i després la melibiosa (estats $1 \leftrightarrow 2 \leftrightarrow 3$). Alternativament, el Na^+ es pot substituir per un H^+ (estats $1 \leftrightarrow 2' \leftrightarrow 3'$). Com es suggereix, hi ha un pas extra ($3 \leftrightarrow 3^*$) abans de la reorientació del transportador ($3^* \leftrightarrow 4$) que correspon als canvis conformacionals electrogènics observats després de la unió de melibiosa. Després de l'alliberament de la melibiosa ($4 \leftrightarrow 5$) i del Na^+ ($5 \leftrightarrow 6$) en el compartiment interior del liposoma, el cicle de la MelB acaba amb la tornada del transportador buit cap al medi extern ($6 \leftrightarrow 1$). Els asteriscs indiquen reaccions que es van veure que eren electrogèniques. Aquestes tenen les seves respectives constants k determinades a partir del mètode SSM. Les transicions implicades en canvis conformacionals estan marcades en gris. Entre parèntesi s'indica amb quin mètode es van obtenir les constants. Fluo: fluorescència; DG: DNs²-S-Gal fluorescència (Meyer-Lipp, 2005).

1.3.4. Lloc d'unió dels cations

Un cop s'han identificats els substrats de la proteïna el següent pas és esbrinar el lloc d'unió d'aquests substrats. A l'hora de fer això, una de les tècniques més potents és la mutagènesi dirigida, que permet deduir quins aminoàcids són essencials per a la unió dels substrats. No obstant, altres tècniques com la fluorescència i la comparació amb permeases d'altres organismes han permès també obtenir informació d'aquests llocs d'unió.

Leblanc i col·laboradors van mostrar que la MelB amb mutacions per separat dels Asp55 (hèlix II), Asp59 (hèlix II) i Asp 124 (hèlix IV) a Cys no acumula sucre catalitzat per la unió de Na^+ . En canvi, els mutants continuen

tenint l'habilitat d'unir α -NPG però independentment de Na^+ . A més, molts d'aquests mutants també perden l'habilitat d'acumular melibiosa amb el co-transport d' H^+ (Pourcher et al., 1991; Pourcher et al., 1993; Zani et al., 1993). El mateix efecte sobre la unió de Na^+ i de melibiosa s'observa en l'Asp19 (hèlix I) (Poolman et al., 1996). Cal dir que la substitució d'aquestes càrregues negatives d'Asp per altres de Glu o de reactius sulfídrics carregats negativament no retornen completament l'activitat del WT i per tant, no només la càrrega és important si no que també ho és la disposició de les cadenes laterals (Ding i Wilson, 2001b; Zani et al., 1994).

La suposició inicial de que l'Asp35 formava part del lloc d'unió dels cations (Pourcher et al., 1993) va ser refusada més tard (Poolman et al., 1996). La substitució del Glu101 (llaç 3-4), que es troba pròxim al lloc d'unió proposat pel catió, per una Gln no ocasiona cap canvi en el transport (Wilson i Wilson, 1992). Per tant, amb concordança amb el lloc d'unió (figura 1.15), aquests aminoàcids estan fora de la xarxa d'interaccions amb el catió.

Es va obtenir més informació sobre els aminoàcids involucrats en la unió dels cations mitjançant quimeres de MelB entre dos organismes diferents (Hama i Wilson, 1993), on es va poder observar que l'extrem N-terminal és essencial per l'especificitat pel Na^+ . Posteriorment, mitjançant mutagènesi dirigida es va demostrar que l'Asn58 és important per la unió de Na^+ (Franco i Wilson, 1996; Hama i Wilson, 1994). És important remarcar que només els transportadors de la família dels GPH que tenen una Asn a la posició 58 poden fer servir Na^+ a l'hora del co-transport (Poolman i Konings, 1993; Poolman et al., 1996).

A més dels Asp de les hèlixs transmembrana de l'extrem N-terminal, Zani et al. (1994) van estudiar els residus polars que es troben al voltant d'aquests Asp, i van observar que els mutants Y28F, N87A i Y120F tenen una afinitat menor pel Na^+ i pel sucre. A més de la disminució de l'afinitat pel sucre, també hi ha una variació en l'especificitat d'aquest. En canvi, aquests mutants mantenen la mateixa especificitat pels cations respecte la MelB salvatge. A més, l'Arg52 és important per l'acoblament entre el lloc d'unió del Na^+ i el sucre (Franco i Wilson, 1999).

La localització de tots aquests aminoàcids involucrats en la unió dels cations està amb concordança amb el fet que els canvis de fluorescència

deguts a la unió de Na^+ el produeixin els Trp que es troben localitzats en el N-terminal (Cordat et al., 2000; Mus-Veteau i Leblanc, 1996).

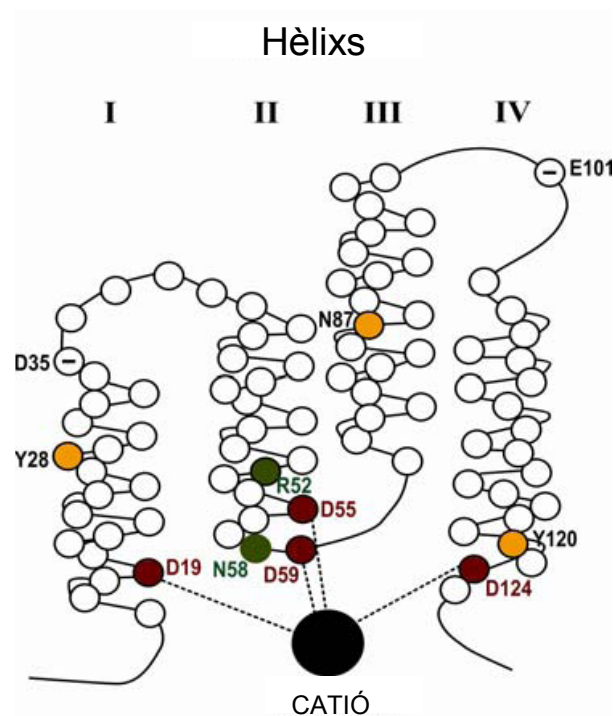


Figura 1.15. Possible lloc d'unió dels cations.

L'Asp19 (hèlix I), Asp55 i 59 (hèlix II) i Asp124 (hèlix IV) es suposa que formen un lloc de coordinació pels cations (en vermell). L'Asn58 i l'Arg52 són importants per a la unió de Na^+ (en verd). Els aminoàcids polars que es consideren importants per l'estructura es mostren en groc (Poolman et al., 1996).

Tots aquests resultats van fer que es proposés un lloc d'unió comú per a tots els cations, format principalment pels Asp19, 55, 59 i 124 (Poolman et al., 1996), on l'Asn58 seria necessària per a la coordinació del Na^+ . Aquesta hipòtesi està refermada per la relació existent entre el radi iònic del Na^+ i el Li^+ (0,95 i 0,65 Å, respectivament (Glusker, 1991; Hille, 1990) i la longitud de l'enllaç O-H del H_3O^+ (0,90 Å (Behr et al., 1982)), que seria coherent amb el fet que en Na^+ , Li^+ i el H_3O^+ s'uneixen al mateix lloc d'unió. Aquest lloc d'unió tindria un número diferent d'àtoms coordinant depenent del cation. A favor d'aquesta hipòtesi hi ha el fet que la mutació de l'Asp19, 59 o 124 a Cys fa perdre l'acoblament entre el transport del sucre i el de Na^+ o H^+ . En canvi, una mutació neutra en l'Asp55 provoca un transport sense dependre de Na^+ , però si d' H^+ (Pourcher et al., 1993). Juntament amb això, també està a favor d'aquesta hipòtesi el fet de que es necessiti una Asn en la posició 58 per unir Na^+ (veure paràgrafs anteriors).

1.3.5. Lloc d'unió del sucre

Un esquema general per a la interacció entre proteïnes i carbohidrats es va obtenir a partir de les estructures cristal·lines de proteïnes d'*E. coli* que uneixen arabinosa, maltosa i galactosa (Quiocho, 1986, 1988). Un cop el sucre s'uneix a la proteïna canvia les seves aigües de solvatació per ponts d'hidrogen amb residus polars com Asn, Gln, Glu i Asp. Per altra banda, també són importants les interaccions hidrofòbiques amb residus aromàtics. Els grups hidroxils poden actuar simultàniament com a donadors i acceptors de ponts d'hidrogen.

Recentment s'ha obtingut l'estructura 3D de la permeasa de lactosa amb un sucre unit (Abramson et al., 2003) (veure secció 1.2.1). En aquesta estructura es proposen varies interaccions entre les cadenes laterals i el sucre que consisteixen bàsicament en ponts d'hidrògens entre Arg i Lys i el sucre. A més, es proposa la interacció hidrofòbica amb la cadena lateral d'un Trp. Finalment, alguns dels aminoàcids que interaccionen amb el sucre també formen ponts d'hidrogen amb Asp i Glu. És interessant remarcar que en la proposta d'interaccions de les cadenes laterals amb el sucre hi intervenen 7 hèlixs diferents, 3 del cantó N-terminal (I, IV, V) i 4 del cantó C-terminal (VII, VIII, X i XI).

Mitjançant espectroscòpia de fluorescència i mutants es va proposar, com s'ha comentat abans, un lloc d'unió pel sucre i pel catió en la MelB. Es va arribar a la conclusió que el lloc d'unió del sucre es troba en el C-terminal, concretament a prop de les hèlixs X i XI i que el N-terminal també contribueix en aquesta unió (Mus-Veteau i Leblanc, 1996). A continuació es va veure que els Trp responsables de la transferència d'energia de fluorescència són els Trp64 (llaç 2-3, N-terminal) i Trp299 (hèlix IX, C-terminal), i es va poder calcular que la distància entre el sucre fluorescent i els Trp64 i 299 és de 20 i 14 Å respectivament (Cordat et al., 1998). A més, la mutació del Trp342 fa que el sucre es trobi en un entorn molt més hidrofílic i per tant, les hèlixs IX i X deuen estar pròximes o en el lloc d'unió del sucre. Concloïen que el lloc d'unió del sucre està preferentment en el C-terminal i proper al llaç 2-3 (Cordat et al., 1998).

Amb el foto-marcatge de la MelB amb el sucre p-azidofenil- α -D-galactopiranosid es va veure que el sucre s'uneix a les hèlixs X, XI i al llaç 4-5.

L'únic aminoàcid marcat d'aquest llaç va ser l'Arg141 (Ambroise et al., 2000). Estudis del transport del mutant R141C van ensenyar que aquesta permeasa no acumula melibiosa però sí que l'uneix i a més depenent de Na^+ . El mutant R149C no pot unir melibiosa (Ambroise et al., 2000) i per tant deu correspondre a l'Arg144 de la permeasa de lactosa.

Ding et al. (2000) van proposar varis aminoàcids que deuen trobar-se a prop del lloc d'unió del sucre i que les hèlixs I, IV, VII, X i XI es troben pròximes. Això està amb concordança amb el número d'hèlixs que s'han observat que intervenen el lloc d'unió del sucre en la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003).

1.3.6. Connexió del lloc d'unió del catió amb el lloc d'unió del sucre

En molts d'aquests estudis que s'anaven fent per esbrinar el lloc d'unió del sucre, es van anar trobant indicis que el lloc d'unió del sucre i del catió estan pròxims. La mutació en l'Arg52 va donar lloc a una disminució en el transport de la melibiosa acoblat a Na^+ i una absència de transport acoblat a H^+ , i per tant es va proposar com un aminoàcid clau a l'hora de connectar el lloc d'unió del catió i del sucre (Franco i Wilson, 1999). A més, altres mutants del llaç 10-11 presentaven canvis en l'afinitat pel catió (Ding, 2004). En concret, el doble mutant D59K/K377D (D59 en el lloc d'unió del catió i K377 en la unió entre el llaç 10-11 i l'hèlix XI) acumula melibiosa acoblada a H^+ però no acoblada a Li^+ o Na^+ (Franco et al., 2001).

Cordat et al. (2000) van veure que el senyal de fluorescència induït en l'extrem N-terminal per la unió del sucre prové dels Trp116 i 118. A més, la mutació d'aquests Trp a Phe dóna lloc a una acumulació baixa de β -galactòsids i canvis en la selectivitat pel catió. Per tant, el Trp116, però sobretot el Trp128 tenen una funció important en el co-transport sodi/sucres, on els dos estan involucrats en la selectivitat pel sucre i pel catió. A més d'aquests mutants, s'ha de tenir en compte que l'hèlix IV té altres aminoàcids que s'han vist que són importants a l'hora de connectar el lloc d'unió del catió i del sucre: Tyr 120, Asp124 (Zani et al., 1994), Met123 (Botfield i Wilson, 1988) i Pro126 (Botfield i Wilson, 1988; Yazyu et al., 1985). Conjuntament amb això s'ha de tenir en compte que la protecció de l'hèlix IV (i del llaç 4-5) a la proteòlisi degut a la unió del Na^+ per si sol i de la melibiosa en presència de Na^+ corroboren la predicció

d'aquesta hèlix connectant el lloc d'unió del catió i del sucre (Gwizdek et al., 1997).

1.3.7. Formació de ponts salins entre Asp i Arg/Lys

Els aminoàcids carregats dintre de les hèlixs transmembrana són termodinàmicament desfavorables. Però la formació de parells iònics o ponts salins, amb alguns ponts d'hidrogen addicionals, fa que aquestes càrregues siguin molt estables dintre l'ambient hidrofòbic de les hèlixs transmembrana (Honig i Hubbell, 1984). La formació i trencament d'aquests ponts salins s'ha proposat que deu ser important pel funcionament dels transportadors (Abramson et al., 2003). És important tenir en compte que aquestes interaccions es podran detectar mitjançant l'espectroscòpia d'infraroig, tal com es veurà més endavant.

S'ha proposat que l'Arg52 forma ponts salins amb els Asp19 i Asp55, amb un mecanisme que permetria que l'Arg formés les interaccions amb els dos Asp per separat en diferents estats del transport (Franco i Wilson, 1999). També podrien formar ponts salins la Lys377 amb els Asp124, Asp55 (Ding i Wilson, 2001b; Hastings Wilson i Wilson, 1998) i Asp59 (Ding i Wilson, 2000b; Franco et al., 2001).

1.3.8. Orientació de la MelB reconstituïda en liposomes

El mutant R139C, que mostra propietats semblants al Cys-less (Abdel-Dayem et al., 2003), es va fer servir per determinar l'orientació de la proteïna reconstituïda en els liposomes (Meyer-Lipp, 2005). Fent servir un reactiu de Cys impermeable a la membrana van poder veure que la proteïna es troba orientada ISO (inside-out), que seria l'orientació contrària a la fisiològica. S'ha de recordar en aquest punt que, com ja s'ha vist abans, el sucre es pot unir al transportador tant si aquest està en orientació RSO com si està ISO (Damiano-Forano et al., 1986).

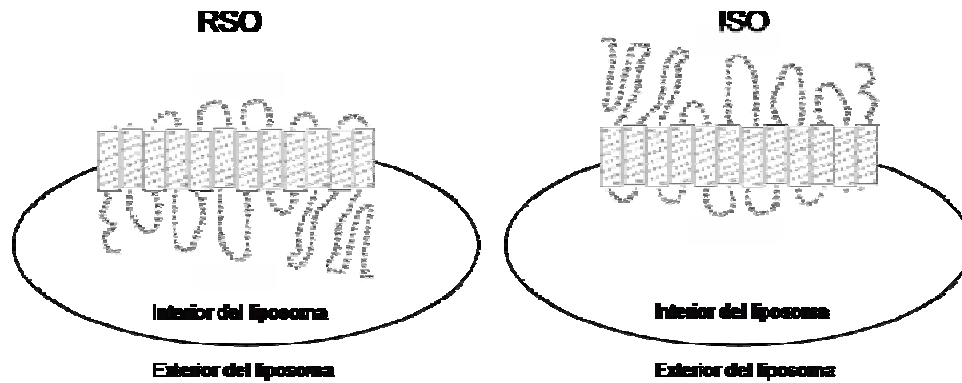


Figura 1.16. Representació de les dues orientacions possibles de la MelB reconstituïda en liposomes. RSO (right-side-out) correspon a l'orientació fisiològica i ISO (inside-out) a la contrària.

1.3.9. Canvis conformacionals induïts per la unió de substrats

Els primers canvis conformacionals de la MelB deguts a la unió dels substrats es van observar mitjançant l'espectroscòpia de fluorescència. L'addició de Na^+ o Li^+ a la suspensió de proteoliposomes dona lloc a una disminució del senyal de fluorescència, en canvi, aquest augmenta en presència de melibiosa (Mus-Veteau et al., 1995). Aquestes variacions de senyals depenen de l'ió que s'uneix a la proteïna i del sucre que es fa servir.

Mitjançant estudis de transferència d'energia de fluorescència (FRET), es va poder veure que el sucre passa d'un ambient hidrofílic a més hidrofòbic a mesura que s'apropa al seu lloc d'unió. L'addició de Na^+ provoca canvis conformacionals a la proteïna que fan que el sucre es col·loqui en un entorn encara més hidrofòbic. A més, aquesta addició també provoca un augment del senyal d'emissió del sucre fluorescent, per tant, havent-hi canvis estructurals en els Trp que fan ressonància amb aquest sucre (Maehrel et al., 1998).

Mitjançant espectroscòpia d'infraroig també s'han observat canvis estructurals de la MelB deguts a la interacció amb els substrats. Bàsicament, s'observaven canvis en els màxims corresponents a les hèlixs (Dave et al., 2000) i canvis en el bescanvi H/D global i en les diferents estructures secundàries (Dave et al., 2002). Aquests experiments, conjuntament amb d'altres relacionats, es comentaran més extensament en la secció 1.3.16.

Finalment es va proposar que hi havia canvis conformacionals en el llaç 4-5 en afegir els substrats, degut a la protecció que sofria aquest llaç en front a

les proteases en afegir Na^+ i melibiosa (Gwizdek et al., 1997; Meyer-Lipp, 2005).

1.3.10. Estructura de la MelB

Al no disposar encara de l'estructura 3D, s'han anat fent propostes sobre l'organització de les hèlixs transmembrana al llarg de l'estudi de la MelB (veure figura 1.17). Per tal de fer aquestes propostes, s'han fet servir mutants d'aminoàcids que es suposa que formen el lloc d'unió del sucre i per tant, que es troben pròxims en l'espai (Ding et al., 2000), mutacions compensatives (mutants amb dobles mutacions: la primera mutació causa una pèrdua important d'activitat, però una segona mutació en un lloc diferent compensa parcialment o totalment la pèrdua d'activitat) (Wilson et al., 1995) i substitució de residus per Cys per tal de reaccionar-les amb reactius sulfídrics o entrecreuar-les amb altres Cys (Ding i Wilson, 2000a, b).

El resultat que s'han anat obtenint han sigut:

L'hèlix II estaria a prop de les hèlixs IV, VII i X (Franco i Wilson, 1999), l'hèlix I del llaç 10-11 (Ding, 2004), l'hèlix II de l'hèlix IV (Wilson et al., 1995), l'hèlix IV de l'hèlix XI (Hastings Wilson i Wilson, 1998), l'hèlix II de l'hèlix XI (Franco et al., 2001), l'hèlix I de l'hèlix XI (Ding i Wilson, 2001a) i finalment les hèlixs I, II, V i XI estarien pròximes (Ding i Wilson, 2001c), igual que les hèlixs I, IV, VII, X i XI (Ding et al., 2000).

A més, també s'han realitzat mutacions sistemàtiques a Cys dels residus d'algunes de les hèlixs transmembrana. Aquestes Cys s'han intentat reaccionar amb reactius sulfídrics per tal de veure la seva accessibilitat al medi aquós. Amb aquests experiments es va veure que l'hèlix I es troba totalment exposada al medi aquós (Ding i Wilson, 2001c), les hèlixs II i XI es troben exposades un 35% (Ding, 2003) i en canvi l'hèlix VI no mostra accessibilitat al medi aquós i per tant es proposa que es troba inserida en la membrana lipídica (Ding et al., 2001).

Encara que no s'hagi fet una assignació de les hèlixs transmembrana a la projecció 2D (Hacksell et al., 2002) és possible que l'hèlix I de la figura 1.17H correspongui a l'hèlix I de la figura 1.17J, ja que, com s'ha comentat abans, aquesta hèlix està totalment exposada al medi aquós (Ding i Wilson, 2001c). És interessant observar que en la família de les MFS les hèlixs menys

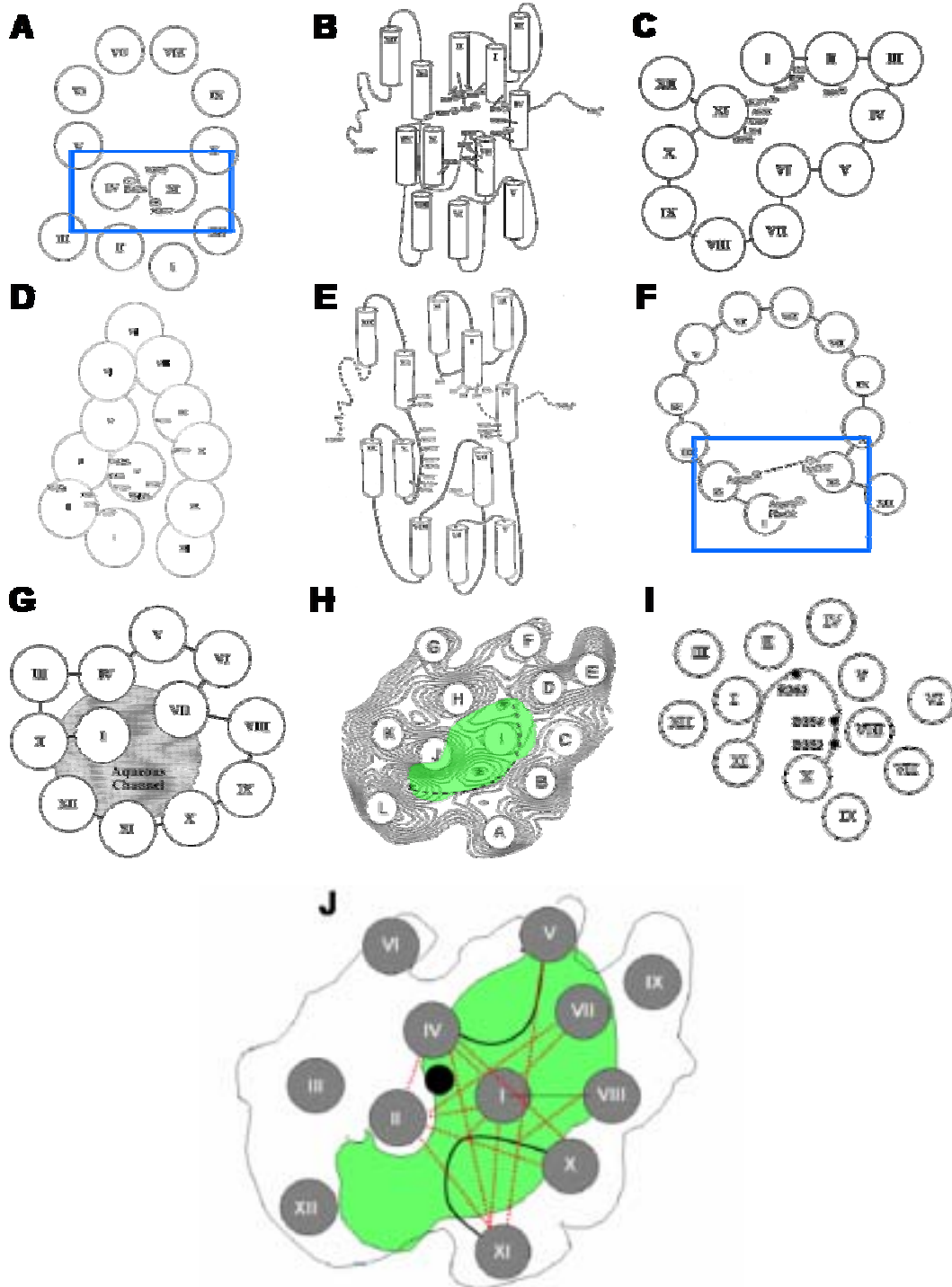


Figura 1.17. Evolució de la proposta de la disposició de les hèlixs transmembrana.

A, Hastings Wilson i Wilson (1998). En el requadre blau es marquen les hèlixs d'interès. B, Franco i Wilson (1999). C, Ding i Wilson (2000b). D, Cordat et al. (2000). E, Ding et al. (2000). F, Franco et al. (2001). En el requadre blau es marquen les hèlixs d'interès. G, Ding i Wilson (2001c). H, Hacksell et al. (2002). I, Ding (2003). J, Aquesta distribució es va treure a partir de les dades en la bibliografia. Les línies discontinües vermelles indiquen proximitat entre hèlixs. Elsllaços 4-5 i 10-11, que es suposa que són importants per a la funció de la MelB, estan dibuixats en negre. El cercle negre indica el lloc d'unió del Na⁺ (Gérard Leblanc, resultats no publicats).

conservades són la III, VI, IX i la XII. Aquestes hèlixs es troben a la perifèria de la molècula, encarades cap a la membrana lipídica (Goswitz i Brooker, 1995). És possible que en el cas de la MelB passi el mateix amb les hèlixs E, J, K i L (figura 1.17H). En el cas de l'hèlix VI ja s'ha observat que no és accessible al solvent, i en el cas de les hèlixs III i XII, encara no s'ha trobat cap implicació d'aquestes hèlixs en la funció de la MelB, com per exemple, la unió dels seus substrats. Amb totes aquestes dades es va fer una aproximació sobre l'organització de les hèlixs transmembrana (veure figura 1.17J).

Sobre aquesta aproximació s'ha de tenir en compte que la projecció en 2D representa la disposició de les hèlixs en una alçada del transportador. Com s'ha vist en estructures 3D dels transportadors de la família MFS (Abramson et al., 2003), i com també s'ha proposat pels cristalls 2D de la MelB (Hacksell et al., 2002), aquestes hèlixs tenen una inclinació. Per tant, la disposició de les hèlixs vistes des de l'extrem citoplasmàtic pot ser diferent a l'extrem periplasmàtic.

Com exemples, en la figura 1.18, es pot veure com la disposició de les hèlixs transmembrana de l'estructura 3D de la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003) no és la mateixa vista des de l'espai citoplasmàtic que des de l'espai periplasmàtic. En el cas de la MelB, les projeccions a la mateixa alçada de dos transportadors encarats al revés són diferents (Purhonen et al., 2005),

indicant una disposició diferent de les hèlixs degut a la inclinació d'aquestes. Aquest fet pot explicar perquè en l'assignació de la figura 1.17J es col·loquen les hèlixs XI i V tant distants havent-hi interaccions entre elles.

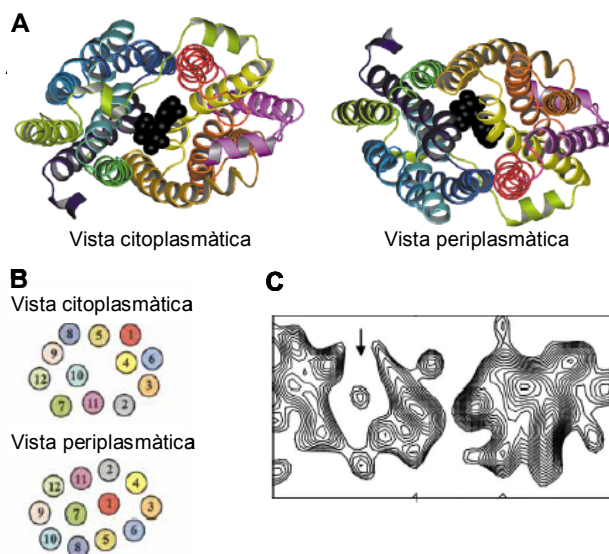


Figura 1.18. A. Vista citoplasmàtica i periplasmàtica de de la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003). B. Projecció de la TetAB a partir de l'estructura de la LacY (Vardy et al., 2004). C. Projecció de la MelB a una alçada de -12 Å de dos permeases orientades en direccions contràries (Purhonen et al., 2005)

1.3.11. La MelB reaccionada amb NEM

El *N-etilmaleimida* (NEM) és un reactiu sulfídic que, igual que altres reactius com el *N-naftilmaleimida* (NNM) i *p-cloromercuribenzoic* (ClHgBz), inhibeix el transport de la MelB sense afectar la unió dels seus substrats, ni l'afinitat ni el número de llocs d'unió pel sucre (Bassilana et al., 1987; Damiano-Forano et al., 1986). A partir de la mutació de cadascuna de les Cys (Weissborn et al., 1997) es va poder veure que la Cys que reacciona amb el NEM és la Cys364 que se suposa que es troba en el llaç 10-11.

Els canvis en la fluorescència induïts per la unió dels substrats no es veuen modificats pel tractament amb NEM i per tant es va proposar que els processos involucrats en aquests canvis deuen correspondre a passos inicials del transport (Mus-Veteau et al., 1995). Tampoc s'observen variacions en la senyal FRET quan la MelB es reacciona amb NEM (Maehrel et al., 1998). En canvi, en els experiments de transferència de càrrega, s'observa que la resposta transitòria elèctrica amb constant de temps lenta, que correspon al transport dels substrats, desapareix en reaccionar la MelB amb NEM (Ganea et al., 2001).

1.3.12. La permeasa sense cisteïnes (Cys-less o 3SV)

L'estudi de les Cys natives de la MelB o aquelles introduïdes mitjançant mutacions permeten obtenir informació sobre l'estructura i la funció del transportador. La protecció dels substrats a la inhibició de la MelB per part dels reactius sulfídics, suggereix que les Cys natives o introduïdes mitjançant mutacions estan en el camí que els substrats segueixen a través del transportador (Ding i Wilson, 2000a; Ding et al., 2001; Matsuzaki et al., 1999). La reacció amb reactius sulfídics, permeables o impermeables a la membrana, permet identificar els aminoàcids que estan accessibles des de l'espai periplasmàtic i els que ho estan des de l'espai citoplasmàtic (Abdel-Dayem et al., 2003). A més, la reacció d'entrecruament de dues Cys pot permetre deduir quines hèlixs es troben pròximes (Ding i Wilson, 2001a; Wu et al., 1998a). Però per tal de poder realitzar tots aquests estudis es necessari una permeasa sense Cys.

La MelB té 4 Cys natives localitzades a les posicions 110, 235, 310 i 364. La substitució individual de les Cys per Ser dona bons rendiments de

transportador a la membrana excepte en el cas de la Cys235 que s'ha de substituir per una Val. La MelB amb les 4 Cys mutades també presenta una expressió similar a l'observada pel WT, i encara que la Cys-less presenta algunes diferències respecte el WT, continua transportant melibiosa fent servir Na^+ , Li^+ o H^+ com a co-transportadors i conserva aproximadament les mateixes propietats cinètiques de la MelB salvatge (Weissborn et al., 1997).

En la mesura del senyal elèctric també s'observa aquesta similitud entre la MelB salvatge i el Cys-less. La forma dels senyals, les constants de temps i l'alçada dels pics són de la mateixa magnitud en les dues permeases. Però s'ha de tenir en compte que l'alçada del senyal en afegir $\Delta\text{mel}(\text{na})$ i $\Delta\text{Na}(\text{mel})$ és més gran en el cas del Cys-less que en el WT (Meyer-Lipp, 2005).

1.3.13. El llaç 10-11

L'alta conservació de la seqüència del llaç 10-11 és una de les característiques de la família GPH. Varis estudis de mutagènesi han estat dirigits cap aquest llaç per tal de veure la seva funció en el transport dels substrats. Es va observar que molts d'aquests mutants tenien afectades les propietats d'unió del sucre (Ding et al., 2000). Dintre d'aquests mutants es va trobar el doble mutant K377C/I22C, indicant la proximitat del llaç 10-11 a l'hèlix I (Ding i Wilson, 2000b).

Aquest i altres aminoàcids amb càrrega de la MelB en el llaç 10-11 es van mutar i caracteritzar (Séry, 2002). Les conclusions resumides que es treuen de cada mutant són: Els residus K359, H361, E365 no semblen ser essencials en la funció del co-transport. La introducció d'un residu neutre en la posició E357 deu provocar una inestabilitat de la proteïna dins la membrana. A més, el mutant E357C deixa de reconèixer els sucres amb conformació β . La mutació D354C modifica l'eficiència de l'acoblament ió-sucre (també observat per Ding (2003)). La R363 deu estar implicada en l'etapa de translocació dels substrats (també observat per Ding (2003)). Els residus D351 (també observat per Ding (2003)) i K377 deuen participar en el lloc d'unió del sucre o a nivell de translocació. En el cas del mutant K377C la reintroducció d'una càrrega positiva recobra parcialment l'acumulació de melibiosa. Val a dir que justament aquests dos residus, D351 i K377, es troben en la zona d'unió del llaç 10-11 amb les hèlixs X i XI. Per tant, podrien tenir un rol d'estabilització d'aquestes hèlixs, que

s'ha vist que són importants per a la unió del sucre (Cordat et al., 1998; Ding et al., 2000; Mus-Veteau i Leblanc, 1996). Tots aquests resultats fan pensar que el llaç 10-11 té una funció en l'acoblament entre el catió i el sucre, induint canvis conformacionals a altres parts de la MelB. A conclusions similars arribava Ding (2003 i 2004), qui a més va proposar que aquest llaç deu ser un llaç mòbil funcional.

1.3.14. El llaç 4-5. El mutant R141C

Estudis de proteòlisi (Gwizdek et al., 1997) van mostrar que l'addició de sodi protegeix aquest llaç de la digestió de les proteases. La melibiosa per si sola (és a dir, la unió de melibiosa en presència d' H^+) no té aquest efecte; en canvi, afegida conjuntament amb el sodi, la protecció s'incrementa molt. El foto-marcatge de l'Arg141 (Ambroise et al., 2000) corrobora la importància d'aquest llaç en la funció de la MelB.

Posteriorment es van mutar els aminoàcids carregats positivament i s'observà que només els mutants R141C i R149C perden la capacitat d'acumular melibiosa (Abdel-Dayem et al., 2003). S'ha de tenir en compte que aquests residus en troben molt conservats entre els diferents organismes de la família GPH. En concret, el mutant R141C, encara que no acumula melibiosa, no té gairebé afectada la unió depenent de Na^+ de α - i β - galactòsids (Abdel-Dayem et al., 2003), encara que la unió de melibiosa deixa d'augmentar l'afinitat pel Na^+ (Meyer-Lipp, 2005). Per tant, el defecte en el transport d'aquest mutant, deu ser degut probablement a un defecte en l'orientació del transportador amb els substrats units o una reducció de l'alliberament d'aquests en el compartiment interior (Abdel-Dayem et al., 2003). Al no tenir mutacions compensatives (Séry, 2002) no se li pot donar una funció estructural, i deu participar directament en l'orientació del sucre a l'hora de ser alliberat. A més, el fet que tant el mutant R141K i el mutant R141C reaccionat amb reactius sulfídrics carregats positivament recuperen el transport de melibiosa, subratlla la importància d'una càrrega positiva en aquesta posició (Abdel-Dayem et al., 2003). Tenint en compte que aquests aminoàcids es troben en el llaç 4-5, aquesta estructura deu ser un llaç mòbil que es troba accessible al citoplasma quan no hi ha substrats i no accessible quan el transportador té els dos substrats units (Abdel-Dayem et al., 2003). En el cas de l'Arg149 es va

observar que el mutant R149C no uneix substrats i que els mutants R149K i R149Q encara que transporten sucre de forma Na^+ dependent, tenen una forta reducció per l'afinitat pels α -galactòsids i no catalitzen l'acumulació de β -galactòsids. Per tant, és possible que l'Arg149 participi directament en la unió de melibiosa a través de ponts d'hidrogen (Abdel-Dayem et al., 2003).

Els residus acídics del llaç 4-5 també es troben molt conservats entre els diferents transportadors de la família GPH. Aquests residus es van mutar a Cys i van ser caracteritzats per Séry (2002). Encara que els mutants D137C i E140C essencialment no presenten modificacions en el seu transport, el mutant E142C presenta unes propietats semblants al R141C, però en aquest cas conserva un 10% del transport del Cys-less. Aquest 10% queda inhibit al reaccionar el mutant amb NEM, indicant l'accessibilitat d'aquest residu al medi aquós. L'E142C té una mutació compensativa I22S. Aquesta mutació compensativa és la mateixa que es troba pel mutant K377C del llaç 10-11 (Ding i Wilson, 2000b) i per tant indica una proximitat del llaç 10-11 amb el llaç 4-5 i l'hèlix I.

Sobre el mutant R141C i el mutant E142C també s'han fet mesures dels canvis en el senyal elèctric en afegir substrats i s'han relacionat amb resultats de fluorescència i de transferència d'energia (FRET) per treure informació sobre els mecanismes que es troben afectats en el transport d'aquests mutants respecte el Cys-less (Meyer-Lipp, 2005). La primera cosa a destacar dels dos mutants és que el senyal corresponent a l'alliberament dels substrats, i que s'observa en totes les condicions (excepte en ΔNa) del WT i del Cys-less, desapareix (Meyer-Lipp, 2005). La reacció del R141C amb un reactiu sulfúric carregat positivament (MTSEA^+) fa que aquest mutant recobri el 20% d'aquest senyal (Meyer-Lipp, 2005).

La MelB-NEM, com s'ha vist anteriorment pels mutants, no mostra el senyal elèctric corresponent a la translocació dels substrats en cap de les condicions. Però a diferència dels mutants la proporció del senyal que correspon a l'addició de Na^+ i melibiosa conjuntament és semblant al WT (50% per a cada substrat). En canvi, en els mutants R141C i E142C, no s'observa pràcticament senyal degut a la unió de melibiosa i pràcticament tot el senyal és induït pel sodi. Per tant, encara que aquestes permeases tinguin la mateixa

funció deuen estar inhibides en diferents etapes del transport (Meyer-Lipp, 2005).

Aquesta conclusió també l'extreuen d'experiments de fluorescència dels mutants R141C i E142C on, al contrari que el WT, l'addició de melibiosa només fa augmentar lleugerament el senyal de fluorescència (Meyer-Lipp, 2005). En canvi, el WT-NEM presenta un augment semblant al de la MelB salvatge. Per tant, tenint en compte que els Trp responsables del senyal de fluorescència del sucre es troben en les hèlixs X i XI, proposen que les mutacions deuen provocar una incorrecta organització estructural del complex terciari i/o impedeixen algunes de les interaccions amb el lloc d'unió dels substrats, que deuen ser necessaris per a la translocació i alliberament d'aquests (Meyer-Lipp, 2005). En canvi, en aquests mutants si que s'observen fenòmens de FRET i per tant es produeix un canvi en l'entorn del sucre degut a la unió de Na^+ (Meyer-Lipp, 2005).

Més evidències que hi ha canvis conformacionals defectius en la unió de melibiosa en el R141C s'obtenen mitjançant experiments de proteòlisis. La unió de Na^+ continua protegint el llaç 4-5 de les proteases, en canvi ara, la unió de melibiosa en presència de Na^+ , al contrari que el WT, no incrementa la protecció d'aquest llaç (Meyer-Lipp, 2005).

Tots aquests resultats van dur a la conclusió que els mutants R141C i E142C tenen aturat el seu transport en un estat anterior ($3 \leftrightarrow 3^*$, veure figura 1.14) en comparació amb la MelB reaccionada amb NEM ($3^* \leftrightarrow 4$, veure figura 1.14) (Meyer-Lipp, 2005), on l'estat 3^* correspondria a l'estat "tancat" observat en el transportador d'oxalat (OxIT) (Hirai i Subramaniam, 2004).

1.3.15. La MelB reconstituïda amb lípids de PC

Per tal d'observar quin efecte tenien les interaccions hidrofòbiques entre els lípids i la proteïna, Dumas et al. (2000) van estudiar el transport de la MelB reconstituïda en diferents llargades de fosfatidilcolina (PC). Varen observar que la llargada de les cadenes alifàtiques és important per al transport de la MelB, encara que no té efecte sobre la unió del sucre. La màxima activitat de transport es troba en cadenes de PC de 16:1, que tenen una llargada de 2,65 nm. Per tant, les interaccions hidrofòbiques deuen jugar un paper important en la funció de la MelB via la inclinació de les seves hèlixs transmembrana. A més,

també és proposa una funció dels caps polar en la funció de la MelB, degut a que el sucre es troba en un entorn més polar en lípids de PC que no pas en lípids de la membrana d'*E. coli*. En canvi, no s'observa variació de l'entorn del sucre entre les diferents llargades de lípids de PC (Dumas et al., 2000).

1.3.16. Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia d'infraroig

Els experiments presentats en aquest treball són la continuació d'uns estudis previs sobre la MelB utilitzant l'espectroscòpia d'infraroig. Actualment hi ha publicats dos articles d'aquests estudis (Dave et al., 2000; Dave et al., 2002) i a més, hi ha un altre parell en preparació. Els altres resultats encara no publicats es troben en la Tesi doctoral de la Dra. Natàlia Dave i Coll. A continuació es farà un petit resum d'aquest estudi amb els resultats i les conclusions més destacades o les més rellevants per aquest treball.

1.3.16.1. Espectres d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de la MelB salvatge en H_2O i D_2O

L'amida I presenta un màxim d'absorció a 1657 cm^{-1} i l'amida II a 1545 cm^{-1} . La desconvolució de l'amida I dona lloc a dues bandes principals a 1660 cm^{-1} i 1653 cm^{-1} que s'assignen principalment a hèlixs α_{II} i hèlixs α , respectivament. A més, l'amida I està composta d'altres bandes que es poden assignar a diferents tipus d'estructura secundària. Per tal d'ajudar a l'assignació de totes aquestes bandes també es va obtenir l'espectre dels proteoliposomes en presència de D_2O . Les assignacions i el percentatge de cada estructura es poden observar a la taula 1.III. El tant per cent d'hèlix α trobat està en concordança amb la predicció de 12 hèlixs transmembrana.

A més d'aquests espectres també es va realitzar l'espectre d'absorció de la proteïna solubilitzada en DM (que encara es manté activa). Aquest espectre continua presentant dues bandes assignables a hèlixs α situades a 1658 i 1651 cm^{-1} i, encara que s'observen diferències en la posició d'altres bandes, els espectres de la proteïna solubilitzada i reconstituïda són similars.

Taula 1.III. Composició de l'estructura secundària i assignacions del transportador de melibiosa d'*E. coli*.

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

1.3.16.2. Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats

L'espectre d'absorbància de la MelB reconstituïda en liposomes en presència de diferents substrats presenta variacions sobretot en les bandes corresponents a hèlixs α. Amb la unió de Na⁺ s'observa una disminució de la intensitat de la banda a 1653 cm⁻¹ i també, un lleuger desplaçament a números d'ona menors de la banda de 1660 cm⁻¹. La unió de melibiosa produeix un lleuger desplaçament de les bandes d'hèlixs α de 1660 i 1653 cm⁻¹ a 1658 i 1651 cm⁻¹ respectivament, i una disminució de la intensitat d'aquesta segona banda. L'addició d'ambdós substrats, Na⁺ i melibiosa, reverteix en part els efectes produïts per la unió de Na⁺ sol. És a dir, la diferència d'intensitat entre les bandes a 1660 i 1653 cm⁻¹ produïda per l'addició de Na⁺ torna a disminuir, situant-les amb unes intensitats més properes. Per tant, l'addició dels substrats modifica les propietats d'aquests components estructurals.

1.3.16.3. Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR

Mitjançant el bescanvi H/D no només es pot obtenir informació dels canvis conformacionals globals de la proteïna en unir els substrats, si no que a més es pot obtenir informació dels canvis estructurals en cadascuna de les estructures secundàries per separat. Per realitzar això, s'exposa una mostra de proteoliposomes de MelB o del mutant R141C a una atmosfera saturada de D₂O (per més detalls experimentals mirar Dave et al. (2002)) i s'observa com varia el bescanvi H/D en afegir els substrats.

1.3.16.3.1. Bescanvi H/D de la MelB salvatge

El bescanvi de la MelB sense substrats units (MelB·H⁺), després de 770 minuts, que és el que dura un experiment, és del 55% i l'extrapolació de les dades experimentals a 24 hores dona un valor de bescanvi del 60%. Aquest valor mostra una proteïna relativament accessible al medi però amb un valor més baix que altres transportadors de membrana, com són el transportador d'eritròcit humà que té un bescanvi del 85% (Alvarez et al., 1987), la permeasa de lactosa d'*Escherichia coli* que el té del 95% (le Coutre et al., 1997) o el transportador mitocondrial ADP/ATP que el té del 85% (Lorenz et al., 2001).

El bescanvi també es va calcular per a la MelB unida als seus substrats, obtenint uns bescanvis del 54% pel complex MelB·Na⁺, 46% pel complex MelB·melibiosa i finalment 50% pel complex MelB·Na⁺·melibiosa. Per tant, els dos cations provoquen un bescanvi similar en la MelB, en canvi la unió del sucre indueix una compactació de la proteïna que dona lloc a un menor bescanvi. Aquests resultats estan d'acord amb el fet que la MelB purificada en presència de melibiosa és molt més estable (Pourcher et al., 1995).

L'anàlisi del bescanvi H/D per a cada estructura secundària indica que les estructures de làmina β tenen un bescanvi que depèn de quin substrat es troba unit a la MelB, amb un comportament similar, però no igual, que el bescanvi global de la proteïna, i on en el cas del complex MelB·H⁺, el bescanvi és de tan sols el 40%. Les estructures hèlixs α i girs reversos també estan protegits per la unió de sucre, però amb un menor grau. Prediccions de l'estructura secundària de la proteïna suggereixen que els llaços 4-5 i 10-11 contenen estructura de làmina β. S'ha vist que aquests llaços són importants pel transport (Abdel-Dayem et al., 2003; Ding, 2003) i que el llaç 4-5 intervé en

la unió del sucre (Ambroise et al., 2000). Per tant, la variació del bescanvi H/D en les làmines β en afegir els substrats indica uns possibles canvis conformacionals en els llaços citoplasmàtics 4-5 i/o 10-11.

1.3.16.3.2. Bescanvi H/D del mutant R141C

Abans de calcular el bescanvi H/D s'ha de tenir en compte que l'anàlisi de l'estructura secundària del mutant R141C, tot i trobar-se algunes diferències en les intensitats de les bandes d'hèlix α principalment i amb menor grau en les làmines β , no es van detectar canvis significatius en la posició dels seus màxims ni en la seva quantificació.

El mutant sense cap substrat unit (R141C·H⁺) mostra una accessibilitat global del 63%. Per tant, aquest mutant té una conformació una mica més oberta que el WT sense la presència de substrats. Els complexos R141C·Na⁺, R141C·melibiosa·H⁺ i R141C·melibiosa·Na⁺ tenen un bescanvi del 62%, 55% i 52% respectivament. A grans trets, els bescanvis del mutant en totes les condicions són més grans que en el WT. Per tant, el mutant presenta una conformació menys compacta que el WT. A més, igual que en el WT, les condicions on la proteïna presenta major compactació, i per tant menor bescanvi, són en presència de sucre.

En el bescanvi de les estructures secundàries s'observa que en els girs reversos la condició R141C·melibiosa·Na⁺ és la que té menor bescanvi, en canvi la condició R141C·melibiosa·H⁺ és la que té major bescanvi. Aquests resultats difereixen dels obtinguts pel WT. En el cas de les estructures hèlix α també hi ha variacions importants respecte el WT. En canvi, en les làmines β aquestes variacions són molt menors.

1.3.16.4. Estudi de l'orientació de la MelB salvatge i del mutant R141C per ATR-FTIR

Els espectres de dicromisme dels proteoliposomes de MelB, obtinguts de la resta de l'espectre de la MelB amb la llum polaritzada paral·lelament menys l'espectre de la MelB amb la llum polaritzada perpendicularment, ens donen informació sobre l'existència de vibracions amb orientació. Les estructures no orientades no apareixeran en l'espectre de dicromisme.

La presència de bandes a 3296 cm^{-1} (amida A), 1660 cm^{-1} (amida I) i 1543 cm^{-1} (amida II) en l'espectre de dicroïsmes indiquen que existeixen estructures helicoidals orientades al llarg de la membrana. També s'observa una espatlla corresponent a les tirosines a 1516 cm^{-1} , indicant que almenys algunes d'elles estan orientades. El bescanvi H/D confirma l'assignació d'aquestes bandes a hèlixs α .

També es va mesurar el canvi d'inclinació dels segments transmembrana en afegir els substrats. Els complexos $\text{MelB}\cdot\text{H}^+$ i $\text{MelB}\cdot\text{melibiosa}\cdot\text{H}^+$ contenen els segments transmembrana més orientats amb un angle al voltant de 26° , seguit del complex $\text{MelB}\cdot\text{melibiosa}\cdot\text{Na}^+$ amb 30° i per últim el complex $\text{MelB}\cdot\text{Na}^+$ amb un angle de 36° .

Per tal d'observar amb major detall quines eren les estructures que donaven aquest canvi en la inclinació es va fer una relació entre el paràmetre d'ordre, que ens dona informació sobre l'orientació de la proteïna, i el número d'ona. S'observen dos màxims a 1664 i 1554 cm^{-1} corresponents als dos tipus d'hèlixs α . El primer correspon al grup d'hèlixs α amb més orientació en les quatre condicions de substrats i el segon al grup amb menor orientació. La variació del paràmetre d'ordre entre les dues hèlixs està representada en la figura 1.19.

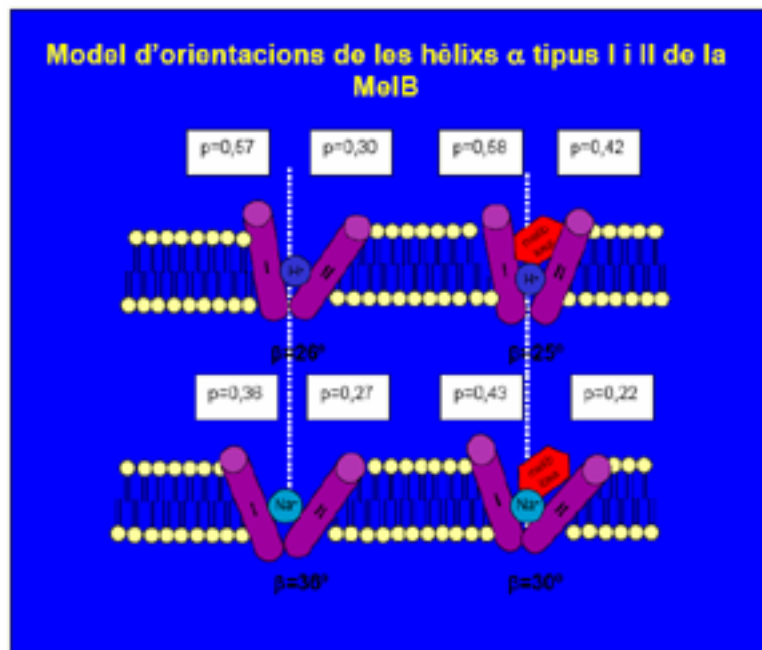


Figura 1.19. Model d'orientació de les hèlixs α tipus I i II de la MelB (Dave et al. manuscrit en preparació).

L'espectre de dicroïsme del mutant R141C mostra un màxim molt intens a 1662 cm^{-1} corresponent a estructures hèlixs α . En canvi el màxim a 1652 cm^{-1} , també corresponent a hèlixs α , té molt poca intensitat i per tant mostra pèrdua d'orientació. El bescanvi H/D mostra un espectre de dicroïsme molt similar. Per tant, les estructures orientades es veuen poc afectades per aquest bescanvi. En comparació amb la MelB salvatge el mutant presenta una menor orientació de les seves estructures.

1.3.17. Estructures 2D i 3D de la MelB

L'estudi de l'estructura de la MelB mitjançant cristalls va començar amb l'observació a 8 \AA de cristalls 2D (Hacksell et al., 2002). El mapa de projecció mostra que la mida d'un monòmer és de $49\text{ \AA} \times 37\text{ \AA}$. A partir de les àrees més denses proposen que les hèlixs presenten diferents inclinacions respecte la normal de la bicapa. Un total de 12 hèlixs transmembrana s'assignen a partir d'aquestes àrees més denses (figura 1.9). L'organització d'aquestes àrees és asimètrica, amb sis col·locades en un costat i sis en un altre, separades per una

regió de menys densitat. Aquesta organització asimètrica s'observa en el transportador NhaA (Williams, 2000), però no en el transportador OxIT (Heymann et al., 2001). Per tant, podria ser un motiu característic dels transportadors Na^+ -depenent.

Recentment s'ha obtingut l'estructura 3D de la MelB però amb una resolució de només 10 \AA (Purhonen et al., 2005). L'altura del transportador és de 65 \AA . L'estructura mostra que la MelB està oberta cap a un costat de la membrana però tancada cap a l'altre costat (com s'ha observat anteriorment en

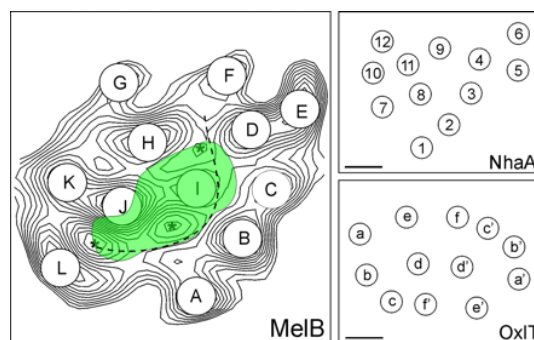


Figura 1.9. Projecció de la MelB a 8 \AA . Projecció de la MelB conjuntament amb la posició de les hèlixs α de l'antiport NhaA (Williams, 2000) i del transportador d'oxalat OxIT (Heymann et al., 2001). Les regions amb més densitat del mapa de la MelB estan marcats amb lletres (A-L). Els asteriscs indiquen les zones de menor densitat. La línia discontinua mostra la zona amb menor presència de proteïna que separa el mapa de projecció en dues parts. El domini pintat en verd correspon a un possible canal aquós (Heymann et al., 2001).

les estructures de la LacY i del GlpT). Com també s'ha observat en la projecció 2D, s'aprecien dues zones de l'estructura amb densitats diferents, que deuen correspondre a les hèlixs transmembrana, indicant que algunes d'aquestes hèlixs deuen estar significativament inclinades. Aquesta estructura es va superposar a les dels transportadors LacY i GlpT i encara que en els dos casos hi ha bastant similitud, hi ha zones que no se superposen. En canvi s'observen millors superposicions, sobretot en la zona transmembrana, amb el transportador NhaA (Purhonen et al., 2005).

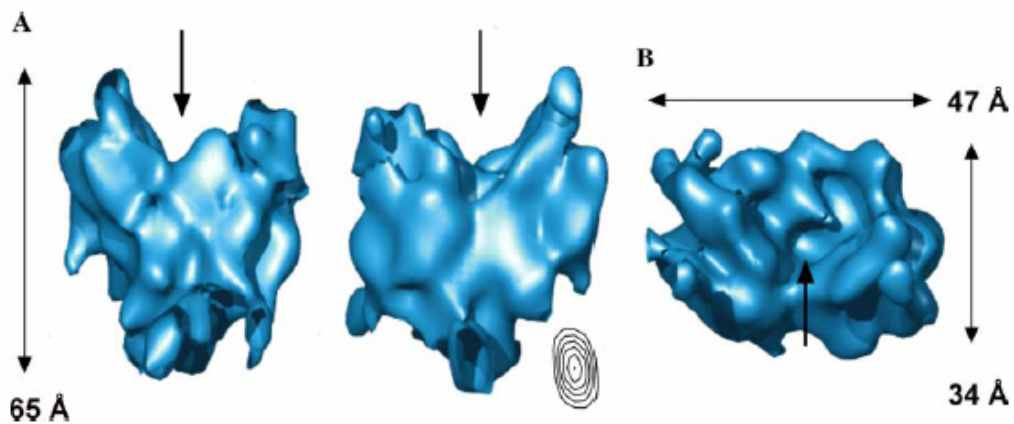


Figura 1.10. Estructura 3D de la MelB.

L'estructura 3D de la MelB (10 Å de resolució) presenta una molècula amb forma de cor composta de dos dominis. (A) Vista de la molècula des de diferents costats al llarg del pla de la membrana. (B) Vista superior, per on la molècula està oberta. La posició de la cavitat interior entre els dos dominis està marcada amb una fletxa (Purhonen et al., 2005).

1.4. Espectroscòpia d'infraroig

L'espectroscòpia d'infraroig (FTIR) és una bona tècnica per a l'estudi de l'estructura i el mecanisme de les proteïnes (Arrondo i Goñi, 1999; Barth i Zscherp, 2000; Goormaghtigh et al., 1994a, b, c; Mäntele, 1993; Tatulian, 2003; Zscherp i Barth, 2001). L'avantatge d'aquesta tècnica sobre altres espectroscòpies és que degut a la seva elevada longitud d'ona no hi ha problemes de dispersió.

La tècnica de FTIR s'ha vist que és una de les tècniques més versàtils a l'hora d'estudiar l'estructura secundària de les proteïnes, ja que permet estudiar-la en diferents entorns: reconstituïda en lípids (Dave et al., 2000; Lórenz et al., 2001), en dissolucions aquoses (Dave et al., 2000; Lórenz et al., 2001), en dissolucions orgàniques (Torres i Padrós, 1993), solubilitzada (Dave et al., 2000; Lórenz et al., 2001) o en films secs (Lórenz-Fonfría et al., 2003).

També és una bona tècnica per estudiar les cadenes laterals dels aminoàcids (Barth, 2000). Per exemple, es poden seguir les protonacions-desprotonacions dels Asp i Glu involucrats en la funció de les proteïnes (Rothschild, 1992), les seves interaccions amb cations (Deacon i Phillips, 1980; Nara et al., 1994) o els canvis en la força dels ponts d'hidrogen que estan units al grup C=O d'aquestes cadenes laterals (Barth i Zscherp, 2002).

1.4.1 Vibració i absorció de la llum infraroja

Un oscil·lador amb dues masses il·lustra senzillament els fonaments que regeixen l'espectre vibracional amb l'estructura de la molècula i el seu entorn. La freqüència de vibració d'un enllaç ve donada per:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m_r}} \quad (1)$$

on k és la constant de força entre els dos àtoms i m_r la massa reduïda:

$$\left(\frac{1}{m_r} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)$$

L'absorció de la llum infraroja es produeix quan interaccionen les ones electromagnètiques amb els dipols moleculars. Concretament el vector del camp elèctric de l'ona electromagnètica s'acobla amb el moment dipolar $\mu(t)$ de la molècula. Aquest acoblament provoca un canvi en el moment dipolar de

l'enllaç que absorbeix la radiació, però la freqüència de vibració es manté la mateixa. Per tant, és necessari que l'ona electromagnètica i el moment dipolar tinguin la mateixa freqüència. Com més gran sigui aquest moment dipolar més gran serà l'absorció. L'absorció de la radiació provocarà que es passi d'un nivell vibracional basal a un de superior. La transició només es pot donar entre nivells vibracionals adjacents.

1.4.2. Adquisició dels espectres i funcionament d'un interferòmetre

El pas d'un aparell de dispersió a un aparell amb transformada de Fourier per tal d'adquirir els espectres d'infraroig va significar un augment considerable de la relació senyal/soroll, necessària per estudiar bandes poc absorbents com la de proteïna superposades amb bandes molt intenses com la de l'aigua. A més, i el que és també molt important, permet adquirir els espectres amb molta més rapidesa.

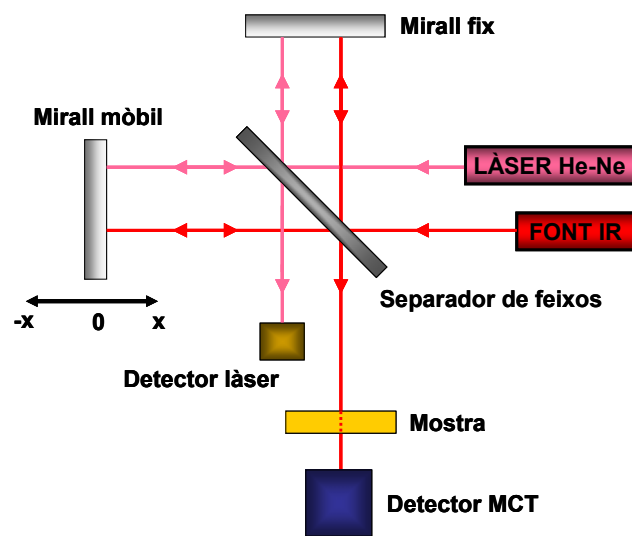


Figura 1.20. Esquema d'un aparell de FTIR.

El funcionament d'un interferòmetre (figura 1.20) consisteix bàsicament en dos feixos d'infraroig que es recombinen donant lloc a una intensitat en el senyal del detector. Per obtenir això, la font de llum emet llum infraroja policromada que anirà al separador de feixos (beam splitter). Aquest separador transmet el 50% de la llum incident i reflecteix l'altre 50%. Aquest parell de feixos es dirigiran a un mirall fix i a un altre de mòbil que té una velocitat constant. La llum reflectida pel mirall fix i la llum reflectida pel mirall mòbil es recombinaran en el separador de feixos i es dirigiran cap a la mostra. La interferència dels dos feixos produirà un senyal en el detector que dependrà de quantes ones estiguin en fase (interferència constructiva) o en oposició de fase (interferència destructiva). La interferència d'aquestes ones dependrà de la posició del mirall mòbil (l) (figura 1.21). Per tal de mesurar la posició del mirall

es fa servir un làser de Ne-He. Quan més gran sigui la distància que es mogui el mirall mòbil més resolució tindrà l'espectre, però es tardarà més temps en adquirir-lo. En aquest punt tenim un interferograma que dóna una relació entre la intensitat del senyal i la distància del mirall mòbil. Per obtenir una relació entre la intensitat i cada

número d'ona s'aplica la transformada de Fourier. En una situació ideal en la que el mirall mòbil és pogués moure fins a una distància infinita, la transformada de Fourier de l'interferograma resultant donaria lloc a un espectre on cada

número d'ona estaria ben definit (figura 1.21A). Degut a que el mirall mòbil només es pot moure fins a una certa distància (l), l'espectre resultant correspondria a l'aplicació

a l'interferograma d'una

funció boxcar (figura 1.21B). Això dóna lloc a un espectre amb una banda central amb lòbuls als costats (figura 1.21B). Per tal de minimitzar aquests lòbuls a l'interferograma se li aplica una funció d'apodització que, en el nostre cas, és la funció triangle que és la més utilitzada per l'espectroscòpia FTIR per mostres biològiques (figura 1.21C). La transformació de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat ens dóna l'espectre d'absorció.

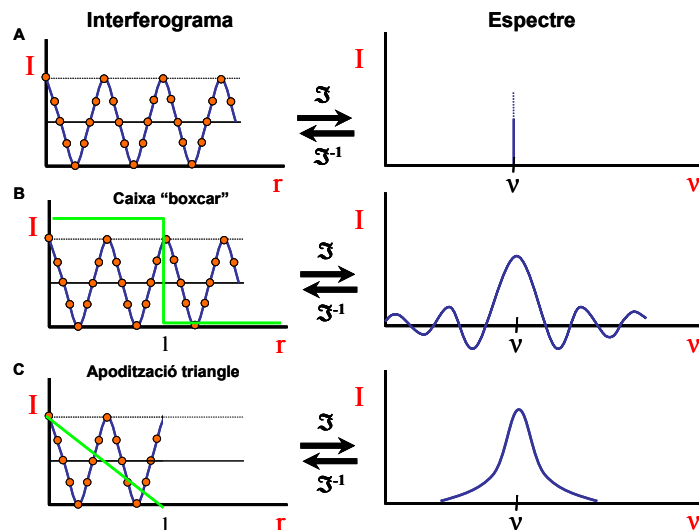


Figura 1.21. Representació del tractament de l'interferograma per tal d'obtenir l'espectre d'absorció. \mathfrak{F} , transformada de Fourier; \mathfrak{F}^{-1} , inversa de la transformada de Fourier; I , intensitat; r , distància recorreguda pel mirall mòbil; l , retard màxim del mirall; v , número d'ona.

A, interferograma amb un retard del cristall infinit, que donaria un espectre ideal.

B, aplicació de una funció "boxcar" a l'interferograma, que dóna lloc a un espectre amb una banda amb lòbuls.

C, interferograma amb una apodització triangle, que dóna lloc a un espectre sense lòbuls.

1.4.3. Tècnica d'ATR-FTIR

Durant aquests últims anys, l'espectroscòpia d'ATR-FTIR (attenuated total reflection-Fourier Transform Infrared) ha esdevingut un dels mètodes més

potents a l'hora d'estudiar l'estructura de les proteïnes (Goormaghtigh et al., 1999; Tatulian, 2003). Aquesta tècnica presenta alguns avantatges respecte la tècnica de transmissió ja que necessita molt poca quantitat de proteïna a l'hora d'adquirir els espectres (1-100 µg), ens permet obtenir informació de l'orientació de la proteïna (Goormaghtigh et al., 1999) i el que és més important per aquest treball, permet modificar el medi extern on es troba la proteïna (pH, substrats, deuteració) sense la necessitat de canviar de mostra. Un exemple d'aquest avantatge és la possibilitat d'estudiar les cinètiques de bescanvi H/D (Dave et al., 2002).

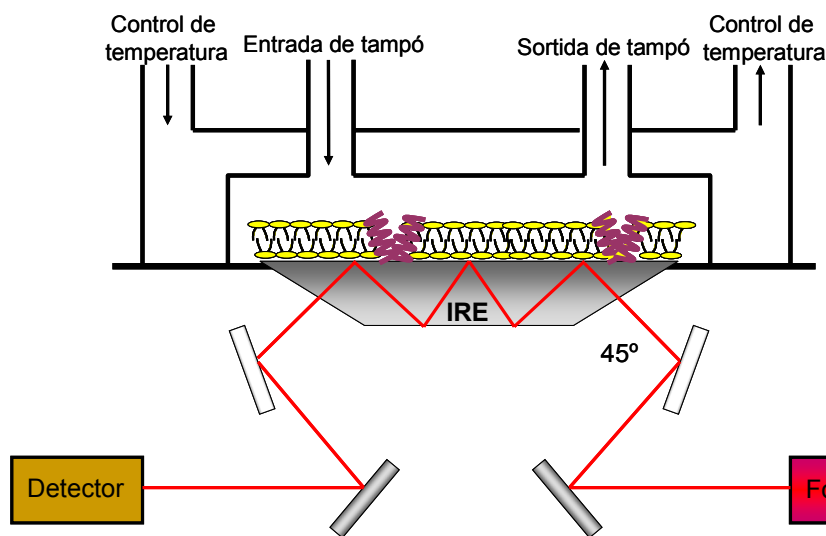


Figura 1.22. Esquematzació d'un accessori d'ATR.

Els miralls dirigeixen la llum IR cap l'IRE. Sobre aquest es troba dipositada la mostra. La llum IR que prové de les refraccions és dirigida cap el detector.

L'ATR-FTIR consisteix en un plat amb forma trapezoïdal que, tot i que existeixen altres dissenys de plats d'ATR-FTIR, aquesta forma és la més utilitzada per a l'estudi de proteïnes en general (Goormaghtigh et al., 1999). Mitjançant uns miralls, el feix de llum infraroja és dirigit cap al cristall de Ge, el qual és un medi amb un índex de refracció elevat i transparent a la radiació infraroja d'interès. L'angle crític d'entrada del feix de llum al cristall d'ATR, θ_c , depèn de l'índex de refracció de l'element de reflexió interna (IRE), n_1 i del medi exterior, n_2 :

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

Si el feix d'infraroig penetra amb un angle per sobre l'angle crític el feix serà totalment reflectit quan col·lisió amb la superfície del cristall. Llavors es

produeixen vàries reflexions totals de la llum a dins de l'IRE fins arribar al final del cristall on el feix serà dirigit cap el detector.

L'equació de Maxwell ens demostra que la superposició de les ones entrants i reflectides resulta en una ona perpendicular a la superfície de reflexió total. Aquesta ona es representa a la figura 1.23 i es descriu per l'equació:

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

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

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

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

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

Com més gran sigui λ_1 o més petit sigui θ , més gran serà la profunditat de penetració de l'ona evanescent. La presència del camp evanescent és el que possibilita la interacció entre la llum infraroja i la mostra situada a la superfície de l'IRE. La distància d'interacció de la llum infraroja amb la mostra serà aproximadament el valor de la d_p . Amb aquest resultat i l'observació de la figura 1.23, podem dir que la millor condició per a les mesures amb espectroscòpia d'ATR-FTIR és que la mostra estigui a prop de la superfície de l'IRE. Per aquesta raó, els films de proteïnes de membrana o proteïnes reconstituïdes en lípids són molt utilitzats (Arkin et al., 1996; Cabiaux et al., 1997; le Coutre et al., 1997; Tatulian et al., 1998). De la mateixa manera, l'equació (2) i la figura 1.23 ens indiquen que la intensitat de la banda de

l'espectre d'absorció dependrà del número d'ona, ja que la d_p i per tant la interacció amb la mostra incrementa amb la λ .

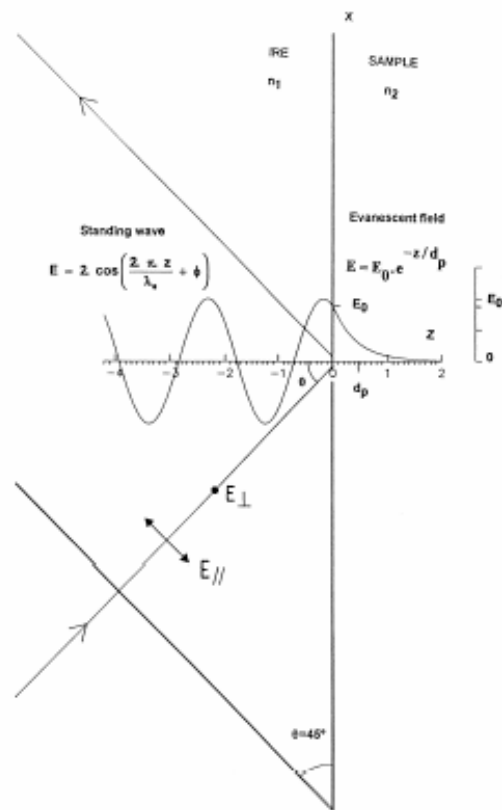


Figura 1.23. Esquema de l'entrada del feix d'infraroig al cristall d'IRE i la formació de l'ona evanescent.

Es poden observar detalls dels camps elèctrics de la radiació electromagnètica en un punt de reflexió. La z està expressada en μm

Existeixen varis materials del que pot estar format l'IRE. L'elecció d'aquest material dependrà de l'experiment a fer. Però, tenint en compte que el cristall de germani té un dels índexs de refracció més elevats, ens permetrà maximitzar el senyal a la superfície del cristall i minimitzar el senyal que prové del medi extern.

El número de refraccions internes dependrà de la longitud del cristall, del seu gruix i de l'angle d'incidència del feix d'infraroig. Com més refraccions més intens serà el senyal. Una configuració normal que s'usa en els laboratoris i que també es fa servir en aquest treball, és un cristall de germani de 5 cm de llarg i de 2 mm d'ample i amb un angle de 45° . Això dóna lloc a 25 refraccions. Un altre material utilitzat és el ZnSe. El cristall de germani té un índex de refracció de 4,0 i el ZnSe de 2,24. Això farà que el ZnSe tingui una d_p més elevada que

el cristall de germani. Per mostres que estiguin en un medi aquós, la utilització d'un cristall de germani disminuirà la contribució del medi aquós, degut a l'alt índex de refracció del cristall (poca profunditat de penetració). En canvi, amb el cristall de ZnSe s'obtingran profunditats de penetració més grans que en el cas del Ge, i per tant, si es treballa amb un film gruixut s'obté un senyal més intens de la proteïna.

En l'ATR la forma de la banda depèn dels següents paràmetres: longitud d'ona de la llum incident, índex de refracció de l'element intern de reflexió i de la mostra, angle d'incidència i l'efectivitat del contacte entre la mostra i l'IRE. En cas de tenir un film gruixut s'haurà de tenir en compte que en un espectre d'ATR l'absorbància és més gran a números d'ona menors. A més, l'absorbància pot variar si la mostra es troba orientada sobre el cristall o no (Marsh, 1999). Per tant, aquests espectres poden diferir dels espectres de transmissió (Goormaghtigh et al., 1999; Larrabee i Choi, 1993). En general però, només en condicions amb coeficients d'absorció molt elevats per part de la mostra o d'angles d'incidència de la llum IR propers a l'angle crític s'obtenen espectres d'absorció d'ATR molt diferents dels de transmissió.

Un cop s'ha estès la mostra sobre el cristall, en assecar-se es formaran multicapes de membranes. Les primeres capes que queden en contacte amb el cristall són proteïnes que formaran unions fortes amb el cristall. La resta de proteïnes es posaran sobre aquesta primera capa. Amb proteïnes solubles s'ha observat que aquests dos grups de proteïnes tenen espectres diferents (Oberg i Fink, 1998). En qualsevol cas, en les condicions normals dels experiments només una petita fracció estarà amb contacte amb el cristall de Germani, i l'efecte de les interaccions entre la mostra i el cristall no posa en dubte la validesa dels resultats (Goormaghtigh et al., 1999). Un cop la mostra es torna a hidratar, el primer que es pot observar és una disminució de la intensitat de totes les bandes. Aquest efecte és degut a l'inflament del film degut a la hidratació de les seves molècules.

Tot i els aspectes comentats anteriorment la tècnica de ATR-FTIR per l'estudi de proteïnes i lípids és una aproximació vàlida per varies raons (Goormaghtigh et al., 1999):

- 1) Els canvis en l'absorbància en la zona del visible en suspensió i en un film de la membrana púrpura hidratat són indistingibles, i per tant els

canvis conformacionals deguts al cicle catalític de la bacteriorodopsina no es veuen afectats en la mostra del film.

- 2) L'activitat de l'ATPasa d'H⁺ de *Neurospora* es recupera totalment després de resuspendre del film.
- 3) La interpretació de les bandes en els espectres de ATR-FTIR són coherents amb les estructures determinades per raig-X.
- 4) A més, en el cas del citocrom c oxidasa s'han obtinguts els espectres de diferència redox tant en FTIR de transmissió com en ATR. Els dos espectres són molt similars i la principal diferència que s'observa és l'augment de senyal dels pics que es troben a números d'ona menors, degut a la dependència de la penetració de l'ona evanescent respecte el número d'ona (Rich i Breton, 2002).

1.4.4. Bescanvi H/D

En el bescanvi hidrogen/deuteri es bescanvia l'hidrogen de l'enllaç amida que forma la cadena polipeptídica de les proteïnes. El bescanvi de la proteïna dependrà de l'accessibilitat d'aquests hidrògens al medi aquós, per tant, els hidrògens que estiguin poc accessibles al medi no es bescanviaran. El canvi de massa provocarà un canvi en la vibració de l'enllaç (veure equació 1) que donarà lloc a un desplaçament de les bandes cap a números d'ona menors. Aquest desplaçament dependrà de la vibració en qüestió.

L'amida II es desplaça uns 100 cm⁻¹ cap a número d'ones menors degut al bescanvi H/D (Goormaghtigh et al., 1994c). Seguint la disminució de la seva àrea es pot obtenir informació del grau d'accessibilitat de la proteïna al medi aquós (Dave et al., 2002; Viganò et al., 2003). A més, observant la variació d'aquesta accessibilitat en afegir substrats ens permetrà seguir els canvis conformacionals de la proteïna (Dave et al., 2002; Viganò et al., 2003).

L'amida I es desplaça uns 5-10 cm⁻¹ a números d'ona menors degut al bescanvi H/D (Goormaghtigh et al., 1994c). Amb aquesta amida es pot observar el bescanvi de les estructures secundàries i la seva variació amb la interacció amb els seus substrats (Dave et al., 2002; de Jongh et al., 1997a, b).

Finalment, les cadenes laterals també es bescanvien, però al tenir uns hidrògens molt més làbils es bescanviaran molt més ràpid que els protons amida.

El bescanvi d'aquests hidrògens ve determinat per dos factors. El primer és la relació dels pK_a s dels grups que han d'acceptar i donar protons o deuterons (Goormaghtigh et al., 1994b). El segon factor i el més important és la formació de ponts d'hidrogen, ja que són els que alenteixen més el bescanvi. A més, els aminoàcids que es trobin en el cor hidrofòbic de la proteïna o en una zona hidrofòbica de la membrana també tindran un bescanvi més lent (Goormaghtigh et al., 1994b).

1.4.5. Desconvolució pel mètode de màxima entropia

La desconvolució es fa servir per resoldre, en un espectre d'absorbància o en un espectre de diferència, aquelles bandes que estan superposades. La desconvolució té un inconvenient i és que augmenta considerablement el soroll de les nostres dades. Per tant, per ser aplicable a espectres amb una relació senyal/soroll no gaire elevada, la desconvolució ha de treballar amb certa supressió del soroll. El mètode de desconvolució més utilitzat és la desconvolució de Fourier (FD) (Kauppinen et al., 1981a, b, c), que discerneix entre el senyal (dades sense soroll) i el soroll només tenint en compte les seves freqüències. Aquesta aproximació té dues limitacions importants: (i) S'ha d'elegir un punt de tall de la freqüència, fent el resultat bastant arbitrari; (ii) per algunes freqüències, les contribucions del senyal i el soroll són igualment significatives, per tant podem descartar senyal vertader o incloure soroll en la desconvolució resultant. Per tal d'evitar aquestes limitacions, s'han descrit altres mètodes com és el cas de la desconvolució per màxima entropia (MaxEntD) (Stephenson, 1988). Aquesta desconvolució segueix una altra aproximació per discriminar el soroll de les dades. El senyal és discriminada del soroll gràcies a la propietat de descriure les dades mentre manté la solució de la desconvolució el més simple possible, al contrari del que fa el soroll. Aquest mètode dona la solució més simple, amb menys informació o més probable entre totes les solucions possibles. La simplicitat, falta d'informació o probabilitat d'aquesta solució és mesurada normalment per una funció que rep el nom d'entropia. Aquesta desconvolució permet un major estretament amb menys soroll que la desconvolució per Fourier i a més és més robusta que els mètodes de predicció lineal. Per tant, és pot considerar com una de les desconvolucions més potents que hi ha actualment.

Anteriorment aquesta desconvolució assumia que tots els valors eren positius. Però recentment Lòrenz-Fonfría i Padrós (2005) han introduït una nova expressió d'entropia (Burg-entropy) sense restricció de signe que, entre altres avantatges, la fa ser molt adequada a l'hora de desconvular espectres de diferència.

1.4.5.1. Fonaments teòrics de la desconvolució per màxima entropia

Qualsevol espectre $E(v)$ té soroll o errors, de forma que:

$$E(v) - \hat{E}(v) = \varepsilon(v)$$

on $\hat{E}(v)$ representa l'espectre lliure de soroll i errors, $\varepsilon(v)$. Si l'espectre $\hat{E}(v)$ fos desconvolat per $V(v, \gamma_L', \gamma_G') = \varepsilon(v)$, obtindríem $\hat{E}'(v)$, la solució exacta de la desconvolució. Per tant:

$$E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G') = \varepsilon(v)$$

Podem obtenir la desconvolució exacta resolent l'equació anterior. Lamentablement, això no és possible, ja que no coneixem $\varepsilon(v)$. Com a molt podem conèixer la seva desviació estàndard σ_v . Per tant:

$$\sqrt{(1/N) \sum (E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G'))^2} \approx \sigma_v$$

on N és el número de punts de l'espectre; o de manera equivalent, utilitzant la funció estadística χ^2 :

$$\frac{\chi^2}{N} = \frac{\sum (E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G'))^2}{N\sigma_v^2}$$

Aquesta condició no és suficient per determinar $\hat{E}'(v)$, ja que hi ha moltes possibles solucions $\hat{E}'(v)$ que la compleixen. Aquest grup de solucions es indistingible de la solució real dintre dels nivells de soroll (Craig i Brown, 1986).

La solució regularitzada s'obté seleccionant d'aquest grup de possibles solucions que compleixen que $\chi^2/N \approx 1$, aquella que maximitza (o minimitza) una altra funció, que s'anomena de regularització. Aquesta funció mesura de forma més o menys quantitativa la suavitat, parsimònia, probabilitat de generar-se o la informació d'una solució (Craig i Brown, 1986; Gull i Skilling, 1990; Le Besnerais et al., 1994; Provencher, 1982). En la pràctica, la combinació de la funció χ^2 i la funció de regularització simplifica qualsevol problema de dimensió N a un problema de dimensió 1, és a dir, fan una trajectòria o corba on se situen les solucions regularitzades que millor descriuen les dades. L'elecció de

la solució es redueix a un paràmetre, anomenat paràmetre de regularització, que pot determinar-se amb la restricció $\chi^2/N \approx 1$ o amb qualsevol altre criteri (Hansen, 2000, 2001).

1.4.6. Modes de vibració de l'enllaç peptídic

Per tal de trobar els modes de vibració del grup amida es va fer servir per començar el compost *N*-metilacetamida (NMA) (figura 1.24), degut a que és la molècula més petita que conté l'enllaç peptídic (Krimm i Bandekar, 1986). En total existeixen 12 modes de vibració amida dels quals els 3 més importants són:

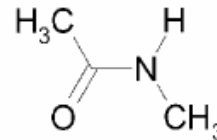


Figura 1.24. Estructura de la *N*-metilacetamida (NMA)

Amida A: absorbeix entre 3310 i 3270 cm^{-1} . Aquesta vibració està exclusivament formada per la vibració de l'enllaç NH (estirament) i per tant és molt poc sensible a l'estructura secundària de la proteïna.

Amida I: absorbeix entre 1700 i 1600 cm^{-1} i prové principalment de l'estirament de l'enllaç C=O i amb petites contribucions de la vibració d'estirament fora de fase de l'enllaç CN, deformació de l'enllaç CCN i variació en l'angle de l'enllaç NH. La posició de l'amida I depèn de la seva seqüència d'aminoàcids però sobretot depèn de l'estructura secundària. En D_2O només pateix petits desplaçaments deguts al component de la vibració NH. Aquest mode de vibració s'anomena amida I' i degut al seu petit desplaçament se superposa a l'amida I.

Amida II: absorbeix aproximadament a 1550 cm^{-1} i correspon a la combinació fora de fase de la variació de l'angle de l'enllaç NH i de la vibració de l'enllaç CN (estirament) amb petites contribucions de les vibracions CO (variació d'angle), CC i NC (estirament). En D_2O absorbeix entre 1490 i 1460 cm^{-1} i correspon a la vibració CN anomenada amida II'. Aquesta vibració ja no està combinada amb la de l'enllaç NH que al deutar-se passa a combinar-se amb altres vibracions de números d'ona inferiors ($\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$).

1.4.7. Efecte de l'estructura de la proteïna en la posició de l'amida I

Hi ha dos factors que modifiquen la posició de l'amida I. El primer correspon a la formació dels ponts d'hidrogen. Depenent de l'estructura secundària de la proteïna els ponts d'hidrogen que la formen tenen diferent força i això modificarà la posició de l'amida I. Però el mecanisme que domina la sensibilitat de la posició de l'amida I per l'estructura secundària és l'acoblament dipolar. L'oscil·lació de cada dipol forma un camp electromagnètic i aquest podrà interaccionar amb el camp electromagnètic format per un dipol veí. L'acoblament dipolar depèn de l'orientació i de la distància dels dipols, i per tant, com que les estructures secundàries tenen un patró geomètric degut als seus enllaços peptídics tindran un acoblament característic (Krimm i Bandekar, 1986). A més, aquest acoblament permet explicar la baixa freqüència on absorbeix el component principal de les làmines β , degut a que l'acoblament, per exemple, de dos oscil·ladors, donarà lloc a dos nivells d'energia que dependrà de si els oscil·ladors estan en fase o fora de fase.

1.4.8. Assignació de l'estructura secundària

Com ja s'ha comentat abans, la posició de l'amida I depèn de l'estructura secundària de la proteïna. Varis autors i estudis han anat assignat aquestes posicions a les diferents estructures secundàries. En la taula 1.IV es presenten les assignacions d'alguns d'aquests reculls d'estructura secundària tant en H_2O com en D_2O . Com es pot observar tots els autors coincideixen aproximadament en la posició de les principals estructures secundàries, encara que els rangs no són exactament els mateixos, indicant la certa ambigüitat que hi ha a l'hora d'assignar una banda a una estructura secundària.

Taula 1.IV. Rangs de números d'ona (cm^{-1}) i les seves assignacions a estructures secundàries.

H ₂ O	Hèlixs		Làmines β		Girs reversos	Estructures desordenades
	α	3_{10}	paral·leles	antiparal·leles		
a	1666-1558	1670-1660		1638-1615 1695-1765*	1690-1655	1660-1652
b	1655-1648 1660	1660, 1645	1630 1645*	1636-1630 1693-1690	1700-1600	1660-1656
c	1652			1632, 1690*		1656
d	1660-1648	1670-1660		1640-1625 1695-1675		1648-1640
e	1650-1657		1626-1640	1612-1640 1670-1690*	1696-1655	1640-1651
D₂O						
a	1658-1646	1670-1660		1636-1630 1680-1670*	1690-1650	1648-1640
b	1648-1655		1632 1648*	1628-1638 1690-1693*		1643
c	1650-1649			1632, 1675*		1643
f	1662-1645			1637-1613 1689-1682	1682-1662	1645-1637
g	1657-1651			1679-1671 1640-1630	1696-1681	1645-1640
e	1647-1654			1628-1635		1643

a, Tatulian (2003); b Arrondo et al. (1993) i Arrondo i Goñi (1999); c, Susi et al. (1967); d, Jackson i Mantsch (1995); e, Pelton i McLean (2000); f, Goormaghtigh et al. (1990); g, Byler i Susi (1986). * indica les bandes amb poca intensitat.

1.4.9. Absorció de les cadenes laterals dels aminoàcids

En l'espectre d'infraroig també hi absorbeixen les cadenes laterals dels aminoàcids. Per tant, seguint els seus màxims podem obtenir informació de la funció que fan aquests aminoàcids en l'activitat de la proteïna.

S'han realitzat varis estudis sobre les cadenes laterals dels aminoàcids. Chirgadze et al. (1975) van estudiar la posició on absorben els diferents aminoàcids en D₂O, en canvi Venyaminov i Kalnin (1990) i Rahmelow et al. (1998) van estudiar l'absorció dels aminoàcids en H₂O. Finalment, Barth (2000) va fer un recull de tots aquests estudis i d'altres sobre l'absorció de les cadenes laterals.

A continuació es descriurà breument la zona d'absorció dels aminoàcids més importants per aquest treball:

Asp i Glu: Aquests aminoàcids tenen 3 vibracions principals. En H₂O, al voltant de 1402 cm^{-1} (Asp) i 1404 cm^{-1} (Glu) absorbeix la vibració d'estirament simètrica de l'enllaç COO⁻; al voltant de $1574\text{-}1579 \text{ cm}^{-1}$ (Asp) i $1556\text{-}1560 \text{ cm}^{-1}$ (Glu) la vibració d'estirament antisimètrica de l'enllaç COO⁻. En D₂O aquestes

vibracions sofreixen un petit desplaçament cap a números d'ona majors i a més la vibració antisimètrica incrementa el seu coeficient d'absorbància al doble. Una característica d'aquestes vibracions és que poden tenir uns desplaçaments molt grans, de més de 50 cm^{-1} , cap a números d'ona superiors o inferiors depenent de la interacció que estableixin. Finalment hi ha una vibració d'estirament de l'enllaç C=O que en H_2O absorbeix entre $1716\text{-}1788 \text{ cm}^{-1}$ pels Asp i entre $1712\text{-}1788 \text{ cm}^{-1}$ pels Glu. En D_2O aquestes bandes sofreixen un desplaçament cap a números d'ona menors d'uns $5\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$.

Asn i Gln: Tenen dues vibracions principals que absorbeixen en la regió de l'amida I. La primera correspon a la vibració de l'enllaç C=O, que en H_2O absorbeix al voltant de 1678 cm^{-1} (encara que pot absorbir fins a 1704 cm^{-1}) per l'Asn i entre $1668\text{-}1687 \text{ cm}^{-1}$ per la Gln. En D_2O aquestes bandes es desplacen fins a 1648 cm^{-1} i $1635\text{-}1654 \text{ cm}^{-1}$ respectivament. La segona vibració correspon a la variació de l'angle de l'enllaç NH_2 , que en H_2O absorbeix entre $1612\text{-}1622 \text{ cm}^{-1}$ per l'Asn i $1586\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$ per la Glu.

Tyr: En el cas de la Tyr, la vibració principal en H_2O es troba entre $1516\text{-}1518 \text{ cm}^{-1}$. En D_2O tindrà un petit desplaçament cap a números d'ona menors i la seva intensitat augmentarà. Això, conjuntament amb la disminució de la intensitat de les bandes de l'amida II, permetrà identificar amb facilitat aquesta banda.

Arg: L'Arg té un parell de vibracions d'estirament corresponents a l'enllaç CN_3H_5^+ . En H_2O la vibració antisimètrica absorbeix a 1673 cm^{-1} (encara que s'ha observat a números d'ona més elevats en proteïnes) i la simètrica entre $1633\text{-}1636 \text{ cm}^{-1}$. En D_2O sofreixen grans desplaçaments cap a números d'ona inferiors. Fins a 1608 cm^{-1} en el cas de la vibració antisimètrica i 1586 cm^{-1} en el cas de la simètrica.

Lys: Té dues vibracions principals, les dues amb poca intensitat, que corresponen a la vibració l'enllaç NH_3^+ . La vibració antisimètrica absorbeix entre $1626\text{-}1629 \text{ cm}^{-1}$ en H_2O i es desplaça fins a 1201 cm^{-1} en D_2O . La vibració simètrica absorbeix a 1527 cm^{-1} en H_2O i es desplaça fins a 1170 cm^{-1} en D_2O .

1.5. Espectres de diferència mitjançant FTIR

1.5.1. Introducció

El principal objectiu en l'estudi d'una proteïna és, a part de trobar la seva estructura, trobar els mecanismes moleculars de la seva funció.

L'espectroscòpia d'infraroig permet l'estudi de l'estructura i de la funció de proteïnes de membrana, ja que els canvis espectroscòpics obtinguts variant les condicions del medi permeten obtenir informació dels canvis estructurals i conformacionals de la proteïna o de l'entorn dels seus residus.

L'espectroscòpia d'infraroig és una tècnica molt sensible que permet veure canvis en la força de l'enllaç del 0,02% (Deng i Callender, 1999) amb facilitat. Com que la força de l'enllaç i la distància entre els àtoms estan relacionats, distorsions de l'enllaç al llarg d'una reacció catalítica d'un enzim o del moviment d'una estructura proteica degut, per exemple, al transport de substrats, poden ser seguits amb molta cura.

Estudiant les variacions en l'àrea i en la posició de les bandes de l'espectre d'absorció de l'amida I en diferents condicions es poden observar canvis de gran magnitud en les estructures secundàries (Alvarez et al., 1987; Dave et al., 2000; le Coutre et al., 2002), però no permeten observar canvis més petits com serien canvis en l'entorn d'un aminoàcid o canvis lleugers en l'estructura secundària. Efectivament, per aconseguir veure canvis tan petits, caldria restar dos espectres d'una proteïna en condicions diferents. Però, degut a que la tècnica de FTIR és molt sensible i detecta les diferències degudes a la diferent preparació de les dues mostres, la resta de dues preparacions diferents dóna artefactes que no es poden resoldre.

Per tant, per tal de poder observar petites diferències és necessari obtenir les diferències de la mateixa mostra entre condicions distintes sense moure la mostra de l'espectròmetre. Per tal de poder obtenir aquests espectres de diferència existeixen varis mètodes que es poden fer servir depenent de la proteïna d'estudi (Mäntele, 1993; Zscherp i Barth, 2001). Per exemple, en el cas de la bacteriorodopsina o d'altres proteïnes sensibles a la llum, no hi ha gaires problemes experimentals degut a que les diferències s'obtenen il·luminant la mostra (Rothschild et al., 1983). Aquesta "facilitat" tècnica a l'hora

d'obtenir les diferències, juntament amb que la bacteriorodopsina és una de les proteïnes de membrana més estudiades, fa que d'aquesta proteïna hi hagi un gran nombre d'articles d'espectres de diferència de FTIR on es fan servir varis mètodes per tal de resoldre l'assignació dels pics (Rothschild, 1992). En altres proteïnes, on el que es vol observar són els canvis deguts a la unió de substrats es poden fer servir compostos engabiats (Barth et al., 1990; Cepus et al., 1998). Per exemple, en l'ATPasa de Ca^{2+} es fa servir ATP o ADP engabiat en un compost sensible a la llum. Un cop aquest compost s'il·lumina, allibera els nucleòtids engabiats que ara podran unir-se a la proteïna (Barth i Zscherp, 2000; Troullier et al., 1996; von Gernar et al., 2000). A més, hi ha un compost engabiat (1-(2-nitrophenyl)ethyl sulfate) que té la propietat de, un cop s'il·lumina indueix un canvi en el pH del medi on es troba la mostra (Barth i Corrie, 2002). Un problema que té aquest mètode és que el compost químic que engabia el substrat també dona diferència en la zona d'absorció de la proteïna. A més, no tots els substrats d'una proteïna poden ser engabiats. Per exemple, no existeixen composts engabiats per a ions monovalents com són el Na^+ o el Li^+ ni per a sucres. Finalment, un altre mètode per obtenir espectres de diferències és induir-los electroquímicament (Schlereth et al., 1993). En aquestes diferències s'estudien els canvis conformacionals induïts per la reducció del citocrom c oxidasa.

Mitjançant la tècnica d'ATR-FTIR es pot canviar el tampó que banya la proteïna sense necessitat de canviar de mostra (Baenziger et al., 1993; Marrero i Rothschild, 1987b). Es fa passar un tampó per sobre la mostra i s'adquireix un espectre; tot seguit es fa passar un altre tampó i es torna a adquirir un altre espectre. La resta d'aquests dos espectres consecutius ens donarà l'espectre de diferència. Aquest espectre de diferència conté la informació dels canvis en l'estructura secundària i canvis en la protonació/desprotonació o canvis en l'entorn de les cadenes laterals dels aminoàcids que succeeixen degut a l'activitat de la proteïna. Un dels primers experiments fets amb aquesta tècnica es van realitzar amb la bacteriorodopsina (Marrero i Rothschild, 1987a) on es canviava el pH del tampó que banyava la mostra. Posteriorment, en el cas del receptor nicotínic d'acetilcolina s'observaven diferències al fer passar diferents substàncies que s'uneixen al receptor (Baenziger et al., 1993). Aquesta tècnica també es pot fer servir per veure les diferències que s'obtenen després de

passar un reactiu que oxida o redueix la mostra, com en el cas del citocrom c oxidasa (Nyquist et al., 2001; Rich i Breton, 2002).

Amb la proteïna d'estudi d'aquest treball ja s'han fet experiments de FTIR per tal de veure els canvis estructurals deguts a la unió de substrats (Dave et al., 2000). Mitjançant tècniques de desconvolució de l'espectre d'absorció, en aquests estudis s'ha observat principalment un desplaçament de les bandes corresponents a hèlix α .

1.5.2. Informació que es pot treure d'un espectre de diferència

En un espectre de diferència trobem diferents tipus d'informació sobre la proteïna:

1) Canvis en l'estructura secundària. Es podran observar sobretot en la zona de l'amida I, encara que també ens podem ajudar de la zona de l'amida II i de l'amida A.

2) Canvis estructurals al llarg del temps de proteïnes sensibles a la llum. La tècnica de FTIR permet obtenir espectres en un curt espai de temps, de l'ordre de μ s (o fins i tot inferiors). Això permet seguir els canvis conformacionals que sofreix la proteïna d'estudi en els seus primers instant (Hackmann et al., 2001).

3) Canvi en l'orientació d'una estructura orientada. Un canvi d'orientació provoca un canvi en l'absorció de la banda que donarà lloc a un pic (positiu o negatiu) en l'espectre (Baenziger i Chew, 1997; Marsh, 1999; Rothschild et al., 1993).

4) Informació sobre la desprotonació o protonació d'aminoàcids ionitzables, i canvis en l'entorn d'un aminoàcid. Els àcids carboxílics tenen diferents bandes depenent si el grup carboxílic està protonat o no (Barth, 2000). Un altre cas és la banda de Tyr que es veu afectada pels canvis de polaritat en el seu entorn.

5) Canvis en l'estructura d'un cofactor. Un clar exemple d'això és l'estudi del cromòfor de la bacteriorodopsina (Rothschild, 1992).

6) Informació sobre els canvis globals que sofreix la proteïna. Degut a que un espectre de diferència té molts pics i algun d'ells són de difícil assignació, un es pot mirar l'espectre com un senyal d'identitat de la proteïna. Llavors, es poden comparar la forma dels espectres i les seves magnituds. Un

clar exemple d'això ho trobem en el present estudi de la MeIB on s'observa una clara diferència de forma i magnitud entre els espectres de diferència induïts per la unió de Na^+ o Li^+ o aquells que estan induïts per la unió del sucre.

7) L'accessibilitat de les estructures que estan involucrades en els canvis conformacionals. Sotmeten la mostra a un tampó preparat en D_2O , i comparant l'espectre de diferència amb l'obtingut en H_2O , es pot obtenir informació de si les estructures que intervenen en les diferències són molt o poc accessibles al solvent (Baenziger i Chew, 1997; Kluge et al., 1998).

8) El número d'aminoàcids involucrats en el canvi de conformació. Per tal de calcular l'extensió del canvi en la proteïna es fa servir l'índex anomenat COBSI (Change of Backbone Structure and Interaction) (Barth i Zscherp, 2002).

1.5.3. Origen dels pics dels espectres de diferència

En un espectre de diferència només apareixeran els pics corresponents a aquelles estructures i/o aminoàcids que han tingut alguna modificació.

Hi ha cinc possibilitats per a que apareguin pics en un espectre de diferència:

1) Els pics són deguts a un canvi en l'estat d'un aminoàcid de la proteïna, per exemple la protonació/desprotonació d'un Asp o d'un Glu. La desprotonació d'un àcid carboxílic implicarà l'aparició de tres bandes en l'espectre de diferència, una negativa deguda a la desaparició del grup COOH i dues de positives degudes a l'aparició del grup COO^- .

2) Els pics provenen d'un desplaçament de la banda original, degut a una alteració de la densitat electrònica dels àtoms que formen part de l'enllaç, d'una alteració de la vibració de l'enllaç o d'una alteració en l'acoblament amb altres vibracions. Això provocarà uns pics de signe oposat consecutius.

3) L'aparició d'un pic amb lòbuls de signe oposat. Si una banda d'absorció disminueix, per exemple la seva amplada, implicarà que l'absorbància als costats de la banda disminuirà; en canvi, l'absorbància al centre de la banda augmentarà, produint un pic positiu amb dos lòbuls negatius a cada costat. Tenint en compte que l'amplada de banda està relacionada amb la flexibilitat, una disminució de l'amplada de banda implicarà que s'ha format una estructura més rígida.

4) Una possibilitat per a que aparegui un sol pic és que hi hagi un canvi en la polaritat de l'enllaç degut, per exemple, a un canvi en el seu entorn. Aquest canvi de polaritat es traduirà en un augment o una disminució del coeficient d'absorció d'aquell pic i per tant donarà com a resultat un pic positiu o negatiu aïllat. Un exemple d'aquest tipus de pic seria el canvi en l'entorn d'una Tyr.

5) Una altra possibilitat de que aparegui només un pic és que hi hagi un canvi en l'orientació d'una estructura orientada com podria ser una hèlix α .

1.5.4. Mètodes per a l'assignació dels pics

L'espectroscòpia d'infraroig és una tècnica que ens permet obtenir molta informació sobre la proteïna d'estudi, però a vegades justament tota aquesta informació pot ser un inconvenient a l'hora d'analitzar-la. En el cas dels espectres de diferència s'observen un gran nombre de pics de difícil assignació degut a que és difícil discernir a vegades entre estructura secundària i cadenes laterals. A més a més, l'assignació d'un pic a una estructura secundària no deixa de ser una assignació amb una certa ambigüïtat si no es disposa d'informació addicional. Per tant, és necessari fer servir mètodes que ens permetin una assignació el més acurada possible dels pics que formen els espectres de diferència. Hi ha varies estratègies a seguir:

1) Espectres de diferència fent servir mutants. Una mutació pot donar lloc a un canvi en la funció de la proteïna, això permetrà, comparant amb els espectres de diferència de la proteïna salvatge, identificar pics deguts a la vibració de l'aminoàcid que hem substituït (Brown et al., 1995; Rothschild, 1992) o pics deguts als canvis en la funció de la proteïna causats per la mutació.

2) Bescanvi hidrogen/deuteri. Al bescanviar els hidrògens dels enllaços per deuteris, les vibracions d'aquests sofriran un desplaçament a números d'ones menors. Els desplaçaments de les bandes de l'espectre dependrà de les estructures a que pertanyin i de l'accessibilitat del medi aquós a aquesta part de la proteïna (Baenziger i Chew, 1997; Kluge et al., 1998; von Germar et al., 2000).

A l'hora d'analitzar aquest experiment s'haurà de tenir en compte els diferents tipus de desplaçament dels pics i les possibles superposicions i

desemmascaraments dels pics degut a aquests desplaçaments. Un exemple esquemàtic d'aquests efectes es pot observar en la figura 1.25.

3) Marcar la proteïna amb isòtops. Com en el bescanvi H/D, es pot substituir un àtom d'un aminoàcid per un isòtop d'aquest àtom. El canvi de massa d'aquest àtom provocarà un desplaçament del pic que correspongui a la vibració de l'enllaç d'on forma part aquest àtom (Sonar et al., 1994).

4) Orientació. Fent servir llum

polaritzada a l'hora de fer les diferències s'obtidran espectres de diferència només de les estructures o fins i tot d'aminoàcids que estiguin orientats (Marrero i Rothschild, 1987b; Tanimoto et al., 2004).

5) Comparar diferents substrats. Fent diferències de la proteïna interaccionant amb varis substrats de la proteïna es pot obtenir informació comparant les bandes que són comunes entre els substrats i les que difereixen (Ryan et al., 2001).

6) Espectres de diferència resolts en el temps. Amb aquesta tècnica no només obtenim les diferències degudes a un canvi des d'un estat A a un estat B, si no que a més ens permet veure l'evolució d'aquests canvis conformacionals al llarg del temps i observar quines són les primeres estructures en sofrir aquests canvis (Gerwert, 1999; Troullier et al., 1996).

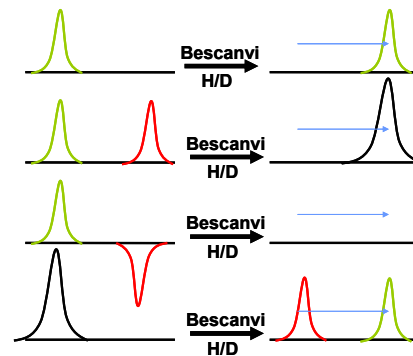


Figura 1.25. Esquematzació d'alguns possibles efectes del desplaçament dels pics degut al bescanvi H/D.

Els pics en verd corresponen a les estructures que es veuen afectades pel bescanvi H/D, els vermells a les que no es veuen afectades i els negres a les que estan compostes per ambdues tipus d'estructures. Les línies blaves corresponen al desplaçament que realitzen les bandes degut al bescanvi H/D.

2. OBJECTIUS

Fins no fa gaire els transportadors de membrana eren proteïnes poc conegudes. A partir de la purificació d'alguns d'aquests transportadors, que permetia l'estudi amb tècniques biofísiques, i sobretot de l'obtenció de les primeres estructures 3D, s'ha pogut començar a aprofundir en el seu estudi estructural. Però la dificultat de purificació d'aquestes proteïnes fa que encara no es tinguin gaires transportadors cristal·litzats. No obstant, les estructures 3D no deixen de ser la proteïna atrapada en un estat determinat de la seva funció i a més, moltes d'aquestes estructures corresponen a la proteïna solubilitzada i no reconstituïda en lípids que seria el seu entorn natural. Per tant, la utilització de tècniques biofísiques que puguin aportar informació sobre la relació entre l'estructura i la funció d'aquests transportadors reconstituïts en lípids, són fonamentals per entendre la natura del seu funcionament.

Per tant, el **primer objectiu** d'aquest treball és la implementació de la tècnica per tal d'obtenir espectres de diferència mitjançant l'espectroscòpia d'infraroig d'ATR-FTIR. Dintre aquesta part s'intentaran trobar les condicions més idònies per tal d'obtenir els espectres de diferència i les possibles fonts d'artefactes per l'obtenció d'aquests. Un cop realitzats tots els controls, el **segon objectiu** serà l'obtenció dels espectres de diferència deguts a la unió de substrats en la MeIB. Finalment, un cop s'hagin obtingut aquests espectres de diferència el **tercer objectiu** és realitzar una assignació el més acurada possible de cada pic de l'espectre de diferència de la MeIB mitjançant la utilització de varis mètodes, com ja s'ha explicat a la introducció. Una vegada realitzada aquesta assignació, afegida a l'obtenció d'altres informacions sobre l'estructura i funció de la MeIB que es puguin deduir dels espectres de diferència, es pretén formular una hipòtesi sobre els canvis conformationals que ténen lloc en la unió dels lligands.

3. MÈTODES EXPERIMENTALS

3.1. Materials utilitzats

El p-nitrofenil α -D-(6- 3 H)galactopiranòsid ($[^3$ H] α -NPG) es va sintetitzar al Laboratoire de Physiologie des Membranes Cellulaires, sota la direcció del Dr. B. Rosseau i va ser proporcionat pel Dr. Gérard Leblanc. La síntesi del LAPAO ((3-lauryl-amido)-N,N'-(dimethylamino) porpyalmine oxide) es va realitzar tal com està descrit per Brandolin et al. (1980) i va ser proporcionat pel Dr. Gérard Leblanc. El dodecyl maltoside (DM) es va obtenir de Boehringer Mannheim i la resina de Ni-NTA de Quiagen. Els SM-2 Bio-Beads es van obtenir de Bio-Rad. Els lípids totals d'*Escherichia coli* es van obtenir d'Avanti Polar Lipids. La fosfatidilcolina es va obtenir en el nostre laboratori a partir de rovells d'ou mitjançant un procediment que es basa en el mètode posat a punt per Singleton et al., (1965) amb lleugeres modificacions. En la primera etapa es duen a terme extraccions i precipitacions en dissolvents orgànics i en la segona etapa es realitza una cromatografia en columna d'alúmina. A l'hora de preparar medis lliures de Na⁺ (< 0,01% en pes) es van fer servir productes altament purificats de Merk i de Sigma. La resta de materials utilitzats es van obtenir de fonts comercials.

3.2. Obtenció de la MelB, el R141C o el 3SV (Cys-less) purificats i reconstituïts

La purificació d'aquestes proteïnes comprenen diferents passos on al final s'obté la proteïna purificada solubilitzada en detergent. Aquesta proteïna purificada es reconstitueix en liposomes per tal de tenir una major aproximació a l'estat natiu de la proteïna i a més és una condició necessària per tal de que la mostra quedi adherida al cristall d'ATR.

3.2.1. Obtenció de les vesícules invertides de membrana (IMVs) amb MelB, R141C o 3SV recombinants

La MelB salvatge es va obtenir a partir de cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades amb el plàsmid recombinant pK31ΔAHB, tal com està descrit per Pourcher et al. (1995), que inclou un promotor tac dins el gen *melB*, acabat amb una successió de 6 triplets que es tradueixen per His a l'extrem 3'. Aquestes 6 histidines (6 His tag) fan que la MelB tingui una alta afinitat pels ions níquel, de manera que permeten la seva purificació fent servir una columna de Ni-NTA.

El mutant 3SV és una MelB sense les seves cisteïnes. La Cys-235 es va reemplaçar per una valina i les Cys-110, Cys-310 i la Cys-364 per una serina. La substitució de les Cys es va produir per reaccions en cadena de polimerases (PCR) utilitzant encebadors adequats (27-30 nucleòtids). La MelB C-less continua tenint la propietat de co-transportar melibiosa amb l'ajuda d'un gradient de Na⁺, Li⁺ o H⁺ (Weissborn et al., 1997). A més de les substitucions de les cisteïnes, tal com es va fer per la MelB, s'inclou un promotor tac dins el gen *melb* C-less, corresponent a les histidines a l'extrem 3', per a la seva posterior purificació.

El mutant R141C es va obtenir a partir de cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades amb el plàsmid recombinant pk95ΔAHB que contenia el gen *melB*, sense les seves cisteïnes natives (3SV). La substitució de l'Arg141 per una cisteïna es va realitzar mitjançant la tècnica de PCR. Finalment, també es va afegir la cua d'histidines.

Les cèl·lules acabades de transformar amb la MelB salvatge o amb algun dels mutants es van fer créixer en 2 L de medi M9 (Life technologies, catàleg nº 10914-018) a 30°C amb un suplement de carboni i ampicilina (100 mg/ml) en el centre de fermentació de Marsella i posteriorment es van congelar a -80°C. Al principi de la purificació les cèl·lules es van descongelar i es van resuspendre a una concentració de 5 mg/ml en un medi amb tampó Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 50mM i β -mercaptoetanol 5mM. A partir d'aquest moment tots els passos es van realitzar a 4°C. Per tal de desestabilitzar la membrana bacteriana es van afegir 5 mM d'EDTA. A l'hora de trencar les cèl·lules i formar les vesícules es van fer servir dos mètodes. El primer, la French Press. A les cèl·lules se li van afegir 20mg/ml de DNAsa i RNAsa i 15mM MgSO₄. Tot seguit les cèl·lules es van sotmetre a una pressió de 1200 Psi mitjançant una French Press, afegint posteriorment un excés d'EDTA (15 mM). El segon mètode va consistir en trencar les cèl·lules fent-les passar dos cops per un microfluidificador (microfluidaizer 110S) amb una pressió d'entrada de 4 bars i sense fer servir la recirculació. El microfluidificador, com la French Press, augmenta la pressió dintre una cambra per tal de trencar les cèl·lules. A partir d'aquí els passos per a la purificació van ser els mateixos. Les restes bacterianes es van centrifugar a 1200 g durant 5 minuts i les vesícules (que quedaven en el sobrenadant) es van rentar amb 25 ml de tampó Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 50mM i β -mercaptoetanol 5mM 2 cops. Per tal de precipitar les vesícules s'ultracentrifugaven a 280000 g durant 20 minuts. Un cop acabades les neteges es guardaven les vesícules, resuspeses en 15 ml en el mateix tampó de rentat i congelades a -80°C.

3.2.2. Purificació de la MelB i dels mutants mitjançant resines

Tots els passos de la purificació es va realitzar a 4°C i es van dur a terme essencialment tal com descriu Pourcher et al. (1995). 15 ml de vesícules es van descongelar i separar en tubs d'ultracentrífuga de 25 ml. Tot seguit es van rentar amb 25 ml de tampó Tris-HCl 20mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5mM. Posteriorment les proteïnes de membrana es van solubilitzar amb LAPAO 1% (v/v) (2,5 ml de LAPAO 10% en un volum final de 25 ml) durant 20 minuts i es van centrifugar a 280000 g durant 20 minuts més per tal d'eliminar les restes de membrana bacteriana. Les proteïnes

solubilitzades es van incubar durant 1 hora amb 7 ml de resina de níquel Ni-NTA. La columna de Ni va ser prèviament rentada 2 cops amb 50 ml d'H₂O, 3 cops amb 50 ml de tampó Tris-HCl 20mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM i un cop amb 50 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 10 mM, 10 mM melibiosa, LAPAO 0.1% (v/v). Després es va construir una columna (columna 20 ml BioRad Econo-Pac[®] 732-1010) amb la resina de Ni-NTA i seguidament, es va procedir als rentats de la columna. El primer rentat amb 10 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 10 mM, 10 mM melibiosa, LAPAO 0.1% (v/v). El segon rentat amb 60 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 10 mM, 10 mM melibiosa, LAPAO 0.1% (v/v). El tercer amb 30 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 10 mM, 10 mM melibiosa, DM 0.1% (v/v). Per últim, es va afegir el tampó d'elució Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 100 mM, 10 mM melibiosa, DM 0.1% (v/v), per tal de desplaçar la interacció dels ions níquel amb les histidines. L'elució de la proteïna es va seguir mesurant l'absorbància a 280 nm i sabent que la concentració de proteïna en mg/ml és igual a $Abs_{280}/1,5$. A l'hora d'eliminar la fracció de proteïnes contaminants que encara quedaven junt amb la MelB es va fer passar l'elució per una columna de bescanvi aniònic (MacroPrep Q), la qual reté les proteïnes contaminants i deixa passar la MelB. Es van netejar 14 g de resina 3 cops amb 200 ml d'H₂O, 3 cops amb 50 ml de tampó Tris-HCl 20mM pH 8, NaCl 600 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM i 1 cop amb 50 ml de tampó Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 100 mM, 10 mM melibiosa, DM 0.1% (v/v) (tampó d'elució). Les fraccions de l'elució de la columna de Ni que contenien proteïna es van ajuntar i es van fer passar per la columna (columna 10 ml BioRad Poly-Prep[®] 731-1550) de bescanvi aniònic fent servir com a tampó d'elució Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5mM, Imidazol 100 mM, 10 mM melibiosa, DM 0.1% (v/v). L'elució de proteïna es va seguir igual que en el cas de la columna de Ni.

3.2.3. Reconstitució de la MelB i els mutants R141C i 3SV

La reconstitució de la proteïna es va fer mitjançant lípids d'*E. coli* i també amb lípids de fosfatidilcolina d'ou (EPC), en el cas de la MelB salvatge, amb una proporció lípid/proteïna de 2 (pes/pes), ja que segons un estudi realitzat anteriorment per espectroscòpia de fluorescència (Dave, 2001), la proteïna és més activa en aquestes condicions. Els lípids es van preparar amb el mètode de congelació-descongelació. La quantitat desitjada de lípid es va dissoldre en cloroform i es va assecar amb el rotavapor fins que es va formar un film de lípids. Es va afegir H₂O en el baló que contenia el film de lípids i es va vortexar per tal de formar els liposomes. Aquesta suspensió es va congelar amb nitrogen líquid i es va descongelar amb aigua calenta. La congelació-descongelació es va repetir 5 cops. Posteriorment els liposomes es van extrossionar fent passar la suspensió per membranes amb porus de 100 µm per tal de tenir una població final de liposomes homogènia i unilamelar. El procés de reconstitució va partir de la MelB solubilitzada en DM (0.1%, v/v) i es va barrejar amb lípids d'*E. coli* o d'EPC per tal de donar una proporció lípid/proteïna de 2 (p/p). Per tal d'extreure el detergent, es va deixar la mostra en agitació constant durant tota la nit amb boletes de poliestirè (SM-2 Bio-Beads) a 4°C, tal com descriu Rigaud et al. (1988). Aquestes boletes de poliestirè són capaces de segrestar les molècules de detergent en presència de lípids. Per cada ml de proteïna solubilitzada s'afegien 120 mg de Bio-Beads. El total de Bio-Beads es va afegir en 4 addicions separades cadascuna de 10 minuts. Un cop acabada la reconstitució, es van filtrar les boles de poliestirè amb un filtre de llana de vidre, i els proteoliposomes formats es van netejar mitjançant tres cicles de congelació-descongelació-sonicació. La suspensió de proteoliposomes es va ultracentrifugar a 280000 g durant 20 minuts. El pelet es va resuspendre en uns 10 ml. La suspensió de proteoliposomes es congelà amb nitrogen líquid, tot seguit es descongelà al bany maria a 30°C i finalment es sonicà 2 cops durant 10 segons amb un bany sonicador (Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6) a màxima potència. El tampó fet servir per a la neteja va ser MES 20mM, KCl 10mM, pH 6.6. Amb aquest procés es trenquen els proteoliposomes i es pot netejar tant el seu interior com el seu exterior, per tal de que no hi quedin restes ni de Na⁺ ni de melibiosa. Aquest procés de neteja es va repetir 2 cops més. Al final el pellet de proteoliposomes es va

resuspendre amb tampó MES 20mM, KCl 10mM, pH 6.6 per tenir una concentració final aproximada de 7mg/ml de proteïna.

3.3. Mesura de la concentració i de l'activitat de la MelB i els mutants

La concentració de proteïna es va mesurar segons el mètode Lowry et al. (1951), utilitzant seroalbúmina com estàndard. Per obtenir la concentració de proteïna solubilitzada es mesurava l'absorbància de la solució de proteïna a 280 nm sabent que la concentració en mg/ml és igual a $Abs_{280}/1,5$.

Per a mesurar l'activitat de la MelB reconstituïda en lípids, es va utilitzar el mètode de fixació de sucre radioactiu [α - 3 N]NPG ja descrit anteriorment (Damiano-Forano et al., 1986). Tots aquests experiments es van realitzar en el Laboratoire de Physiologie des Membranes Cellulaires, Université de Nice, a Villefranche sur Mer. Primerament, es van incubar les mostres a analitzar a temperatura ambient amb monensina 0.75 μ M i CICCIP (carbonyl-cyanide-trichloromethoxy phenylhydrazine dicycloheyl carbosiimide) 10 μ M. La cèl·lula de diàlisi amb flux continu consta de dues cambres situades una sobre l'altra, separades per una membrana permeable a les molècules petites però no als proteoliposomes. A la cambra inferior es va injectar tampó i les fraccions es van anar recollint a la sortida. La suspensió de proteoliposomes o de MelB solubilitzada es va dipositar a la cambra superior sota agitació constant. Tot seguit es va afegir 1 μ M d'un anàleg tritiat de la melibiosa (3H)- α -NPG (0.8 mCi/mmol) i després de deixar-ho equilibrar, el sucre que estava fixat es va desplaçar amb concentracions creixents del mateix sucre no radioactiu. Al final de la manipulació, es va afegir un excés de sucre per tal de desplaçar tot el sucre radioactiu fixat. Les constants de dissociació del α -NPG radioactiu (K_D) i el nombre màxim de llocs de fixació (B_{max}) es van calcular gràficament, utilitzant la representació de Scatchard (Scatchard, 1949).

3.4. Comprovació de l'estat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència, columna d'exclusió molecular i espectroscòpia d'infraroig

Per tal d'assegurar un bon estat de la mostra després de les purificacions, es va realitzar una comprovació de l'activitat de la MelB per fluorescència, mesurant la fluorescència intrínseca (Mus-Veteau et al., 1995). La prova es basa en els canvis en la fluorescència dels residus de Trp, com a conseqüència de la unió dels substrats.

Aquests experiments es van realitzar a 20°C amb un fluorímetre SLM AMINCO 8000, de SLM instruments, inc. La longitud d'ona d'excitació va ser de 297 nm. Les mesures es van realitzar en cubetes de quars de 1 x 1 cm amb mostres de proteïna reconstituïda a una concentració de 20 µg/ml, prèviament sonicades 2 cops durant 10 segons amb un bany sonicador (Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6) a màxima potència per tal d'evitar agregacions. Aquestes cubetes disposen d'un espai a la seva part inferior que permet que hi hagi una agitació constant durant l'experiment, per tal que la mostra no sedimenti i que les addicions de substrat es barregin correctament. Les concentracions de les addicions van ser les mateixes que les descrites per Mus-Veteau et al. (1995). Un cop fet l'espectre de la mostra sense substrats, es va afegir NaCl a una concentració final de 10mM i es va adquirir l'espectre. Seguidament, es va afegir melibiosa a una concentració final de 10 mM i es va tornar a adquirir un espectre. Els càlculs de l'activitat es van realitzar mitjançant l'equació:

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

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

Una altra prova per tal de comprovar l'estat de la mostra va ser quantificar el seu estat d'agregació, ja que la proteïna agregada es purifica juntament amb la no agregada. Per a la proteïna solubilitzada es va fer servir

una columna d'exclusió molecular Superdex 200 prep. grade (Pharmacia Biotech), la qual permet degut a la diferència de pes molecular la separació entre la proteïna agregada i la no agregada. El tampó d'elució va ser Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5mM, Imidazol 10 mM, DM 0.02% (pes/pes). Per a la proteïna reconstituïda es va fer servir l'espectroscòpia d'infraroig, on les estructures corresponents a proteïna agregada absorbeixen en una zona molt característica de l'espectre (1627 cm^{-1} (Heimburg i Marsh, 1993)).

3.5. Adquisició dels espectres de diferència induïts per la unió de substrats

3.5.1. Espectres de diferència en H₂O

Per obtenir els espectres de diferència induïts per la unió de substrats en H₂O, es van estendre 150 µg de MelB salvatge, reconstituïda en lípids d'*E. coli* o EPC, o d'algun dels seus mutants reconstituïts en lípids d'*E. coli* (1/2; pes/pes), de forma homogènia sobre un cristall de germani (Harrick, Ossining, NY) (veure figura 3.1) i assecats amb un flux de nitrogen sec. La mostra va ser exposada a un flux de tampons amb o sense els substrats de la MelB (Na⁺, Li⁺ i melibiosa) amb un cabal de 1,5 ml/min. El temps d'exposició va ser de 2 minuts pel tampó que contenia els substrats i de 10 min pel tampó netejador (30 min quan el tampó amb substrat contenia 50 mM melibiosa). El canvi dels tampons era dirigit per una electrovàlvula que estava controlada per un ordinador. Abans de canviar de tampó,

s'obtenien 500 escombrats de la mostra a 4 cm⁻¹ de resolució. Per tal d'incrementar la relació senyal/soroll, es van adquirir un total de 50 espectres i es va fer la mitjana d'aquests espectres acumulant un total de 25000 escombrats per a cada diferència. Cada experiment dura aproximadament 10

hores i es van realitzar un mínim de 2 experiments per separat amb mostra nova per a cada condició. Tots els espectres van ser adquirits a 20°C fent servir un espectròmetre d'infraroig Bio-Rad FTS6000 equipat amb un detector

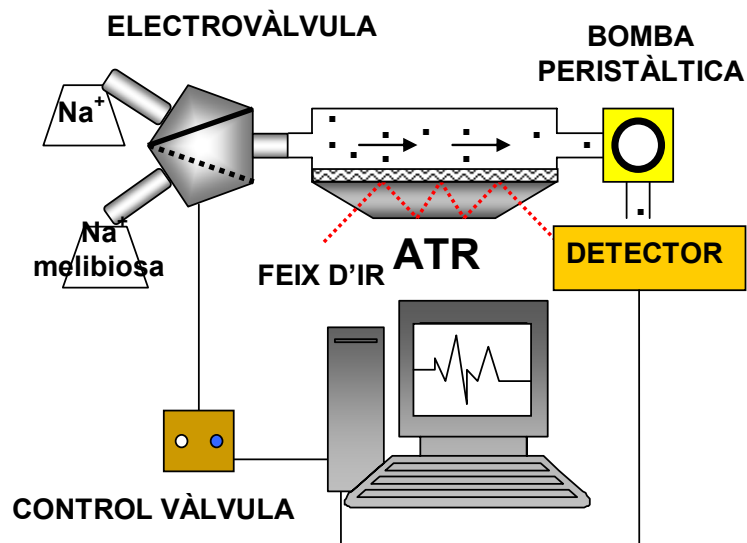


Figura 3.1. Esquematització del muntatge utilitzat per realitzar els espectres de diferència induïts per la unió de substrats.

mercuri-cadmi-tel·lur i purgat contínuament amb aire sec per tal d'extreure el vapor d'aire. La temperatura del laboratori també es va mantenir a 20°C.

3.5.2. Espectres de diferència en D₂O

Pels espectres de diferència induïts per la unió de substrat en D₂O es va fer servir bàsicament el mateix procediment que en H₂O, però amb algunes modificacions. Es van estendre 150 µg de MelB salvatge reconstituïda en lípids d'*E. coli* (1/2; pes/pes), de forma homogènia sobre un cristall de SeZn (Harrick, Ossining, NY) i assecats amb un flux de nitrogen sec. La mostra es va deixar incubant en D₂O i en presència de Na⁺ durant 1000 min per tal d'obtenir el major bescanvi possible (Dave et al., 2002). A continuació la mostra va ser exposada a un flux de tampons amb o sense substrats de la MelB. El temps d'exposició va ser de 2 minuts pel tampó amb substrat i de 10 minuts pel tampó netejador. Abans de canviar de tampó s'adquirien 1000 escombrats. En cada experiment es realitzaven un total de 5 diferències. Per tal de millorar la relació senyal/soroll es van fer 2 experiments per separat amb mostra nova acumulant finalment 10000 escombrats.

Es van realitzar espectres de diferència amb el cristall de ZnSe en H₂O per tal de poder veure les variacions entre un espectre adquirit amb un cristall o un altre. El procediment va ser el mateix que el descrit pels espectres de diferència fent servir el cristall de Ge.

3.5.2.1. Anàlisi dels espectres de diferència en D₂O

Per tal de calcular el bescanvi de la proteïna exposada a D₂O, a partir dels espectres d'absorbància, se segueix la disminució de l'àrea de l'amida II. Aquesta àrea es divideix per l'àrea de l'amida I per tal de corregir l'inflament del film, i la consegüent disminució de l'àrea. Les àrees d'integració per a l'amida I i II van ser de 1696 cm⁻¹ a 1600 cm⁻¹ i de 1565 cm⁻¹ a 1525 cm⁻¹ respectivament.

Per a calcular el bescanvi a partir dels espectres de diferència es va seguir igualment la disminució de l'àrea dels pics de l'amida II de l'espectre de diferència, fent servir l'àrea dels pics de l'amida I com a aproximació per a normalitzar l'àrea de l'amida II en H₂O i en D₂O. El bescanvi, en aquest cas, també es va calcular a partir de la disminució de l'àrea de les bandes de l'amida A. L'àrea d'integració per a l'amida A va ser de 3400 cm⁻¹ a 3225 cm⁻¹.

Degut que en aquest cas no podem observar les bandes en l'amida A en l'espectre de diferència en H₂O degut a l'elevat soroll en aquesta regió, es va calcular el bescanvi fent servir l'espectre d'absorbància en el film sec. En aquest cas també es va dividir l'amida A per l'amida I per tal de normalitzar les amides en film sec i en D₂O. Les àrees d'integració per a l'amida I i amida II van ser les mateixes que les fetes servir pel bescanvi en els espectres d'absorbància però amb algunes modificacions que permetien incloure els pics que tenien part d'absorció dintre la seva amida respectiva. En la diferència Na⁺ vs. H⁺ l'àrea d'integració de l'amida I en la diferència en H₂O va ser de 1710 a 1618 cm⁻¹ i en D₂O de 1697 a 1616 cm⁻¹. L'àrea d'integració de l'amida II va ser de 1560 a 1524 cm⁻¹ en els dos casos. En la diferència melibiosa·Na⁺ vs. Na⁺ l'àrea d'integració de l'amida I en H₂O va ser de 1700 a 1610 cm⁻¹ i en D₂O de 1700 a 1608 cm⁻¹. L'àrea d'integració per l'amida II va ser de 1558 a 1521 cm⁻¹ en els dos casos.

3.5.3. Correcció dels espectres de diferència

Un espectre de diferència experimental té 4 contribucions possibles:

I) Espectre de diferència de la mostra (proteïna i lípid) induït per la unió dels substrats; II) espectre de diferència de l'aigua induït per la presència dels substrats (Venyaminov i Kalnin, 1990a); III) absorbància dels substrats (en el nostre cas la melibiosa, ja que els cations no absorbeixen); IV) canvi en l'inflament del film, amb un aparent guany/pèrdua de mostra amb un respectiu pèrdua/guany d'aigua. L'última contribució es va corregir restant, de la diferència obtinguda, un espectre d'absorbància dels proteoliposomes. El factor de resta va ser aquell que va permetre la resta completa de les bandes de lípid (corresponents a la vibració de l'enllaç CH₂) a 2920 cm⁻¹ i 2850 cm⁻¹. Les contribucions II i III van ser corregides restant a l'espectre de diferència obtingut una diferència dels tampons (sense mostra). El factor de resta que es va fer servir va ser el que va permetre obtenir la zona d'absorció de l'aigua entre 3700 i 2800 cm⁻¹ plana i restar completament les bandes d'absorció degudes als substrats (la melibiosa dona una banda intensa a 1080 cm⁻¹ a més d'altres bandes de menor intensitat).

3.5.4. Desconvolució dels espectres de diferència mitjançant el mètode de la màxima entropia

Per a la desconvolució mitjançant el mètode de la màxima entropia es van fer servir bandes Lorenzianes de 7 cm^{-1} d'amplada. Aquest valor es va determinar a partir dels espectres de diferència com descriu Saarién et al., (1995). A més, per a la desconvolució es va fer servir un regularitzador de 10^{-11} en els espectres adquirits amb el cristall de Ge i de 10^{-10} en els espectres adquirits amb el cristall de ZnSe. Es declarava la convergència quan en dues iteracions consecutives, funcions consecutives i espectres consecutius variaven menys que el llindar seleccionat. Els valors per aquest dos paràmetres van ser de 10^{-5} i 10^{-4} respectivament (Lórenz-Fonfría i Padrós, 2005).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Obtenció de la MelB, del mutant R141C i del mutant 3SV purificats i reconstituïts

La purificació de la MelB es va fer seguint el protocol descrit a mètodes experimentals. Es van obtenir 50 mg de proteïna solubilitzada a partir de 60 ml (25 mg/ml) de cèl·lules. La qualitat de la purificació es va analitzar utilitzant dos tipus de proves. La primera és una electroforesis SDS/PAGE (figura 4.1). En el gel es pot observar que després de fer passar les IMV solubilitzades per la primera columna les proteïnes contaminants disminueixen (figura 4.1B). No s'observen diferències entre la proteïna solubilitzada en DDM i la reconstituïda. Per tant, es pot concloure que la proteïna està totalment purificada.

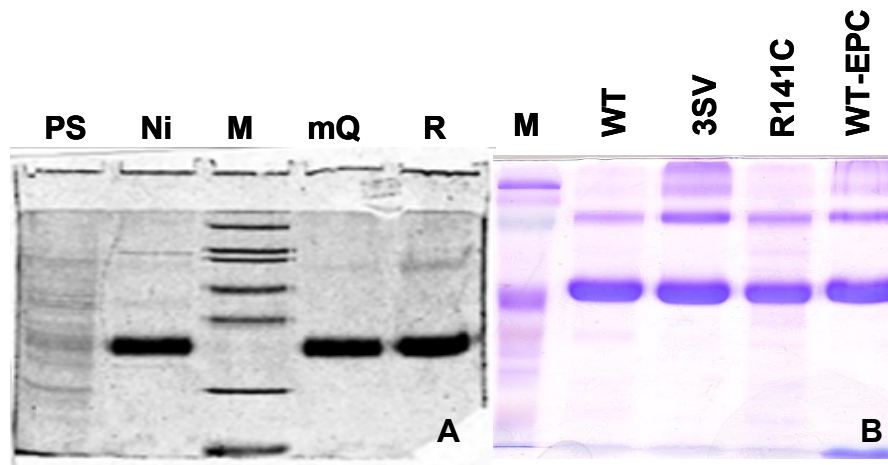


Figura 4.1. Gels SDS/PAGE de la MelB purificada.

A) Gel SDS/PAGE de la MelB salvatge. PS, proteïnes solubilitzades; Ni, mostra solubilitzada que surt de la columna de níquel; M, estàndard de pesos moleculars; mQ, mostra solubilitzada que surt de la columna Mono-Q; R, proteïna reconstituïda.

B) Gel SDS/PAGE de les diferents permeases reconstituïdes. WT, proteïna salvatge reconstituïda en lípids d'*E. coli*; 3SV, mutant sense Cys (Cys-less); R141C, mutant d'Arg; WT-EPC, WT reconstituït en lípids de fosfatidilcolina d'ou.

La segona prova és una columna d'exclusió molecular, que utilitzem per tal de comprovar si la proteïna purificada està agregada, degut a que la proteïna agregada es purifica junt amb la no agregada. En cas d'agregació s'observaria una banda a temps d'elució menor junt a la banda de proteïna no agregada. En la figura 4.2 es pot veure com la major part de la proteïna no està agregada (temps d'elució aproximat de 35 minuts) i només s'observa una petita

proporció de proteïna agregada a temps menors que correspondria a la banda de dímers observada en l'electroforesis anterior (figura 4.1).

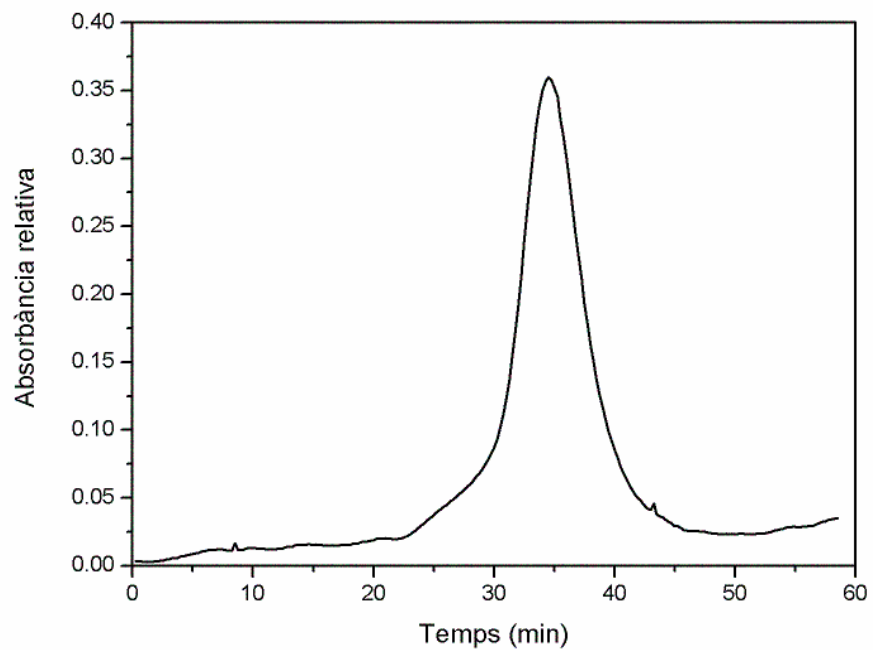


Figura 4.2. Elució al llarg del temps en una columna d'exclusió molecular de la MeIB purificada.

Es va fer servir resina Superdex 200 de Pharmacia Biotech i pel tampó d'elució: glicerol 10%, TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 10 mM, DDM 0,02%, pH 8.

4.2. Comprovació de l'activitat de les mostres per espectroscòpia de fluorescència

Per tal de comprovar el nivell d'activitat de la mostra després del temps passat entre la seva purificació i abans de fer l'experiment es va fer servir l'espectroscòpia de fluorescència. El procediment és bàsicament aquell descrit per Mus-Veteau et al. (1995) i consisteix en seguir els canvis de fluorescència que sofreixen els Trp quan els substrats s'uneixen a la MelB. En primer lloc es va obtenir l'espectre d'emissió de la MelB reconstituïda amb lípids d'*E. coli* i posteriorment els espectres després d'afegir primer 10 mM de NaCl i després 10 mM de melibiosa.

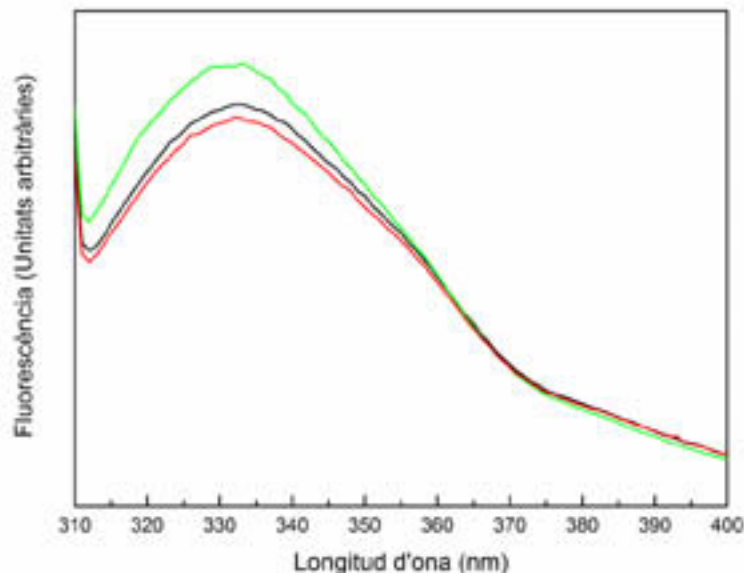


Figura 4.3. Fluorescència intrínseca de la MelB reconstituïda amb lípids d'*E. coli* en diferents condicions.

Espectres d'emissió, per una longitud d'ona d'excitació de 297 nm. *Línia negra*, MelB sense substrats. *Línia vermella*, MelB més 10 mM de NaCl. *Línia verda*, MelB (10 mM NaCl) més 10 mM de melibiosa.

La figura 4.3 mostra la fluorescència intrínseca de la MelB i com varia degut a la unió dels substrats. Amb l'addició del NaCl hi ha una disminució d'un 3% i amb l'addició de la melibiosa hi ha un augment total del senyal d'un 13%. Aquests valors són molt pròxims a aquells descrits per Mus-Veteau et al. (1995). Per tant, podem concloure que la proteïna es troba en bon estat funcional.

4.3. Comprovació de l'estat de les mostres mitjançant espectroscòpia d'infraroig

Una altra forma d'analitzar l'estat de la proteïna purificada és mitjançant un espectre d'absorbància d'infraroig. Després de cada purificació i abans de cada espectre de diferència es feia un espectre d'absorbància de la proteïna. Amb aquest espectre es podia saber si el procés de reconstitució havia sigut correcta i si la relació lípid/proteïna era l'esperada. Per altra banda, permetia saber si la proteïna estava agregada, ja que les proteïnes agregades tenen una banda característica al voltant de 1627 cm^{-1} (Heimburg i Marsh, 1993).

La figura 4.4 mostra els espectres d'absorbància de la MelB salvatge reconstituïda en lípids d'*E. coli* i lípids d'EPC i els mutants R141C i 3SV. Tots quatre espectres mostren una relació lípid/proteïna propera a 2 i per tant idònia pels experiments de diferència. A més no s'observa cap banda significativa a prop de 1627 cm^{-1} indicativa d'agregació.

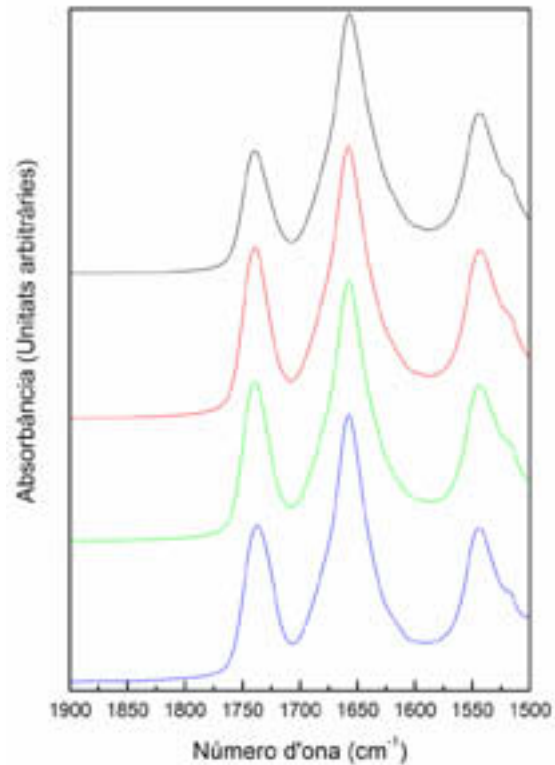


Figura 4.4. Espectres d'ATR-FTIR de films secs de la MelB i de diferents mutants seus reconstituïts amb lípids d'*E. coli* (1:2 p/p). *Línia negra*, MelB WT. *Línia vermella*, mutant R141C. *Línia verda*, mutant 3SV. *Línia blava*, WT-EPC.

4.4. Controls dels espectres de diferència

4.4.1. Estabilitat del film de proteoliposomes sobre el cristall d'ATR

La primera prova que es va realitzar va ser comprovar l'estabilitat del film de proteoliposomes format sobre el cristall d'ATR, comprovar que no es perdia mostra al llarg del temps i que no hi havia problemes en l'espectre degut a possibles variacions de temperatura inadvertides. Amb aquesta finalitat, es va fer passar el mateix tampó per les dues entrades de l'electrovàlvula, després d'estendre sobre el cristall de germani un film de MelB com està explicat a mètodes experimentals. Cada 7 min s'adquiria un espectre i la vàlvula canviava l'entrada de tampó.

Com mostra l'espectre de la figura 4.5, la resta d'espectres consecutius no mostra cap

diferència, indicant que no hi ha pèrdua de proteïna al llarg del temps. És important tenir en compte que l'escala vertical és del mateix ordre que els espectres de diferència induïts per la unió de substrats (veure figura 4.12). En cas de pèrdua de proteïna esperaríem observar bandes negatives a la zona de l'amida I i de l'amida II, i també en les zones de vibració dels lípids. A més, la diferència ens mostra una bona línia base sense cap pertorbació en la zona d'absorció de l'aigua (al voltant de 1650 cm^{-1}) degut a variacions en la temperatura.

4.4.2. Efecte de la diferència de força iònica

En la preparació dels tampons hi poden haver petites diferències de força iònica d'un tampó respecte l'altre, que poden causar pertorbacions en l'espectre de diferència. Per tal d'avaluar aquest efecte, sobre un film de proteoliposomes de MelB es van fer passar dos tampons amb una diferència de

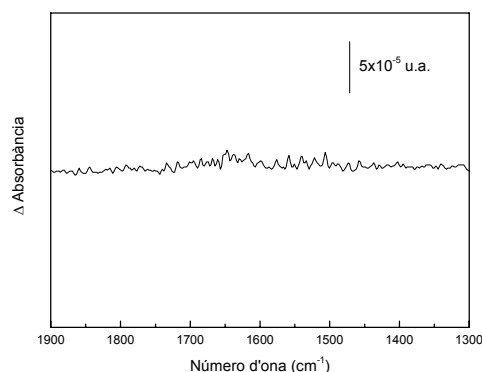


Figura 4.5. Espectre de diferència de la MelB reconstituïda en liposomes d'*E. coli* amb una relació lípid/proteïna de 2/1 (p/p). MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6 menys MelB i el mateix tampó.

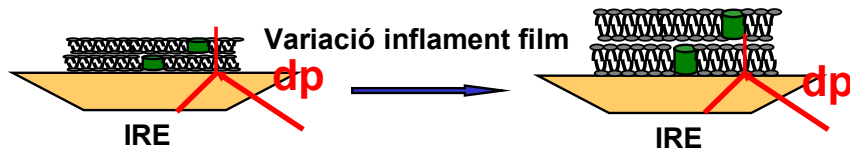


Figura 4.6. Efecte de la variació de l'inflament en el film de proteoliposomes.

Films més compactes tenen més mostra dintre la profunditat de penetració de l'ona evanescent (dp).

2 mM de KCl entre ells. La figura 4.7 mostra el resultat d'aquesta diferència on s'observen algunes bandes. Totes les bandes negatives corresponen a una aparent pèrdua de lípid i proteïna, però en realitat són degudes a una variació de la compactació del film que fa que més o menys proteoliposomes entrin dintre de la zona d'absorció de l'ona evanescent (Nyquist et al., 2001) (figura 4.6).

Per tant, un film més compacte donarà un espectre d'absorció de proteoliposomes (figura 4.7D) més intens i per tant, en restar aquest espectre al menys compactat (que tindrà menys intensitat) l'espectre de diferència resultant presentarà bandes negatives. Les bandes positives a 3350 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} (que surt una mica amagada degut a les bandes negatives de l'amida I) corresponen a l'absorció de l'aigua i són degudes a una major quantitat d'aigua entre els proteoliposomes a causa d'una menor compactació d'aquests.

Per tal de corregir aquesta variació d'inflament en el film, a

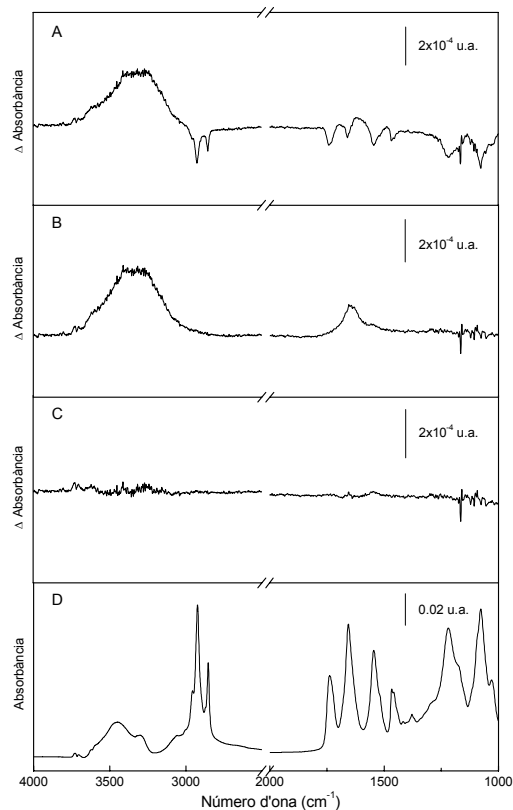


Figura 4.7. Efecte de la diferència de força iònica en els espectres de diferència.

A) Espectre de diferència de la MelB reconstituïda en liposomes d'*E. coli* amb una relació lípid/proteïna 2/1 (p/p). MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 102mM KCl, pH 6,6.

B) Espectre de la figura 4.7A després de sumar-li la falta de lípid i proteïna.

C) Espectre de la figura 4.7B després de resta-li l'excés d'aigua.

D) Espectre d'un film rehidratat de MelB després de restar la contribució de tampó.

l'espectre de diferència se li va anar sumant un espectre d'absorbància de la MelB d'un film rehidratat després de restar-li la contribució de tampó (figura 4.7D) fins no tenir bandes negatives (ni positives) ni de lípids ni de proteïna. Es va fer servir com a referència les bandes de lípids de 1850 cm^{-1} i 1920 cm^{-1} fins que no es va observar cap banda en aquesta zona (figura 4.7B). Finalment es va restar la contribució d'aigua utilitzant un espectre del tampó adquirit abans de l'experiment. A la figura 4.7C es pot veure com, després de les correccions, no s'observa cap banda en tot l'espectre. Per tant, les petites variacions de força iònica es poden corregir seguint aquest procediment. A més, les petites variacions de força iònica no indueixen cap canvi en l'estructura de la MelB i per tant cap espectre de diferència.

4.4.3 Efecte de la diferència de pH

Per tal de comprovar l'efecte de la variació en el pH, es va obtenir un espectre de diferència d'un film de proteoliposomes sotmès alternativament a un tampó a pH 6,6 i un altre a pH 6,4.

En la figura 4.8A es pot observar bandes negatives a 2920 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} , l'amida I i l'amida II corresponents a lípid i proteïna (Nyquist et al., 2001). Es va corregir l'espectre de diferència amb el mateix mètode que l'apartat anterior. En la figura 4.8B es pot observar el resultat d'aquesta

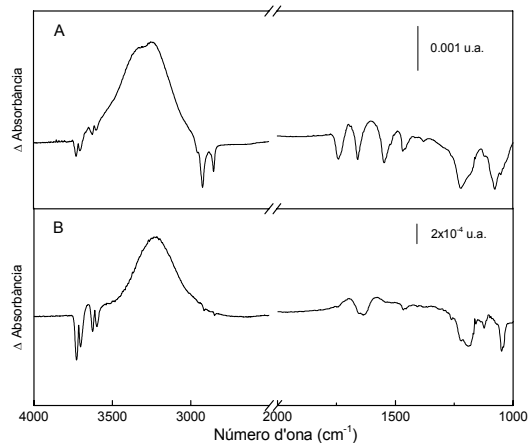


Figura 4.8. Efecte de la diferència de pH en els espectres de diferència.

A) Espectre de diferència de la MelB reconstituïda en liposomes d'*E. coli* amb una relació lípid/proteïna 2/1 (p/p). MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100mM KCl, pH 6,4.
B) Espectre de la figura 4.8A després de corregir la variació d'inflament del film.

correcció on només s'observa una pertorbació en la zona d'absorció de l'aigua semblant a la que provoca el catió Li^+ (apartat següent). En canvi, variacions de pH de fins a un ordre de magnitud donaven lloc a una variació molt gran en l'inflament del film que no permetia una correcció correcta de la diferència.

4.4.4. Contribució dels tampons en els espectres de diferència

Els tampons per sí sols també poden donar diferència. Els substrats de la MelB poden absorbir en l'infraroig com és el cas de la melibiosa o simplement poden provocar desplaçament en la banda de l'aigua com és el cas del Na⁺, el Li⁺ i la melibiosa (Goormaghtigh et al., 1994b; Scheirlinckx et al., 2004).

La figura 4.9 mostra els espectres de diferència de tampons. Sobre el cristall de Germani (sense lípids ni proteoliposomes estesos sobre ell) es van fer passar els tampons. Les figures 4.9A i 4.9B mostren els espectres de diferència entre tampons amb Na⁺ i Li⁺ respectivament. En els dos casos s'observa una diferència deguda a una variació en la posició de la banda de l'aigua. La diferència del tampó amb melibiosa es pot veure en

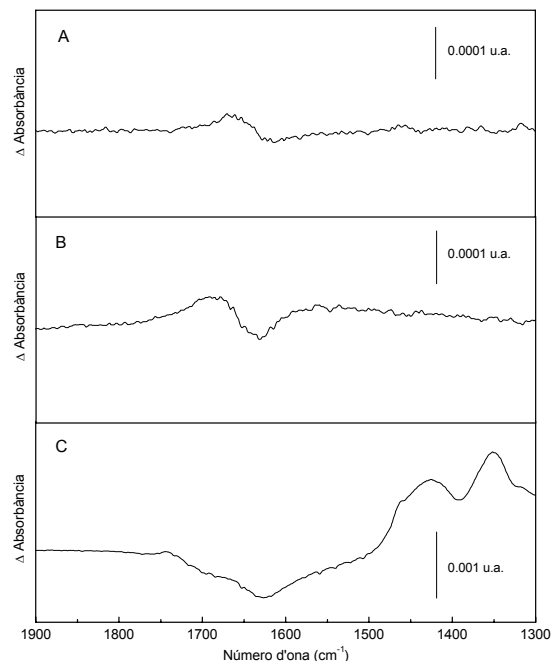


Figura 4.9. Espectres de diferència de tampons amb els substrats de la MelB.

A) 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

B) 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6 menys 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

C) 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6.

la figura 4.9C. La melibiosa absorbeix en la zona de l'amida I i l'amida II i per tant va ser necessari restar la seva contribució a la diferència final.

4.4.5. Espectres de diferència de lípids d'*E. coli* causats pels substrats

Per tal d'assegurar que els lípids, per sí sols, no donen cap banda en l'espectre de diferència en la regió d'absorció de la proteïna deguda a una unió no específica amb els substrats de la MelB, es van realitzar diferències fent servir lípids sols com a mostra, en lloc de MelB reconstituïda.

Un film de lípids d'*E. coli* es va estendre i assecat tal i com està explicat a mètodes experimentals. En la figura 4.10 es veuen els resultats de les

diferències realitzades. Les tres diferències són molt semblants a les diferències sense lípids (veure secció 4.4.4). En les diferències en vermell es pot observar el resultat d'haver restat a la diferència amb lípids la diferència de tampons corresponent. En cap dels tres casos s'observen bandes.

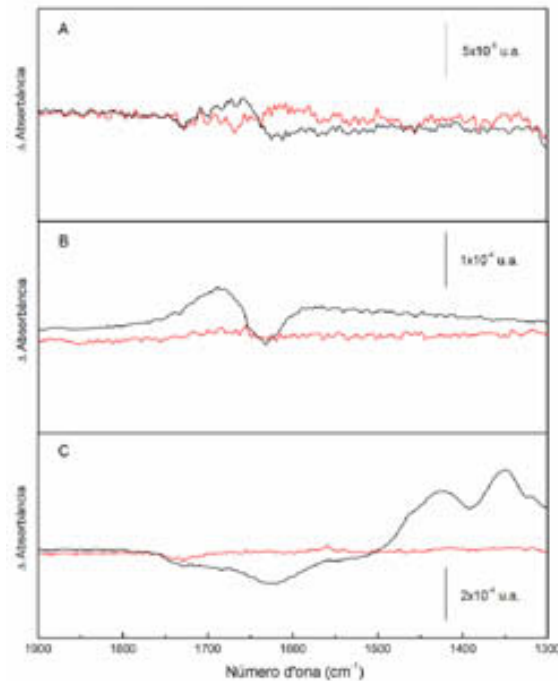


Figura 4.10. Espectres de diferència de tampons amb els substrats de la MelB sobre un film de lípids d'*E. coli*.

Els espectres en línia negra corresponen a aquestes diferències. Els espectres en línia vermella corresponen a les diferències dels tampons sobre el film de lípid després de restar la diferència del tampó corresponent (secció 4.4.4)

A) 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

B) 20 mM MES, 100mM KCl, 10mM LiCl, pH 6,6 menys 20mM MES, 110mM KCl, pH 6,6.

C) 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM melibiose, pH 6,6 menys 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6.

4.4.6. Espectres de diferència de la MelB induïts per la sacarosa

L'últim control que es va realitzar va ser comprovar que la MelB no donava diferències degudes a unions no específiques. La MelB ni uneix ni transporta sacarosa, per tant vam fer servir aquest sucre per aquest control.

Sobre un film de proteoliposomes de MelB es van obtenir espectres de diferència induïts per la sacarosa (35 mM - 50 mM) (figura 4.11). A més de la diferència amb sacarosa sola també es van obtenir els espectres de diferència en presència de Na^+ o Li^+ , que són dos ions que fa servir la MelB a l'hora del co-transport. Es va afegir Na^+ o Li^+ , depenen del cas, al tampó netejador per tal

de no tenir diferències degudes a la unió dels cations en la MelB. En els tres espectres de diferència s'observen bandes degudes a la sacarosa que s'han de corregir.

En aquest punt, cal tenir en compte quines correccions cal fer quan estudiem els efectes dels substrats:

1- Restar la contribució dels substrats (si absorbeixen).

2- Restar la variació en la posició de la banda de l'aigua deguda als substrats.

3- Corregir la variació de l'inflament del film.

Els espectres en vermell de la figura 4.11 corresponen als espectres de diferència corregits per a cada condició. Igual que la melibiosa, la sacarosa té una forta absorció cap a 1100 cm^{-1} . Aquesta banda es fa servir com a referència a l'hora de restar la contribució dels sucres. En cap de les tres diferències corregides s'observen bandes. Les bandes positives o negatives que es poden observar són degudes a CO_2 (3715 cm^{-1} , 3615 cm^{-1} i la més intensa, eliminada de la figura mitjançant un salt en l'escala, a 2350 cm^{-1}). Aquestes bandes no es resten degut a que no absorbeixen en zones d'interès i, a més, la seva resta implicaria una disminució innecessària de la relació senyal/soroll.

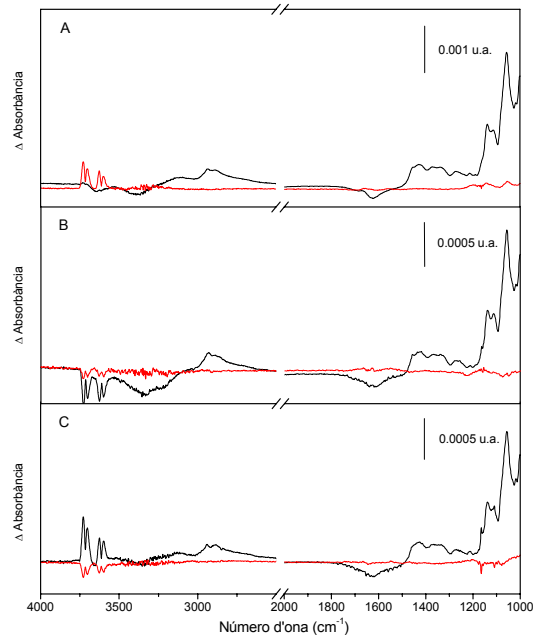


Figura 4.11. Espectres de diferència de la MelB induïts per la presència de sacarosa.

A) (*línia negra*) Espectre de diferència de la MelB reconstituïda en liposomes d'*E.coli* a proporció lípid/proteïna 2/1 (p/p). MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM sacarosa, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6. (*línia vermella*) Diferència anterior després de la correcció del tampó corresponent.

B) (*línia negra*) Espectre de diferència de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 35 mM sacarosa, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*línia vermella*) Diferència anterior després de la correcció del tampó corresponent.

C) (*línia negra*) Espectre de diferència de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 35 mM sacarosa, 10 mM LiCl, pH 6,6 menys MelB amb 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*línia vermella*) Diferència anterior després de la correcció del tampó corresponent.

4.5. Espectres de diferència de la MelB deguts a la unió de substrats

Els espectres de diferència presentats en aquest treball segueixen parcialment un ordre cronològic. Els espectres de diferència del WT en H₂O presentats en aquesta secció van ser els primers en ser adquirits. Posteriorment, es van anar obtenint altres espectres de diferència per tal d'esbrinar l'assignació i la procedència dels pics. L'assignació d'alguns pics pot ser ambigua en aquesta secció, encara que amb les diferències presentades en les següents seccions aquesta ambigüitat pot ser resolta. Per tant, a cada pic se li donarà totes les assignacions que hem trobat més probables al llarg de l'estudi encara que algunes d'aquestes assignacions passessin a ser molt poc probables després d'adquirir altres diferències. D'aquesta manera es podrà seguir l'evolució de les nostres assignacions i, el que és més interessant, es podrà observar més clarament quina informació es pot obtenir i quines ambigüitats es poden anar resolent en cadascuna de les diferències presentades en aquest treball.

4.5.1. Efecte de la unió de Na⁺ i Li⁺

El transport de melibiosa pot estar associat al co-transport de Na⁺, Li⁺ o H⁺ (Pourcher et al., 1990). Per tant, primer es van obtenir les diferències degudes a la unió de Na⁺ i Li⁺, respecte a la MelB amb l'H⁺ unit. La figura 4.12A mostra els espectres d'absorbància de dos films de MelB reconstituïts amb lípids d'*E. coli*, adquirits en la presència i absència de 10 mM de Na⁺. A primera vista sembla que els espectres siguin indistingibles. Per tant, es va calcular la diferència Na⁺·MelB vs. H⁺·MelB (figura 4.12B) en la qual s'observen una sèrie de pics positius i negatius que són conseqüència de la interacció del Na⁺ amb la MelB. Encara que els pics de la figura 4.12B apareixen suficientment estrets per pensar que no hi ha superposició entre ells, es va desconvular l'espectre per tal d'estar segurs que cap pic va ser inadvertit, sobretot en la regió de 1640 – 1600 cm⁻¹ (figura 4.12C). La relació senyal/soroll de l'espectre de diferència és prou alta per permetre la desconvolució mitjançant el mètode de màxima entropia (Lórenz-Fonfría i Padrós, 2005), com es pot veure pel poc soroll que hi

ha per sobre de 1750 cm^{-1} . La desconvolució dels mateixos espectres fent servir la desconvolució de Fourier dóna espectres semblants però amb més soroll. En els espectres desconvulats s'ha de tenir en compte que les bandes estretes estan afavorides per la desconvolució, en canvi les bandes amples són menys prominents en l'espectre desconvulat (ex. la banda a 1742 cm^{-1}). Tots els espectres de diferència presentats en aquest treball són molt reproduïbles.

La majoria dels pics es poden assignar a diversos canvis en l'estructura secundària de la proteïna que produeixen desplaçaments en les corresponents bandes d'absorció, donant lloc a parells de pics consecutius positius i negatius. Per aquesta raó, sembla que no hi ha una conversió significant entre estructures secundàries. A més a més, altres pics deuen ser deguts a les cadenes laterals. Finalment, hi pot haver contribució de lípids en els canvis estructurals al voltant de 1740 cm^{-1} o per sota de 1500 cm^{-1} .

Per entendre millor la importància d'aquests canvis d'absorbància, és útil relacionar-los als diferents intermediaris cinètics inclosos en el model de 6-estats que descriu satisfactòriament les principals propietats cinètiques de la MelB (Bassilana et al., 1988; Pourcher et al., 1990). Breument resumit, a partir de la unió de Na^+ (o Li^+) a concentracions saturants, la unió del catió dóna lloc a l'espècie catió·MelB que desplaça l'anterior espècie existent $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ (Bassilana et al., 1988). Com que la MelB no transporta el catió sense la presència del sucre, l'espècie catió·MelB estarà orientada preferentment cap a l'exterior. Amb la presència de la melibiosa conjuntament amb H^+ , Na^+ o Li^+ , la MelB cicla a través dels 6 intermediaris conformacionals assumits en el seu transport (Bassilana et al., 1988), alguns d'ells orientats cap a l'exterior i altres cap a l'interior (veure secció 1.3.1).

En la regió de l'amida I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), s'observen pics a 1658 i 1651 cm^{-1} que estan al nivell d'absorbància de dos tipus diferents d'estructura secundària prèviament ja descrits (hèlix α tipus II i I, respectivament (Dave et al., 2000)). Anteriorment ja s'havien observat canvis en les bandes desconvulades corresponents a aquestes hèlixs α (Dave et al., 2000). Degut a que els dos pics de l'espectre de diferència tenen signe oposat (1658 (+); 1651 cm^{-1} (-)), podria ser que hi hagués una interconversió de les hèlixs α que absorbeixen a 1651 i a 1658 cm^{-1} . Una segona possibilitat és que aquests pics

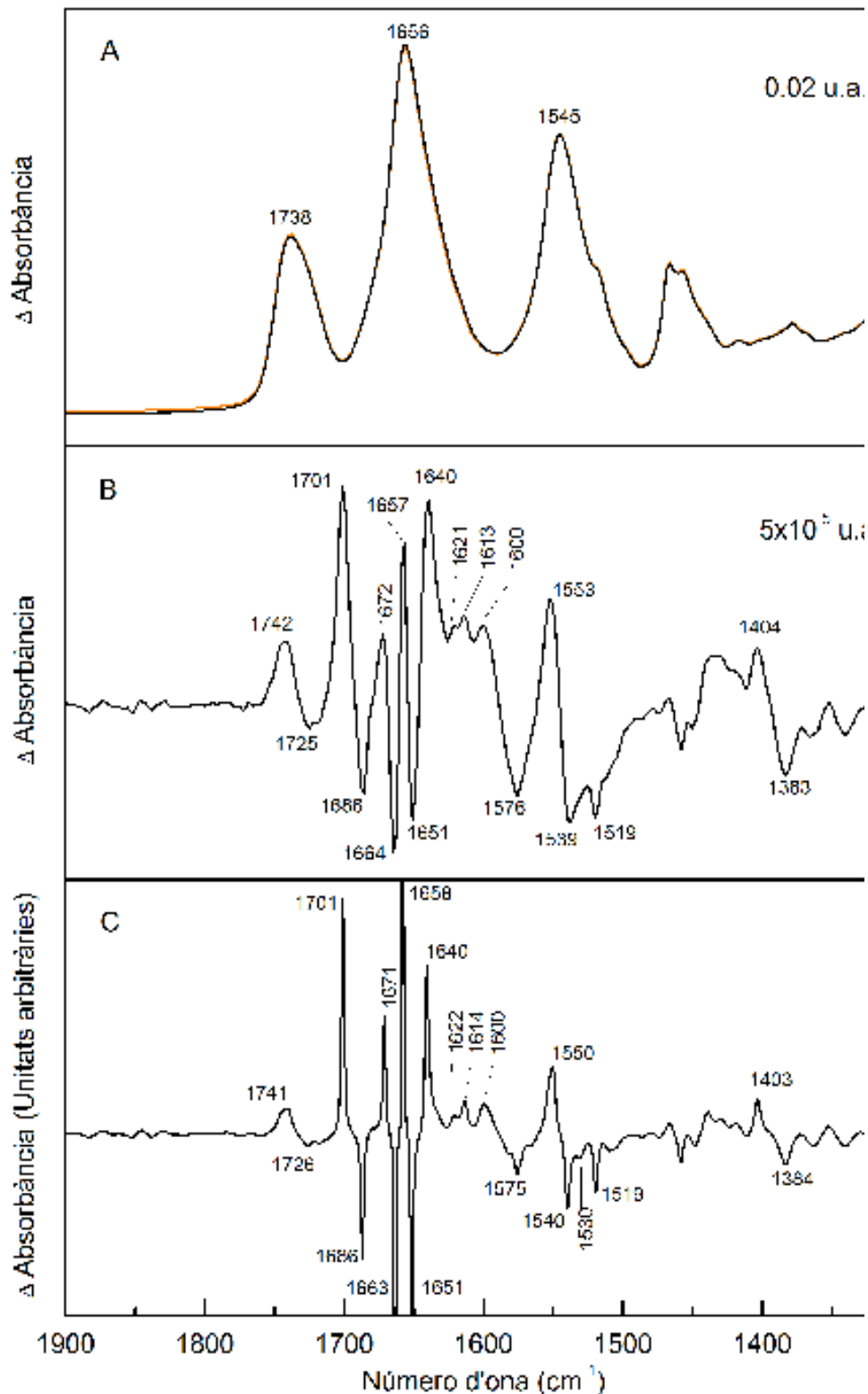


Figura 4.12. Espectre de diferència de la MelB induït per la unió de Na^+ .

A) (*Línia negra*) Espectre d'absorbància d'un film hidratat de la MelB en presència de Na^+ després de restar-li la contribució de tampó. (*Línia taronja*) Espectre d'absorbància d'un film hidratat de la MelB en absència de substrats després de restar-li la contribució de tampó.

B) Espectre de diferència de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

C) Espectre desconvulat de la diferència del pannell B.

siguin deguts a un canvi en l'orientació d'aquestes hèlixs cap a direccions oposades. Com que els proteoliposomes tenen una orientació en el film, canvis en l'orientació de les hèlixs donarà lloc a un canvi en la intensitat de les bandes corresponents a les hèlixs α (Baenziger i Chew, 1997; Bergo et al., 2003; Marsh, 1999; Rothschild et al., 1993). A més, en els estudis d'orientació de la MelB (veure secció 1.3.16.4), es va observar que la inclinació de les hèlixs transmembrana varia en afegir Na^+ (o qualsevol dels altres substrats). El pic a 1640 cm^{-1} (+) deu correspondre a canvis en el senyal de làmines β (Dave et al., 2000), mentre que el pic intens a 1701 cm^{-1} (+) (Krimm i Bandekar, 1986) i el pic a 1686 cm^{-1} (-) (Dave et al., 2000) deuen reflectir canvis en l'entorn de girs reversos. La interpretació del pic a 1663 cm^{-1} (-) és més complexa, ja que pot ser degut a canvis en el senyal d'hèlixs α o llaços (Troullier et al., 1996). Una altra prova de canvis estructurals en l'estructura secundària de la MelB deguts a la unió de Na^+ ve donada pels pics a 1550 (+) i 1540 cm^{-1} (-) en la regió de l'amida II (Baenziger et al., 1993). És interessant tenir en compte que altres pics de l'espectre es poden assignar a protonacions/desprotonacions i/o canvis en l'entorn de residus acídics de la MelB com canvis en la contribució d'altres cadenes laterals (Barth, 2000). Per tant, els pics a 1403 (+, vibració simètrica de l'enllaç COO^-) i a 1726 cm^{-1} (-, vibració de l'enllaç C=O) poden ser deguts a la desprotonació d'àcids carboxílics, mentre que el pic a 1701 cm^{-1} pot també contenir contribució de la protonació d'altres cadenes laterals de carboxílics (Furutani et al., 2003a). Però també part o la totalitat del pic a 1403 cm^{-1} (+), juntament amb el pic a 1384 cm^{-1} (-) i la parella de pics a 1741 (+)/ 1726 (-) cm^{-1} poden indicar canvis en l'entorn d'àcids carboxílics desprotonats i protonats respectivament (Barth, 2000). S'ha de tenir en compte que les pertorbacions dels lípids èsters interaccionant amb la proteïna poden també contribuir en el pic de 1741 cm^{-1} (+) (DeGrip et al., 1988), emmascarant les possibles contribucions de carboxils. Altres pics que indiquen la implicació de carboxilats són els corresponents a la vibració COO^- antisimètrica, tal com es pot observar a 1600 (+) i 1575 (-) cm^{-1} (Troullier et al., 1996). En qualsevol cas, els pics que corresponen a àcids carboxílics són de molt interès perquè s'ha demostrat amb anterioritat que varies cadenes laterals d'Asp i Glu són necessàries per la unió de Na^+ i el transport de melibiosa (Ding, 2003; Pourcher et al., 1993; Séry, 2002; Zani et al., 1993). A més a més, el pic negatiu a 1519 cm^{-1} suggereix la

possibilitat que la unió de Na^+ indueix canvis en el senyal corresponent a les cadenes laterals de les Tyr, mentre que canvis en Arg o en Asn vindrien donats pel pic a 1671 cm^{-1} (Baenziger et al., 1993; Barth, 2000; Goormaghtigh et al., 1994c; Troullier et al., 1996). Anteriorment es va proposar que el lloc d'unió dels cations conté varies Tyr que deuen participar directament o indirectament en el lloc d'unió dels cations (Zani et al., 1994). Ambdós pics es poden assignar també a estructura secundària que absorbeixen en la zona de l'amida II i de l'amida I respectivament. Les bandes corresponents a Arg també són molt interessants degut a que s'ha descrit la formació d'un pont salí a prop del lloc d'unió dels ions entre els residus Arg52 i Asp19 o Asp55 (Franco i Wilson, 1999). En el cas de les Asn s'ha mostrat que són importants per la unió específica de Na^+ (Franco i Wilson, 1996; Hama i Wilson, 1994). Més ambigus són els petits pics a 1622 i a 1614 cm^{-1} els quals poden ser deguts a una barreja en els canvis de les propietats de les cadenes laterals d'Asn, Gln, Lys, Trp o Tyr (Barth, 2000; Troullier et al., 1996) i d'estructures de làmines β de la MeIB.

La figura 4.13 mostra l'espectre diferència, i el seu corresponent desconvulat, degut a la unió de Li^+ , comparat amb la diferència deguda a la unió de Na^+ . Es pot apreciar que els canvis produïts per la unió de Li^+ són parcialment diferents d'aquells produïts per la unió de Na^+ . Segons la figura 4.13C, alguns pics tenen una posició similar en els dos espectres de diferència: 1688 (-), 1673 (+), 1659 (+), 1652 (-), i 1640 (+) cm^{-1} . Per contra, el pic positiu a 1701 (+) cm^{-1} de la diferència deguda a la unió de Na^+ és reemplaçat per un pic a 1697 (+) cm^{-1} en la diferència deguda a la unió de Li^+ . El pic negatiu a 1663 cm^{-1} de l'espectre de Na^+ no té el seu corresponent a la diferència de Li^+ , mentre que el pic negatiu a 1648 cm^{-1} induït pel Li^+ no s'observa en l'espectre de Na^+ . En la regió de l'amida II, la diferència entre els espectres és molt més notable. La unió de Na^+ o Li^+ indueix pics similars a 1575 (-) i 1518 (-) cm^{-1} , però la resta de pics no tenen correspondència entre ells. A més a més, molts d'ells tenen signes oposats, com són els pics de 1600 (+), 1550 (+), 1540 (-) i 1530 (-) cm^{-1} pel Na^+ ; i 1590 (-), 1551 (-), 1541 (+) i 1528 (+) cm^{-1} pel Li^+ . Aquestes últimes variacions en els espectres demostren que la unió de Na^+ i Li^+ afecten de forma diferent l'estructura del transportador. Aquest diferent efecte deu provenir de la diferent coordinació que deuen tenir els dos cations i/o de la

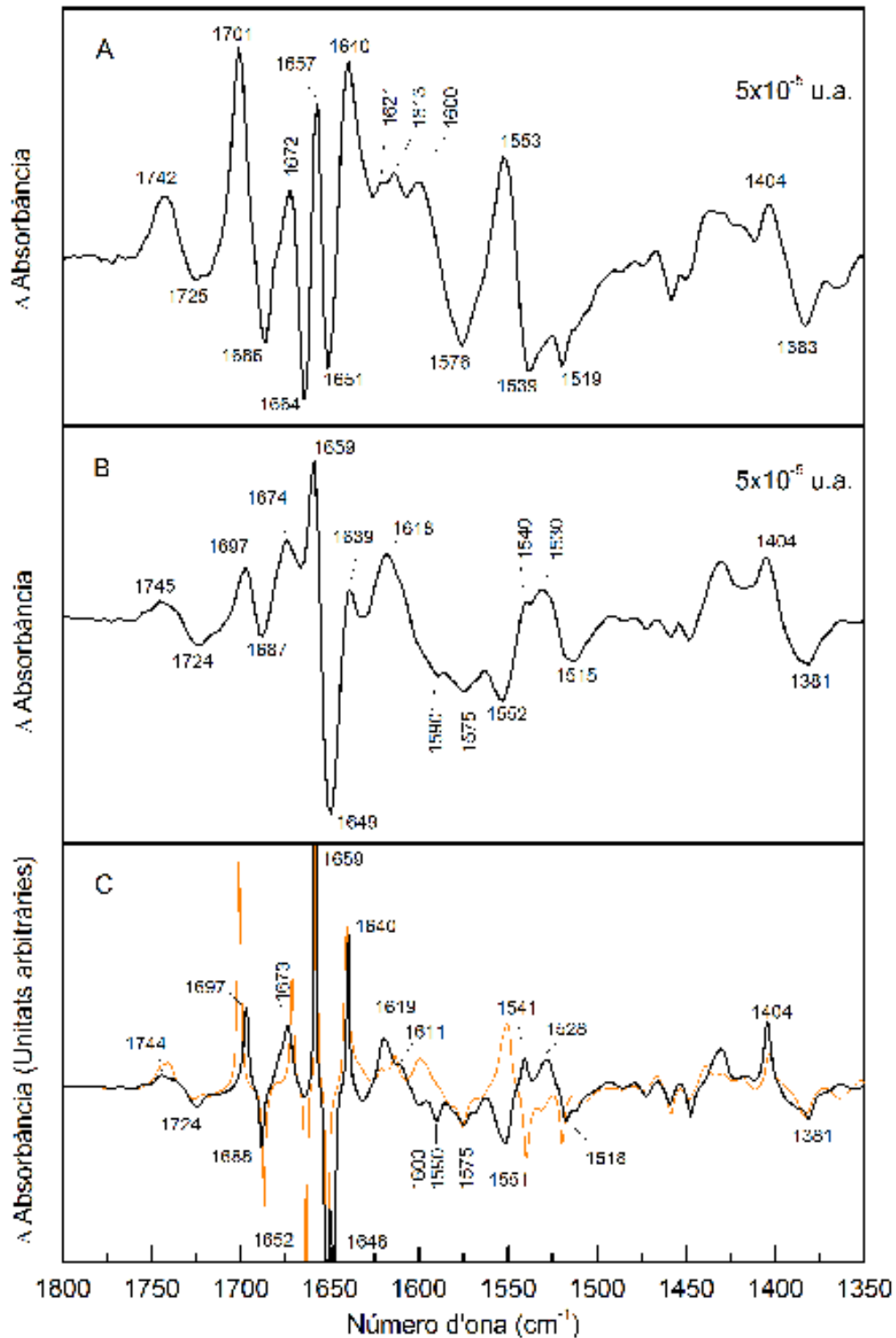


Figura 4.13. Espectre de diferència de la MeIB induït per la unió de Li⁺.

A) Espectre de diferència de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

B) Espectre de diferència de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

C) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannell B. (*Línia taronja*) Espectre desconvulat de la diferència del pannell A.

diferent interacció que deuen tenir amb els mateixos residus (Kuwabara et al., 2004).

Taula 4.I. Assignació dels pics deguts a la unió de Na⁺ i Li⁺

Na ⁺	Li ⁺	Assignació
1726		Asp (Glu) (amb contribució de lípid)
1701	1697	Girs reversos, Asp (Glu)
1671	1673	Arg o Asn
1663		Hèlix α o llaços
1658	1659	Hèlix α (o estructura desordenada)
1651	1652	Hèlix α (o estructura desordenada)
	1648	Hèlix α o hèlix 3_{10}
1640	1640	Làmines β
1600	1590	COO ⁻ (estirament antisimètric)
1576	1575	COO ⁻ (estirament antisimètric)
1550	1551	Amida II
1540	1541	Amida II
1519	1518	Tyr i/o amida II
1403	1404	COO ⁻ (estirament simètric)
1384	1381	COO ⁻ (estirament simètric)

4.5.2. Interacció de la melibiosa en presència de Na⁺

Després de la unió del catió el següent pas en el transport de la MelB és la unió de la melibiosa (Bassilana et al., 1988). Com que la concentració dels dos substrats és saturant, la majoria dels transportadors tenen els dos substrats units (MelB·catió·melibiosa) i amb una mescla de les dues orientacions. Per tant, els espectres de diferència deguts a la interacció de la melibiosa segurament mostren els canvis conformacionals deguts a la unió de melibiosa (en la presència del catió unit) barrejats amb un cert percentatge de translocació.

La figura 4.14A presenta l'espectre de diferència induït per la melibiosa (mel·Na⁺·MelB vs. Na⁺·MelB) juntament amb la seva desconvolució (figura 4.14B). La intensitat de l'espectre de diferència és uns tres cops més gran que l'observada per la unió de Na⁺ o Li⁺. Això suggereix que la unió de melibiosa provoca canvis conformacionals més grans que els cations per si sols. Aquesta conclusió està en concordança amb els resultats obtinguts anteriorment per Dave et al. (2000) on observaven una major protecció vers el bescanvi

hidrogen/deuteri per part de la melibiosa que pel Na^+ . Si relacionem aquests resultats al model de transport de 6 estats, sembla lògic, si es veu des d'un

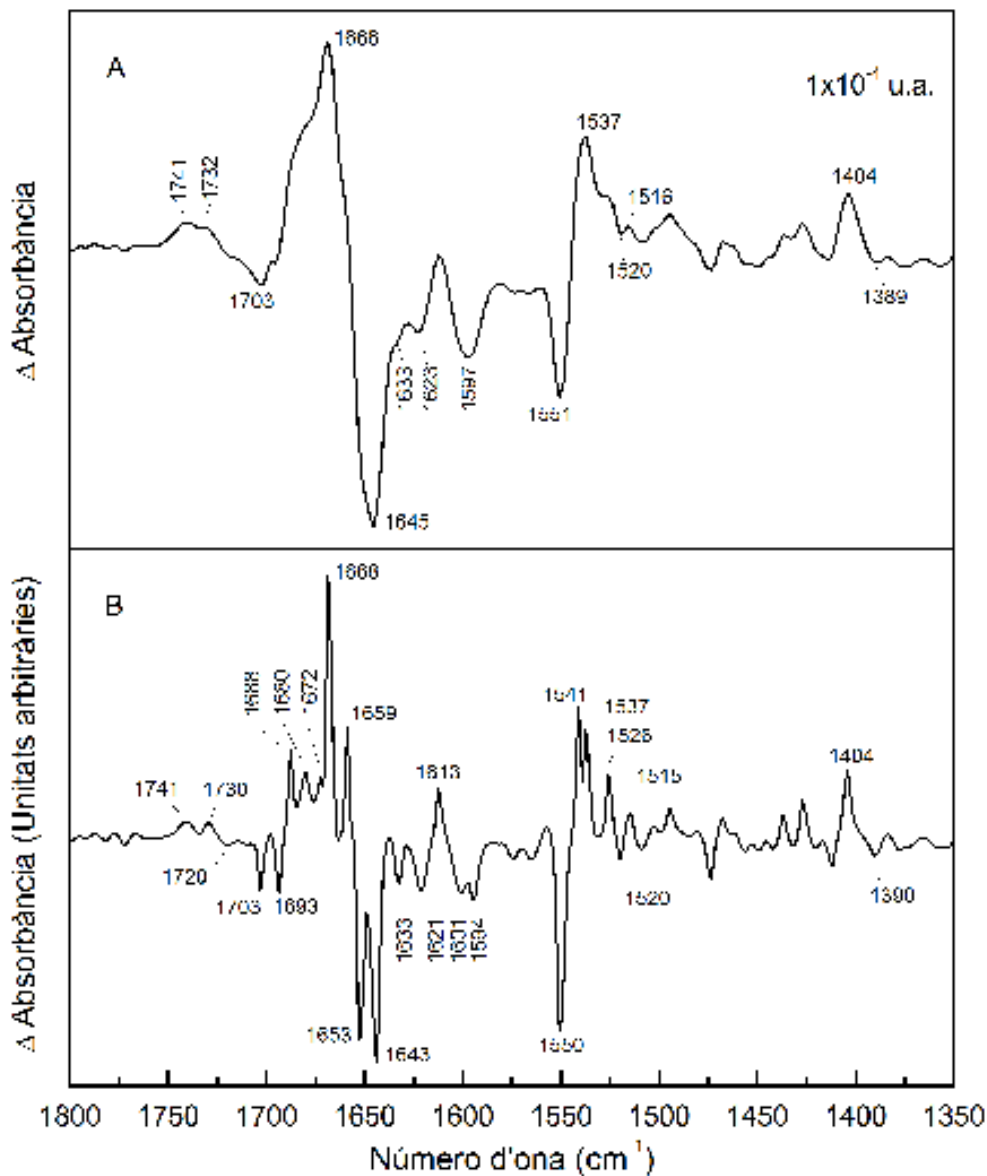


Figura 4.14. Espectre de diferència de la MelB induït per la interacció de melibiosa en presència de Na^+ .

A) Espectre de diferència de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6.

B) Espectre desconvulat de la diferència del pannell A.

punt de vista dels canvis conformacionals, que en el primer pas la unió del catió provocarà canvis conformacionals relativament petits que incrementaran l'afinitat del transportador pel sucre. En el segon pas, la unió del sucre donarà lloc a uns canvis conformacionals més grans en el transportador degut a la

grandària de la molècula del disacàrid. També existeix la possibilitat, que part d'aquests canvis corresponguin a la translocació dels substrats d'un cantó cap a un altre. Tots aquests mecanismes segurament inclouen una varietat de canvis conformacionals a més a més de canvis en la inclinació d'hèlixs α .

En l'espectre de diferència s'observen varis pics que, com abans, reflecteixen canvis en l'estructura secundària i en les cadenes laterals dels residus del transportador. Els pics a 1659 (+) i 1653 (-) cm^{-1} , com en la diferència $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$, suggereixen canvis en el senyal d'hèlixs α . Per tant, aquestes estructures tenen un canvi conformacional degut a la unió de Na^+ i la unió/translocació de la melibiosa provoca més canvis. El pic principal a 1668 cm^{-1} (+), prèviament no observat a la diferència deguda a la unió de Na^+ , se suposa que reflecteix canvis en girs, llaços o fins i tot hèlixs α . L'assignació del pic a 1643 cm^{-1} (-), resultat mitjançant la desconvolució, és difícil (làmines β , hèlixs 3_{10} o llaços; veure referència Dave et al. 2000). Els pics que apareixen a 1680 (+) i 1672 (+) cm^{-1} deuen correspondre a les cadenes laterals de Gln, Asn o Arg (Baenziger i Chew, 1997; Barth, 2000; Troullier et al., 1996). Encara que també es poden assignar a estructura secundària. L'Arg141 i l'Arg149 són uns residus importants per la translocació de la melibiosa (Abdel-Dayem et al., 2003) i la interacció amb la melibiosa o la formació/trencament de ponts salins amb aminoàcids carregats negativament, poden variar la posició de la banda de la seva cadena lateral produint pics en l'espectre de diferència. Els altres pics en la regió de l'amida I deuen correspondre a canvis en les làmines β o a cadenes laterals (1693 (-), 1633 (-), 1621 (-) cm^{-1}) (Barth, 2000; von Germar et al., 2000) i girs (1688 (+)) (Krimm i Bandekar, 1986)). El pic a 1703 (-) cm^{-1} està al límit de la regió de l'amida I i es pot assignar tant a girs reversos (Krimm i Bandekar, 1986) com a cadenes laterals d'Asp, Glu o Asn (Barth, 2000). En la regió de l'amida II, els pics principals concorden amb l'assignació d'hèlixs α i de làmines β (1550 i 1541 cm^{-1} , respectivament) (Goormaghtigh et al., 1994c). El pic a 1526 cm^{-1} (+) pot ser assignat a la pertorbació de la cadena lateral d'una Lys (Troullier et al., 1996; von Germar et al., 2000) mentre que els de 1515 cm^{-1} i 1520 cm^{-1} es poden assignar a Tyr (Baenziger et al., 1993; Troullier et al., 1996; von Germar et al., 2000). Això està en concordança amb els estudis de mutagènesi dirigida que mostren alteracions en la unió/translocació dels

substrats a l'haver-hi mutació en algunes Tyr (Zani et al., 1994; Ding i Wilson, 2001c)

En comparar els espectres de diferència induïts per la melibiosa en presència de Na^+ i els induïts pel Na^+ , val la pena tenir en compte que varis pics tant en la regió de l'amida I com en la de l'amida II que estan localitzats a números d'ona semblants tenen signes oposats (pics a 1703, 1688, 1550 i 1541 cm^{-1} de la diferència deguda a la interacció de la melibiosa en presència de Na^+). Per tant, això fa proposar que els canvis induïts en aquestes estructures per la unió de Na^+ són revertits per la unió/translocació de melibiosa.

Taula 4.II. Assignació dels pics deguts a la unió de melibiosa en presència de Na^+

Melibiosa (Na^+)	Assignació
1703	Girs reversos, Asp/Glu o Asn/Gln
1688	Girs reversos o làmines β
1680	Girs reversos, làmines β , Gln, Asn o Arg
1672	Girs reversos, làmines β , Gln, Asn o Arg
1668	Hèlix α_{II} o girs reversos
1659	Hèlix α o estructures desordenades
1653	Hèlix α o estructures desordenades
1643	Làmines β , hèlix 3_{10}
1633	Làmines β
1601/1594	COO^- (estirament antisimètric)
1550	Amida II
1541/1537	Amida II
1526	Lys
1520/1515	Tyr
1404	COO^- (estirament simètric)
1390	COO^- (estirament simètric)

Igual que en l'espectre degut a la unió de Na^+ , s'observa un pic a 1404 cm^{-1} , que pot ser degut a la desprotonació d'àcids carboxílics (von Germar et al., 2000). Però també és possible una altra explicació: aquest pic, o al menys part d'ell, conjuntament amb el pic negatiu a 1390 cm^{-1} , poden indicar un canvi en l'entorn d'un o varis àcids carboxílics desprotonats (Barth, 2000). Per sobre 1700 cm^{-1} , s'observen dos pics per sobre el soroll a 1741 i 1730 cm^{-1} . Com en el cas de l'espectre degut a la unió de Na^+ , pot ser que aquests pics corresponguin a la protonació de les cadenes laterals d'Asp o Glu, sempre

tenint en compte la possible contribució de lípids en aquesta zona. També s'observen altres pics que poden correspondre a carboxilats a la zona d'absorció de la vibració antisimètrica de l'enllaç COO^- ($1601 (-)$ i $1594 (-)$ cm^{-1}). Per tant, mentre que la unió de Na^+ o Li^+ ja provoca la protonació/desprotonació i/o el canvi en l'entorn de les cadenes laterals d'Asp i/o Glu, la unió de melibiosa/translocació de substrats produeix canvis addicionals dels mateixos i/o diferents grups carboxílics.

4.5.3. Interacció de la melibiosa en presència de Li^+ o H^+

La figura 4.15 mostra l'espectre de diferència induït per la interacció de la melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ . Els tres espectres són bastant similars, indicant que els canvis conformacionals induïts per la unió/translocació de melibiosa són comparables, sense tenir en compte el catió que està unit. Però algunes diferències existeixen, que deuen ser degudes a les diferents propietats cinètiques de la unió/translocació de melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ (Bassilana et al., 1987). La figura 4.15 (espectre vermell) presenta la diferència $\text{mel}\cdot\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$ vs. $\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$. En l'espectre desconvulat (Figura 4.16; espectre vermell), s'observa un pic negatiu a 1663 cm^{-1} que abans no s'observava en les diferències degudes a la interacció de melibiosa en presència d' H^+ o de Na^+ , i tampoc s'observava en la diferència deguda a la unió de Li^+ . Per tant, aquest pic és indicatiu de canvis estructurals característics de la unió de melibiosa en presència de Li^+ . Altres diferències entre els espectres són el pic a 1703 cm^{-1} , que té menys intensitat en la diferència $\text{mel}\cdot\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$, i el pic a 1520 cm^{-1} en l'amida II, que és menys intens en la diferència $\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$.

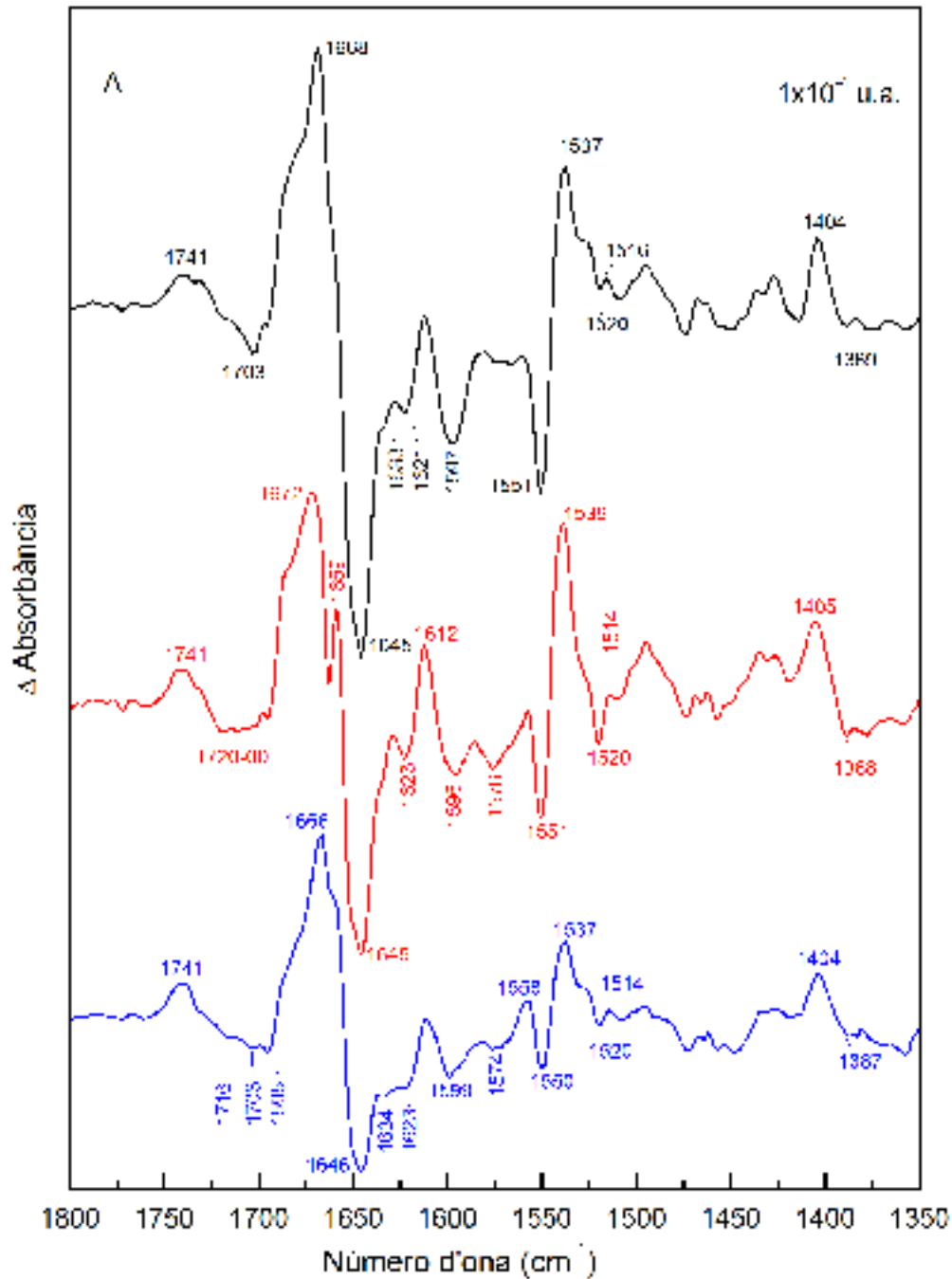


Figura 4.15. Espectres de diferència de la MeIB induïts per la interacció de melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ .

(*Línia negra*) Espectre de diferència de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia vermella*) Espectre de diferència de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*Línia blava*) Espectre de diferència de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6.

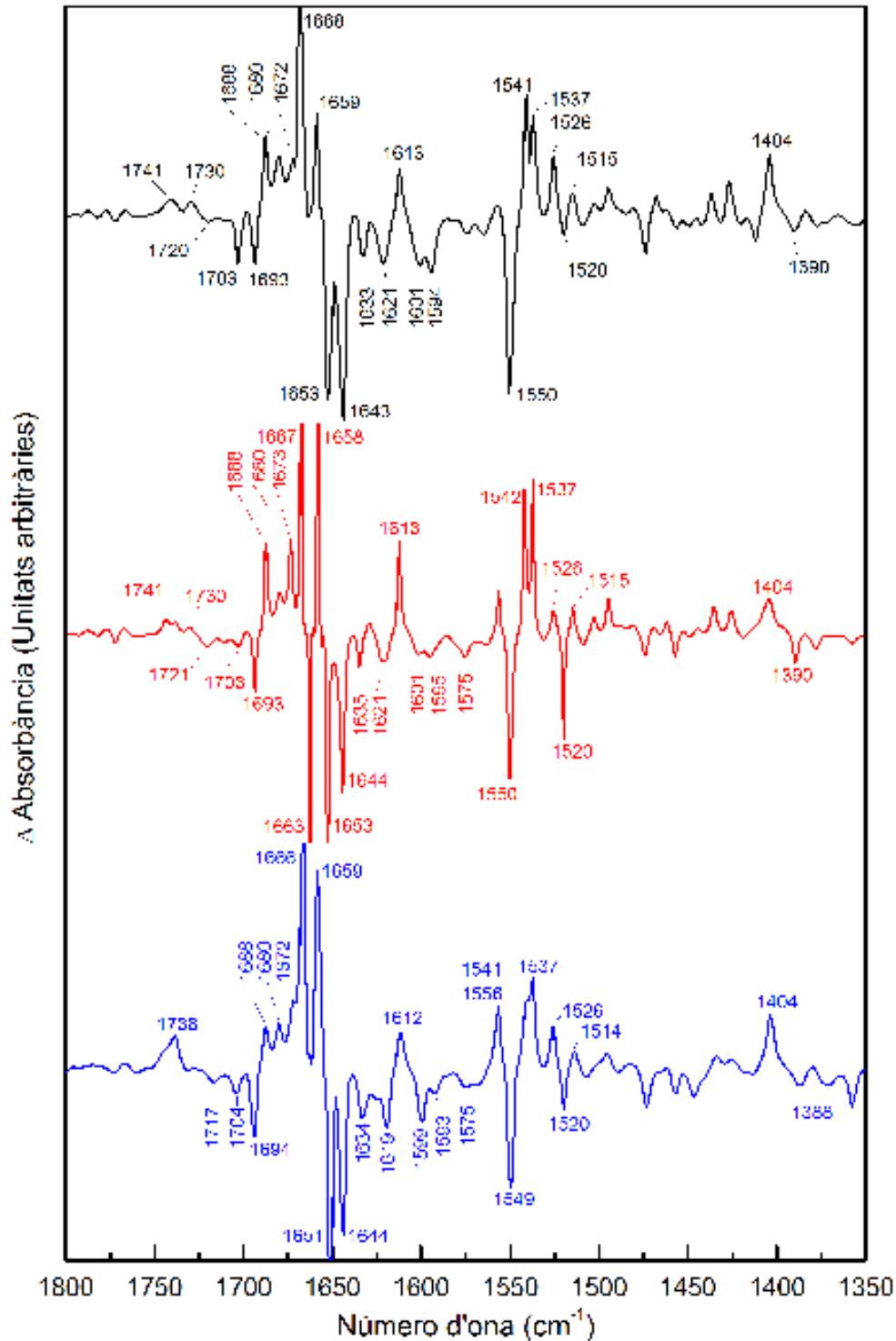


Figura 4.16. Espectres de diferència desconvulats de la MeIB induïts per la interacció de melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ .

(*Línia negra*) Espectre de diferència desconvulat de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia vermella*) Espectre de diferència desconvulat de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*Línia blava*) Espectre de diferència desconvulat de la MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6.

4.6. Espectres de diferència de la MelB salvatge en D₂O

La comparació entre els espectres de diferència en H₂O i D₂O dóna principalment informació sobre quins pics corresponen a estructura secundària i quins a aminoàcids (Barth i Mäntele, 1998; Barth i Zscherp, 2002). Les estructures secundàries com hèlixs α o làmines β (de baixa freqüència) tenen petits desplaçaments degut a l'intercanvi isotòpic (Baenziger i Chew, 1997; Goormaghtigh et al., 1994a; Susi et al., 1967; Tatulian, 2003), les làmines β d'alta freqüència tenen un desplaçament d'uns 15 cm⁻¹ (Arrondo i Goñi, 1999), els girs poden desplaçar-se fins a 10-15 cm⁻¹ (Baenziger i Chew, 1997), mentre que les estructures desordenades poden desplaçar-se fins a 15-20 cm⁻¹ (Arrondo et al., 1993). Finalment, els desplaçaments més grans s'observen en pics que provenen d'aminoàcids amb un protó bescanviable (Barth, 2000). Per tant, l'objectiu d'aquestes diferències és confirmar les assignacions fetes abans en les diferències en H₂O i poder observar millor els àcids carboxílics i altres aminoàcids com les tirosines. A més, aquests espectres ens donen informació sobre l'accessibilitat de les estructures involucrades en els espectres de diferència.

4.6.1. Consideracions prèvies

4.6.1.1. Diferent grau d'intercanvi H/D induït pels substrats

Les propietats de l'intercanvi H/D de la MelB depenen dels substrats que la permeasa té unit (Dave et al., 2002). Abans d'adquirir els espectres de diferència, es va fer un intercanvi H/D extens sense la presència de substrats (en presència d'H⁺), una condició, que igual que en presència de Na⁺, dóna lloc al major bescanvi en la permeasa (Dave et al., 2002). Després es van adquirir els espectres de diferència canviant els tampons que portaven un substrat o un altre. Aquest canvi en els substrats podia modificar el nivell d'intercanvi de l'enllaç peptídic i induir pics en l'espectre de diferència deguts a un increment en l'intercanvi H/D entre les dues condicions. En aquest cas el primer espectre de diferència hagués sigut diferent als consecutius. Degut a que la unió de Na⁺ no canvia l'accessibilitat, mentre que la unió de melibiosa dóna lloc a una

disminució de l'intercanvi H/D, no s'esperaven canvis entre els espectres de diferència consecutius. Efectivament, no es van observar canvis entre els espectres de diferència consecutius en les dues diferències, Na⁺ vs. D⁺ i melibiosa·Na⁺ vs. Na⁺.

4.6.1.2. Estimació de la intensitat de l'espectre de diferència

Per tal de comparar els espectres de diferència entre ells, és útil normalitzar la seva àrea. Llavors és possible no solament observar canvis en el desplaçament dels pics si no que a més ens permet observar canvis en la seva intensitat. No obstant, per normalitzar els espectres és necessari trobar una referència. Com que en els nostres experiments hi ha dos tipus d'espectres de diferència (unió de Na⁺ i interacció de melibiosa en presència de Na⁺), la referència per a normalitzar els espectres hauria de ser la mateixa. Per aquesta raó els espectres de diferència van ser normalitzats per l'àrea de l'amida I. Encara que hi hagi desplaçament de pics que donin lloc a un augment o una disminució de la intensitat d'aquests degut a la seva superposició o viceversa, si tots els pics després de l'intercanvi isotòpic continuessin absorbint en la regió de l'amida I, l'àrea seria la mateixa. No obstant, s'han de tenir en compte alguns aspectes: 1) el coeficient d'absorció de les diferents estructures que contribueixen en la regió de l'amida I són diferents en H₂O i en D₂O (Barth i Mäntele, 1998); 2) les cadenes laterals d'alguns aminoàcids també absorbeixen en la regió de l'amida I i poden tenir també diferent coeficient d'absorció en els dos medis. A més a més, residus com l'Arg i la Lys absorbeixen en la regió de l'amida I en H₂O i fora de la regió de l'amida I en D₂O. Tenint en compte totes aquestes fonts d'errors, els espectres de diferència presenten una bona relació després de la normalització, indicant que utilitzar l'àrea de l'amida I per a normalitzar els espectres de diferència és una bona elecció.

4.6.2. Nivell d'intercanvi H/D

Després d'un extensiu intercanvi H/D del film de MelB (1000 min) la intensitat del pic de l'amida II disminueix, amb el corresponent increment en l'amida II' (figura 4.17). L'accessibilitat de la proteïna al D₂O dona un nivell d'intercanvi del 56% dels hidrògens. Aquest valor està amb concordança amb

els resultats prèviament obtinguts (54% d'intercanvi al cap de 1000 min) exposant la mostra a N_2 gas saturat de D_2O (Dave et al., 2002).

El percentatge d'intercanvi H/D que correspon a estructures que donen pics en l'espectre de diferència no necessàriament ha de donar el mateix que el global, perquè l'espectre de diferència només mostra pics que corresponen a les estructures que han sofert canvis per la interacció dels substrats. Aquests pics poden correspondre a estructures accessibles i no accessibles al solvent i a cadenes laterals. Per

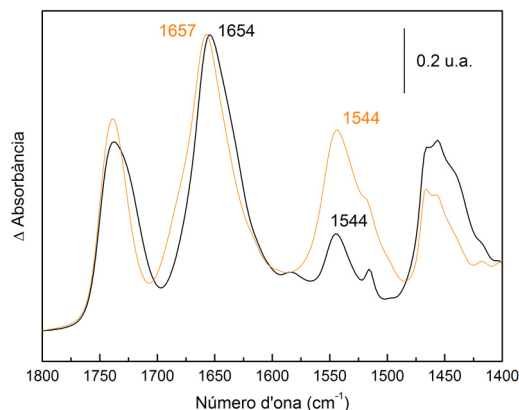


Figura 4.17. Espectres d'absorbància de la MelB abans i després del bescanvi H/D. (Línia negra) Espectre d'absorbància d'un film hidratat de la MelB en H_2O després de restar-li la contribució de tampó. (Línia taronja) Espectre d'absorbància d'un film hidratat de la MelB en D_2O després de 1000 minuts d'intercanvi H/D.

tal de calcular l'accessibilitat de les estructures o dels aminoàcids que prenen part en els espectres deguts a la interacció dels substrats, es va calcular l'intercanvi H/D per als dos espectres de diferència, l'originat per la unió del Na^+ i l'originat per la interacció de melibiosa en presència de Na^+ .

Es van mesurar les àrees dels pics dels espectres de diferència de les regions de l'amida I i l'amida II i es va calcular el percentatge d'hidrògens intercanviats de la mateixa forma que per l'espectre d'absorbància, fent servir l'àrea de l'amida I de l'espectre de diferència com a factor normalitzador (veure figures 4.18 i 4.19). En la diferència $Na^+ \cdot MelB$ vs. $H^+ \cdot MelB$, el bescanvi és del voltant del 80% mentre que en la diferència melibiosa $\cdot Na^+ \cdot MelB$ vs. $Na^+ \cdot MelB$ és del 55%. El bescanvi H/D també es va calcular a partir de la vibració de l'amida A (veure figura 4.20). Degut a que no es poden observar els pics de l'amida A en l'espectre de diferència en H_2O , l'intercanvi es va calcular fent servir les bandes de l'amida A i de l'amida I del film sec. Per a l'espectre de diferència degut a la unió de Na^+ s'obté un bescanvi del 76%, mentre que per la diferència induïda per la melibiosa, s'obté del 58%. Els dos valors són molt semblant als que s'han obtingut fent servir l'amida II. Per tant, es pot concloure que el Na^+ induïx canvis conformacionals principalment en estructures

accessibles al solvent, mentre que la unió de melibiosa afecta en una mateixa proporció les estructures accessibles i no accessibles.

4.6.3. Espectres de diferència induïts per la unió de Na⁺

La figura 4.18 (part superior) mostra l'espectre de diferència Na⁺·MeIB vs. D⁺·MeIB en D₂O comparat amb el mateix espectre en H₂O. S'ha de ressaltar que els espectres de diferència adquirits en H₂O fent servir el cristall de ZnSe són molt semblants als mostrats prèviament fent servir el cristall de Ge (veure secció 4.5). En conjunt, l'espectre de diferència en D₂O és bastant diferent que el mateix espectre en H₂O, amb concordança amb l'alt percentatge d'intercanvi H/D. A continuació es descriuen i es discuteixen els pics més interessants.

Regió entre 1800-1700 cm⁻¹: El pic a 1742 cm⁻¹ (H₂O) té només un petit desplaçament a números d'ona menors degut a l'intercanvi H/D. Els residus Asp i Glu que absorbeixen en aquesta regió tenen un desplaçament d'uns 5-10 cm⁻¹ (Barth, 2000; Dioumaev, 2001). Per tant, aquest pic deu correspondre a contribució de lípid. El pic negatiu a 1725 cm⁻¹ (H₂O) es desplaça a números d'ona menors formant un pic ample a 1716 cm⁻¹ (D₂O) que es resol en diferents pics després de la desconvolució. Aquest desplaçament pot correspondre a residus d'àcids carboxílics protonats (Barth, 2000), encara que també hi pot haver contribució de lípids.

Regió amida I: Com es veu a la figura 4.18 el pic a 1700 cm⁻¹ es desplaça a 1690 cm⁻¹. Aquest pic es pot assignar a àcids carboxílics (Asp o Glu) (Barth, 2000; Brown et al., 1995; Gregoriou et al., 1995) o a girs accessibles al solvent (Krimm i Bandekar, 1986). En canvi, el pic a 1687 cm⁻¹ desapareix en la diferència en D₂O. Aquesta desaparició pot tenir diferents explicacions. La més probable és que aquest pic no es desplaça i que el pic a 1700 cm⁻¹ (H₂O) es desplaça sobre d'ell degut a que, agafant l'àrea de l'amida I per normalitzar l'espectre, hi ha una disminució de la intensitat del pic a 1690 cm⁻¹ (D₂O) comparat amb la del pic a 1700 cm⁻¹ (H₂O). Per tant, el pic a 1687 cm⁻¹ estaria emmascarat pel nou pic a 1690 cm⁻¹, tenint en compte que el primer pic no es desplaça.

El pic positiu a 1678 cm⁻¹ (D₂O) pot provenir d'estructures corresponents a girs (Baenziger i Chew, 1997; von Germar et al., 2000). No obstant, no es pot descartar l'assignació d'aquest pic a una cadena lateral que podria

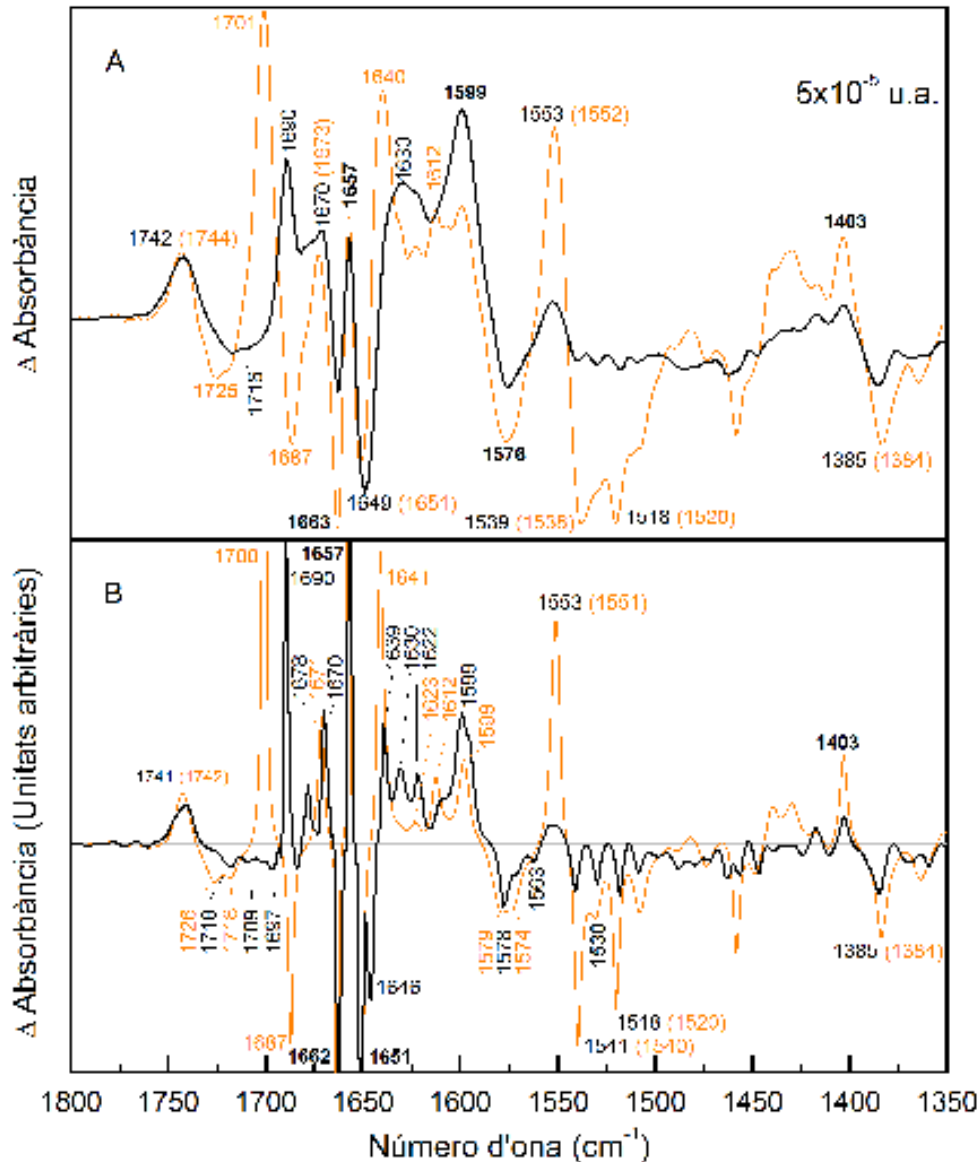


Figura 4.18. Espectre de diferència de la MelB induït per la unió de Na⁺ en D₂O i H₂O.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència en D₂O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pD 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pD 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència en H₂O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència (negra) del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre desconvulat de la diferència (taronja) del pannel A.

correspondre a una Asn. Tenint en compte que les Asn tenen un desplaçament d'uns 30 cm⁻¹ degut el bescanvi H/D (Barth, 2000) aquest pic absorbiria al voltant de 1705 cm⁻¹ en H₂O, però estaria emmascarat pel pic positiu a 1700 cm⁻¹. Cal dir que números d'ona tan elevats per Asn ja han sigut descrits anteriorment (Barth, 2000). A més, les Asn són uns aminoàcids importants a

l'hora de co-transportar amb Na^+ , en concret l'Asn 58 (Franco i Wilson, 1996). El pic a 1671 cm^{-1} té un petit desplaçament a números d'ona menors (1670 cm^{-1}). Per tant, aquest pic possiblement deu correspondre a hèlixs α_{\parallel} (Furutani et al., 2003b) o a girs no accessibles al solvent.

Els pics a $[\text{H}_2\text{O} (\text{D}_2\text{O})]$ $1657 (1657)$ i $1651 (1651) \text{ cm}^{-1}$ provenen d'estructures hèlixs α no accessibles al solvent degut a que apareixen en la zona d'absorció de les hèlixs α (Barth i Mäntele, 1998; Kluge et al., 1998; Tatulian, 2003; von Germar et al., 2000) i a més no s'observen canvis en les seves posicions degut al bescanvi H/D. La posició del pic negatiu a 1662 cm^{-1} no varia en passar d' H_2O a D_2O , encara que la seva intensitat disminueix. Per tant, es pot assignar part d'ell a hèlixs α no accessibles al solvent i l'altre part a alguna estructura accessible al solvent. Aquests tres pics deuen ser deguts a canvis en la inclinació d'aquestes estructures hèlixs α i per tant la possible assignació a estructures desordenades queda descartada. El pic negatiu a 1646 cm^{-1} (D_2O) resolt mitjançant la desconvolució deu correspondre a estructures accessibles al solvent que es desplacen des de 1662 cm^{-1} en H_2O . El pic a 1641 cm^{-1} (H_2O) s'assignava anteriorment a estructures de làmina β (veure secció 3.5.1). Part d'aquest pic es deu desplaçar a 1639 cm^{-1} degut al bescanvi H/D (von Germar et al., 2000).

Regió amida II: Els pics de l'amida II en l'espectre de diferència en H_2O tenen un desplaçament d'uns 100 cm^{-1} cap a números d'ona menors degut al bescanvi isotòpic. Per tant, el pic a 1551 cm^{-1} es mouria aproximadament a 1450 cm^{-1} , mentre que el pic negatiu a 1540 cm^{-1} es mouria a 1440 cm^{-1} . Aquests pics se superposen amb els pics existents en H_2O a números d'ona similars però amb signe oposat, donant lloc a una neutralització de la regió de l'amida II'. El pic a 1520 cm^{-1} (H_2O) en l'apartat 3.5.1 no es podia assegurar si provenia de la vibració de l'amida II o si es tractava de les cadenes laterals de Tyr. L'intercanvi H/D disminueix considerablement la seva intensitat. Per tant, aquest pic deu correspondre a una barreja entre la vibració de l'amida II i de Tyr.

Regió àcids carboxílics: La presència de pics a $1578 (-)$ i $1599 \text{ cm}^{-1} (+)$ en H_2O que pràcticament no tenen desplaçament en D_2O és característica de la vibració d'estirament antisimètrica dels grups COO^- d'Asp i Glu (Barth, 2000; Georg et al., 1994). A més, aquestes bandes tenen un augment en el seu

coeficient d'absorció en passar d'H₂O a D₂O (Barth, 2000), com s'observa en el pic a 1599 cm⁻¹. S'ha mostrat que els grups COO⁻ lliures de les cadenes laterals dels Asp tenen una banda entre 1574-1579 cm⁻¹, mentre que les dels Glu tenen una banda aproximadament a 1567 cm⁻¹ (Barth, 2000). La interacció amb cations dóna lloc a un canvi de les seves freqüències d'absorció. En concret, s'ha descrit que interaccions monodentades donen lloc a un increment del número d'ona d'absorció de les bandes antisimètriques, mentre que les interaccions bidentades donen lloc a una disminució (Deacon i Phillips, 1980; Nara et al., 1994). A més, en la interacció pseudopont, on un oxigen interacciona amb el catió i l'altre forma un pont d'hidrogen amb una aigua, hi ha un desplaçament cap a números d'ona superiors (Nara et al., 1996; Nara et al., 2004). Per tant, els desplaçaments dels pics a prop de 1578 cm⁻¹ i 1599 cm⁻¹ possiblement corresponen a la interacció del Na⁺ amb residus de la MelB carregats negativament mitjançant interaccions monodentades o de pseudopont. Aquests residus deuen correspondre a l'Asp19, Asp55, Asp59 i Asp124, que s'han proposat que formen part del lloc d'unió del catió (Poolman et al., 1996; Pourcher et al., 1993; Zani et al., 1993). La formació d'interaccions dels grups COO⁻ amb les cadenes laterals d'Arg o Lys també poden donar lloc a un desplaçament cap a números d'ona majors d'aquests pics. (Franco i Wilson, 1999; Franco et al., 2001; Hastings Wilson i Wilson, 1998; von Germar et al., 1999).

El pic positiu a 1403 cm⁻¹ (H₂O) que correspon a la vibració d'estirament simètrica de l'enllaç COO⁻ deu estar parcialment emmascarat per l'amida II' degut al bescanvi H/D. En canvi, el pic negatiu de carboxílics a 1384 cm⁻¹ (H₂O) està fora de la possible influència de la banda de l'amida II', i té un petit desplaçament cap a números d'ona majors com era d'esperar per aquesta classe de pics (Barth, 2000). Per tant, aquests pics i els altres observats a 1725 cm⁻¹ (H₂O) són indicatius de canvis en la protonació i/o l'entorn de les cadenes laterals de Glu i més probablement d'Asp.

Taula 4.III. Assignació dels pics deguts a la unió de Na ⁺		
H ₂ O	D ₂ O	Assignació
1725	1715	COOH (amb contribució de lípid)
1700	1690	Girs reversos o Asp/Glu
?	1678	Girs reversos accessibles al solvent o Asn
1671	1670	Hèlix α _{II} , girs no accessibles al solvent
1663	1662	Hèlix α + estructura accessible al solvent
1657	1657	Hèlix α
1651	1651	Hèlix α
?	1646	Estructura accessible al solvent
1641	1639	Làmines β
1598	1599	COO ⁻ (estirament antisimètric)
1579-74	1578	COO ⁻ (estirament antisimètric)
1551	-	Amida II
1539	-	Amida II
1403	1403	COO ⁻ (estirament simètric)
1384	1385	COO ⁻ (estirament simètric)

4.6.4. Espectres de diferència induïts per la interacció de la melibiosa

La figura 4.19 mostra l'espectre de diferència melibiosa·Na⁺·MelB vs. Na⁺·MelB en D₂O i en H₂O. L'espectre en D₂O presenta variacions respecte l'espectre en H₂O, com ja s'observava en l'espectre de diferència induït per la unió del Na⁺. No obstant, no hi ha grans variacions en la regió de l'amida I i només s'observen petits desplaçaments o fins i tot alguns dels pics no es desplacen. Per tant, la interacció de la melibiosa en presència de Na⁺ provoca canvis en estructures menys accessibles al solvent (en el cor de la proteïna) que en el cas de la unió de Na⁺.

Regió 1800-1700 cm⁻¹: Com en la diferència deguda la unió de Na⁺, el pic al voltant de 1738 cm⁻¹ es pot assignar a lípids. El pic negatiu a 1703 cm⁻¹ desapareix completament. Aquest pic té diferents possibles assignacions com són: Asp/Glu (Barth, 2000), Asn/Gln (Barth, 2000) o girs reversos (Krimm i Bandekar, 1986). Però no és possible discernir entre totes aquestes possibilitats ja que el destí del pic en D₂O no està clar.

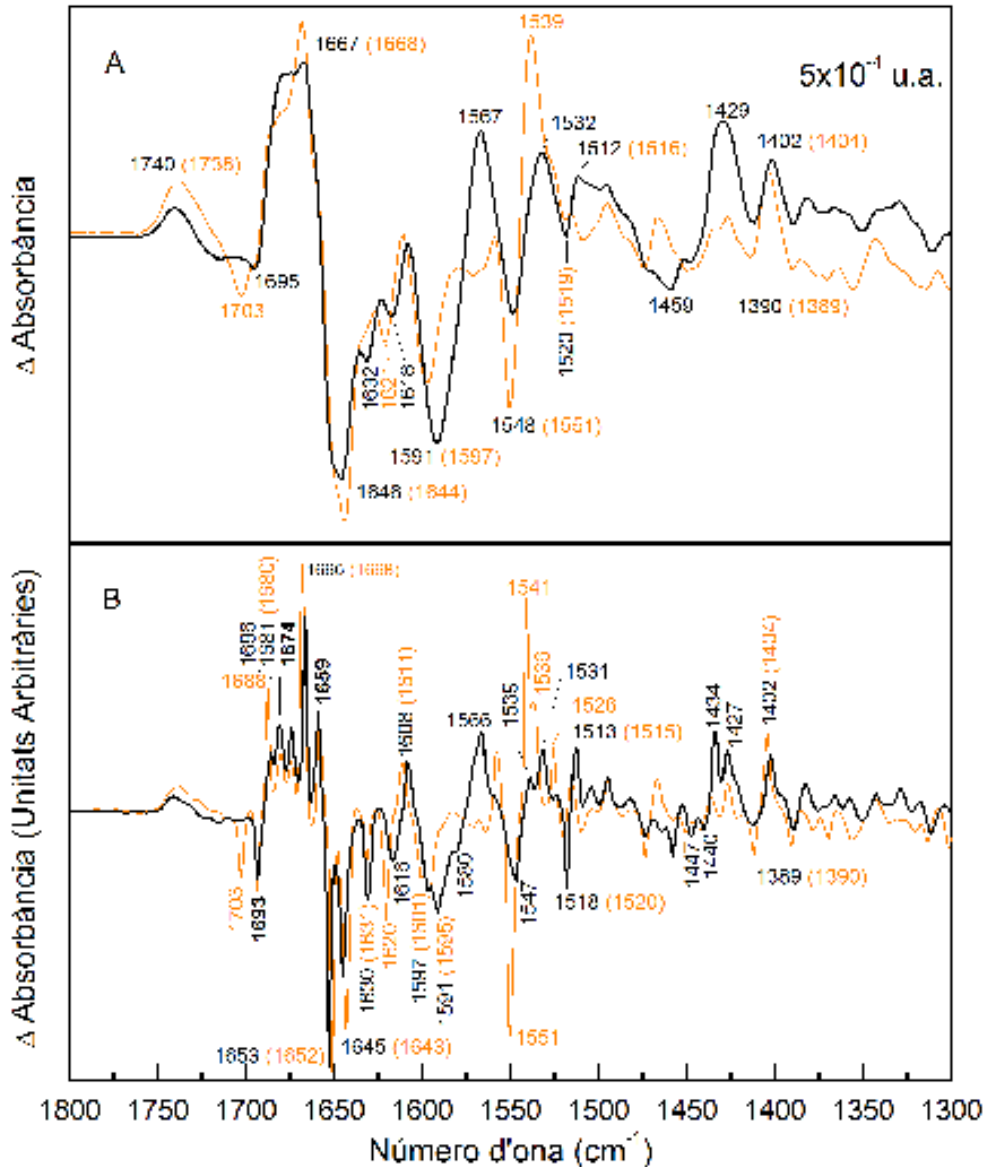


Figura 4.19. Espectre de diferència de la MelB induït per la interacció de melibiosa en presència de Na^+ en D_2O i en H_2O .

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència en D_2O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pD 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pD 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència en H_2O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència (negra) del pannell A. (*Línia taronja*) Espectre desconvulat de la diferència (taronja) del pannell A.

Regió amida I: El pic a prop de 1688 cm^{-1} (H_2O) pateix un desplaçament de 2 cm^{-1} cap a números d'ona menors i una disminució de la seva intensitat (figura 4.19). Aquest desplaçament es pot assignar a estructures de làmina β o girs reversos amb poca accessibilitat al medi. En canvi, els pics a 1680 cm^{-1} i

1674 cm^{-1} són insensibles al bescanvi i per tant són deguts a estructures no bescanviades de girs reversos o làmines β .

Com a norma general (a excepció dels pics corresponents a àcids carboxílics) l'intercanvi H/D indueix un desplaçament a números d'ona menors en la posició dels pics, mentre que pics no intercanviats romandran al mateix número d'ona. Però en la diferència melibiosa \cdot Na $^{+}$ \cdot MelB vs. Na $^{+}$ \cdot MelB, tres pics presenten un inesperat petit desplaçament cap a números d'ona majors: [H $_2$ O (D $_2$ O)] 1680 (1681), 1652 (1653) i 1643 (1645) cm^{-1} . Encara que la desconvolució fa aquest desplaçament més clar, aquest ja s'observa en la diferència no desconvulada en el pic negatiu a 1644 cm^{-1} (figura 4.19, espectre superior). Una possible explicació per aquest fet és que altres pics que se superposaven amb ells tinguin un desplaçament a números d'ona menors, donant lloc a un aparent desplaçament a números d'ona majors dels pics corresponents a les estructures no bescanviades. Això està recolzat pel fet que en els espectres de diferència deguts a la interacció de Na $^{+}$ el pic a 1651 cm^{-1} no presenta cap desplaçament cap a números d'ona més grans (veure figura 4.18). Desplaçaments a números d'ona superiors degut al bescanvi H/D en pics corresponents a hèlixs α també s'han observat en els espectres de diferència de l'ATPasa de Ca $^{2+}$ (Georg et al., 1994).

El pic més intens en l'amida I que apareix a 1668 cm^{-1} en H $_2$ O, es desplaça a 1666 cm^{-1} . Aquest pic podria correspondre a estructura hèlix α bescanviada, ja que els girs reversos presentarien major desplaçament (Baenziger i Chew, 1997). Els pics a 1659 cm^{-1} i 1652 cm^{-1} són insensibles al bescanvi isotòpic i, com en la diferència deguda a la unió de Na $^{+}$, són assignats a hèlixs α transmembrana no accessibles al solvent. Per tant, com ja s'havia proposat en la secció 4.5.2 la interacció de melibiosa provoca més canvis en les estructures hèlixs α ja afectades per la unió de Na $^{+}$. Aquests canvis deuen correspondre a canvis en la inclinació de les hèlixs α .

El pic negatiu a 1643 cm^{-1} tampoc es troba afectat per l'intercanvi H/D i per tant deu correspondre a una estructura de làmina β o hèlix 3_{10} no accessible al solvent (Dave et al., 2000). El pic negatiu a 1630 cm^{-1} no es desplaça, i per tant es pot assignar a làmines β no accessibles al solvent (von Germar et al., 2000). No obstant la seva intensitat augmenta en la presència de D $_2$ O. Per tal d'explicar aquest fet, s'ha de tenir en compte que en l'espectre de

diferència (figura 4.19) hi ha un augment de la intensitat a números d'ona per sobre de 1670 cm^{-1} . Aquest increment podria ser degut al desplaçament de bandes negatives a números d'ona menors (von Germar et al., 2000). Juntament amb aquest augment hi ha un augment en la intensitat de la regió negativa a 1630 cm^{-1} . Per tant, pics negatius al voltant de 1680 cm^{-1} deuen desplaçar-se cap a 1630 cm^{-1} . Aquests pics es poden assignar a cadenes laterals d'Asn i/o Gln ja que les cadenes laterals d'Arg es desplaçarien a números d'ona menors (Barth, 2000). Els pics a 1620 cm^{-1} i 1611 cm^{-1} es desplacen a 1616 cm^{-1} i 1608 cm^{-1} respectivament. Aquests pics es troben al límit entre les vibracions de l'amida I i de les cadenes laterals d'aromàtics (Kluge et al., 1998).

Regió amida II: La banda de proteïna amida II es desplaça uns 100 cm^{-1} cap a números d'ona menors a la regió de l'amida II' degut al bescanvi H/D. Aquest fet es pot observar en els espectres de diferència amb la disminució de la intensitat dels pics que es troben en la regió de $1560\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ i amb el corresponent augment en la intensitat dels pics en la regió $1470\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$, en passar d' H_2O a D_2O (figura 4.19).

Regió vibració d'àcids carboxílics i tirosines: Un canvi important entre els espectres de diferència en H_2O i D_2O és l'aparició d'un pic a 1567 cm^{-1} en D_2O . Aquest efecte deu ser degut amb tota probabilitat a un desplaçament a números d'ona menors d'un pic negatiu a 1570 cm^{-1} (en H_2O) a $1460\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$ en D_2O . Per tant, els dos pics a 1591 (-) i 1567 (+) cm^{-1} en D_2O estan ja presents en l'espectre de diferència en H_2O , encara que no és possible conèixer la seva posició exacta degut a la seva superposició amb els pics corresponents a amida II. Igual que per a l'espectre degut a la unió de Na^+ , aquest parell de pics negatiu/positiu es poden assignar a la vibració d'estirament antisimètrica de les cadenes laterals d'Asp/Glu (Barth, 2000; von Germar et al., 2000) provenint dels desplaçament del pic a 1591 cm^{-1} fins a 1567 cm^{-1} degut a la interacció de la melibiosa. Aquest desplaçament a números d'ona menors es pot atribuir a la pèrdua d'interaccions entre grups COO^- i cadenes laterals d'Arg/Lys (von Germar et al., 1999).

Taula 4.IV. Assignació dels pics deguts a la unió de melibiosa en presència de Na ⁺		
H₂O	D₂O	Assignació
1703	?	Girs reversos, Asp/Glu o Asn/Gln
1688	1686	Girs reversos o làmines β
1680	1681	Girs reversos o làmines β
1674	1674	Girs reversos o làmines β
1668	1666	Hèlix α_{II}
1659	1659	Hèlix α
1650	1652	Hèlix α
1642	1645	Làmines β , hèlix 3_{10}
1631	1630	Làmines β
1595	1591	COO ⁻ (estirament antisimètric)
?	1567	COO ⁻ (estirament antisimètric)
1551	1447	Amida II
1541	1539	Amida II
1536	1531	Amida II
1518/1513	1520/1515	Tyr
1403	1403	COO ⁻ (estirament simètric)
1384	1385	COO ⁻ (estirament simètric)

Com es pot observar en l'espectre de diferència hi ha un augment en la intensitat d'aquests pics en passar d'H₂O a D₂O, que pot ser degut a: 1) aquests pics estan desemascarats després del bescanvi H/D (Butler et al., 2002) (els àcids carboxílics només tenen un petit desplaçament cap a números d'ona majors); 2) la vibració antisimètrica dels carboxílics al voltant de 1570 cm⁻¹ té un coeficient d'absorció major en D₂O que en H₂O (Barth, 2000; von Germar et al., 2000). Aquests pics més els que apareixen a 1703 cm⁻¹ (H₂O) degut a desprotonacions, a 1402 cm⁻¹ (H₂O), a 1389 cm⁻¹ (H₂O) i altres possibles pics emmascarats per l'absorció de lípid (C=O) al voltant de 1740 cm⁻¹, es poden assignar a residus de carboxílics que pateixen diferents tipus de canvis deguts a la interacció de la melibiosa.

Finalment, els pics a 1518 (-) i 1513 (+) cm⁻¹ (D₂O) (1520 cm⁻¹ (-) i 1515 cm⁻¹ (+) en H₂O) molt segurament corresponen a les cadenes laterals de Tyr (Barth, 2000; von Germar et al., 2000). Hi ha dos fets que corroboren aquesta assignació: 1) La seva intensitat augmenta degut al desplaçament cap a

números d'ona menors dels pics de l'amida II, i per tant desemmascarant pics amagats (Butler et al., 2002) i també per l'increment en el coeficient d'absorbància de la Tyr en D₂O (Barth, 2000). 2) Com s'observa, s'esperava un desplaçament cap a números d'ona menors de 1-2 cm⁻¹. Aquesta assignació estaria amb concordança amb l'aparició de pics a 1620 cm⁻¹ i 1615 cm⁻¹ en H₂O que correspondrien a cadenes laterals de Tyr (Barth, 2000).

4.6.5. Espectres de diferència en la regió de l'amida A

L'espectroscòpia de diferència d'infraroig normalment està dirigida cap a les vibracions de l'amida I i amida II. No obstant, la vibració de l'amida A que absorbeix entre 3320 i 3270 cm⁻¹ també és sensible als canvis en l'estructura secundària de la proteïna i de les cadenes laterals (Kandori i Maeda, 1995). Però el principal problema és que l'aigua també absorbeix en aquesta regió, disminuint la relació senyal/soroll. En canvi, en les diferències en D₂O, no hi ha banda d'aigua que absorbeixi a 3300 cm⁻¹, i per tant el soroll en aquesta zona disminueix considerablement. El mode de vibració de l'amida A és

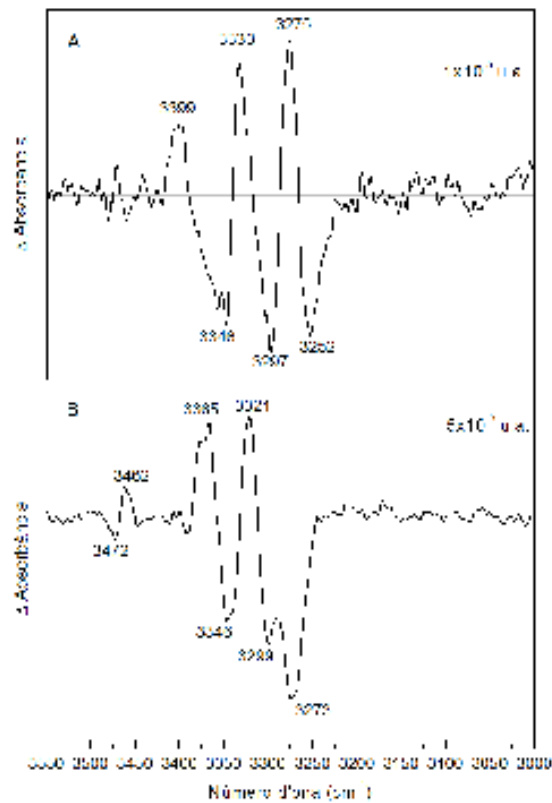


Figura 4.20. Espectres de diferència de la MelB induïts per la unió de Na⁺ i per la interacció de melibiosa en presència de Na⁺ en la regió de l'amida A.

A) Espectre de diferència en D₂O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pD 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 110 mM KCl, pD 6,6. La línia base va ser corregida (veure mètodes experimentals).

B) Espectre de diferència en D₂O de la MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa pD 6,6 menys MelB, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pD 6,6. La línia base va ser corregida (veure mètodes experimentals).

principalment degut a la vibració N-H; per tant, després de l'intercanvi H/D la banda de l'amida A conté exclusivament grups N-H no bescanviats.

La figura 4.20 mostra l'espectre de diferència en la regió de l'amida A de les diferències $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs. $\text{D}^+\cdot\text{MelB}$ i melibiosa· $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs. $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$. En els dos espectres, sense tenir en compte la distorsió de la línia base, es veuen pics positius i negatius per sobre el soroll. Per tal de tenir una millor visió es va fer una correcció de la línia base en els dos espectres. Confirmant les conclusions obtingudes a partir de les regions de l'amida I i l'amida II, l'espectre presenta una sèrie de pics positius i negatius corresponents a canvis conformacionals en la proteïna. A més, la diferència deguda a la interacció de la melibiosa té més intensitat que la diferència deguda a la unió de Na^+ . Els pics de la diferència melibiosa· $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs. $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ es poden assignar bàsicament a estructures hèlixs α i els pics a 3462 i 3472 cm^{-1} a la vibració de l'enllaç N-H que es troba en el grup indol dels Trp (Goormaghtigh et al., 1994c; Kandori i Maeda, 1995; Rath et al., 1998). L'aparició d'aquests pics està amb relació amb els canvis d'afinitat pel sucre en mutants de Trp de la MelB i en canvis en l'entorn d'alguns Trp degut a la unió de melibiosa (Cordat et al., 2000; Mus-Veteau i Leblanc, 1996). En l'espectre de diferència $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs. $\text{D}^+\cdot\text{MelB}$, el pic negatiu a 3252 cm^{-1} es podria assignar a làmines β i els pics a números d'ona majors a hèlixs α (Goormaghtigh et al., 1994c).

4.7. Espectres de diferència del mutant 3SV

Molts dels mutants fets de la MelB parteixen d'un transportador que no té Cys. La MelB salvatge té 4 Cys que es substitueixen per tres Ser i una Val. La permeasa resultant continua transportant melibiosa fent servir Na^+ , Li^+ o H^+ com a co-transportadors (Weissborn et al., 1997) i conserva aproximadament les mateixes propietats cinètiques de la MelB salvatge. Per tant, per poder estudiar els canvis conformacionals dels mutants de la MelB mitjançant espectroscòpia de diferència i veure quins canvis hi ha respecte a la proteïna salvatge abans s'han d'adquirir els corresponents espectres del mutant 3SV.

4.7.1. Espectres de diferència induïts per la unió dels cations

Igual que en el WT, el primer pas en el transport en el mutant 3SV és la unió del catió. La figura 4.21 presenta els espectres de diferència del quàdruple mutant 3SV, comparat amb el WT, induïts per la unió de Na^+ . Els dos espectres són molts semblants i només s'observen petites diferències en l'amida I que es poden assignar a variacions en la línia base entre les mostres degut a l'absorció de la banda d'aigua i al desplaçament del seu màxim degut a la presència de diferents cations (veure secció 4.4.4). Els espectres desconvulats (figura 4.21B) confirmen la similitud entre els dos espectres.

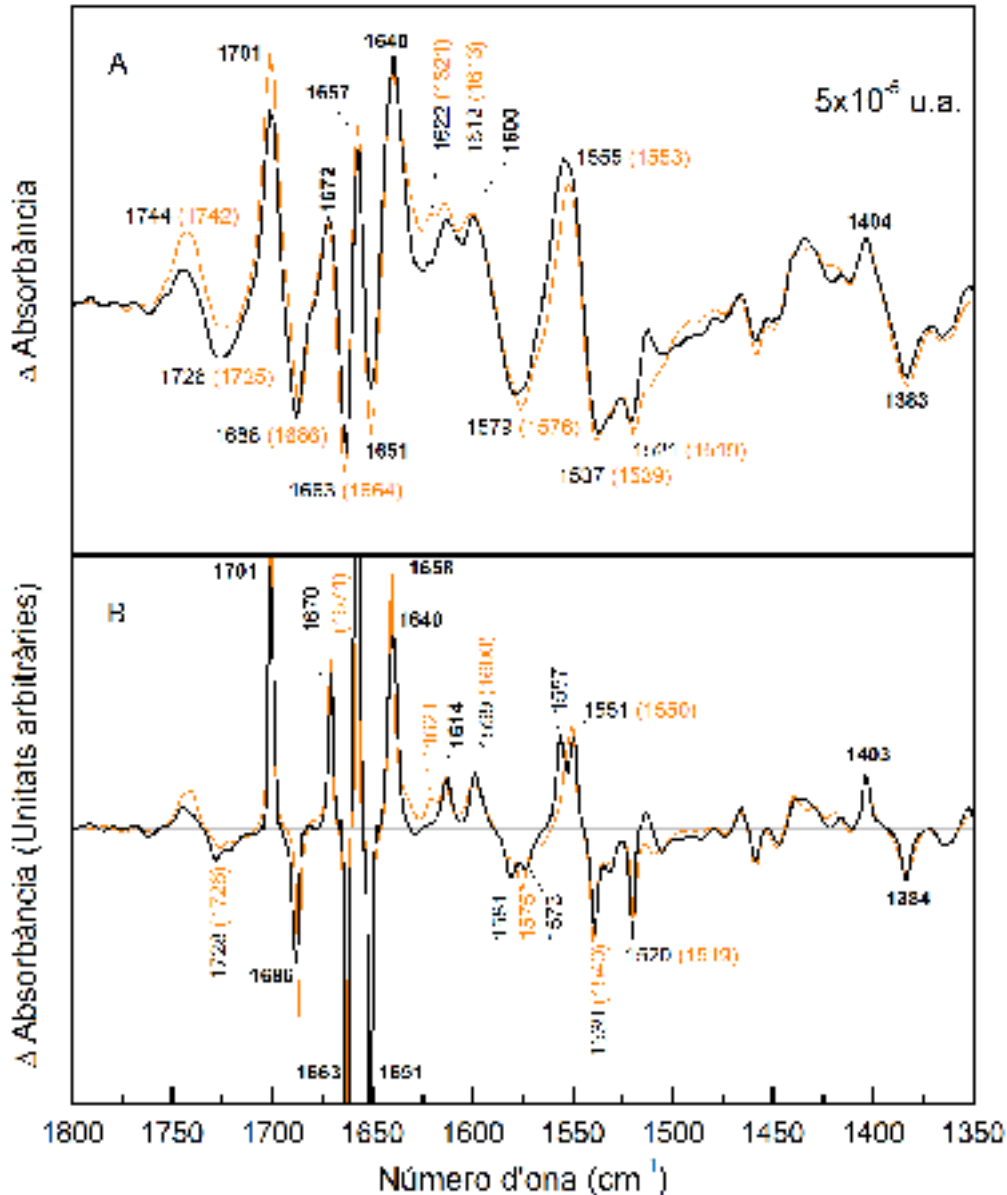


Figura 4.21. Espectre de diferència del mutant 3SV induït per la unió de Na⁺. Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys 3SV, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.12B.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

La figura 4.22 mostra els espectres de diferència del mutant 3SV i WT induïts per la unió de Li⁺. Les dues diferències són molt semblants en forma, però amb diferències significatives. El pic a 1697 cm⁻¹ té més intensitat en el WT i el pic a 1688 cm⁻¹ desapareix en el mutant 3SV. També s'observen altres canvis d'intensitat en els pics a 1659 cm⁻¹ i 1640 cm⁻¹ i en la regió de l'amida II i

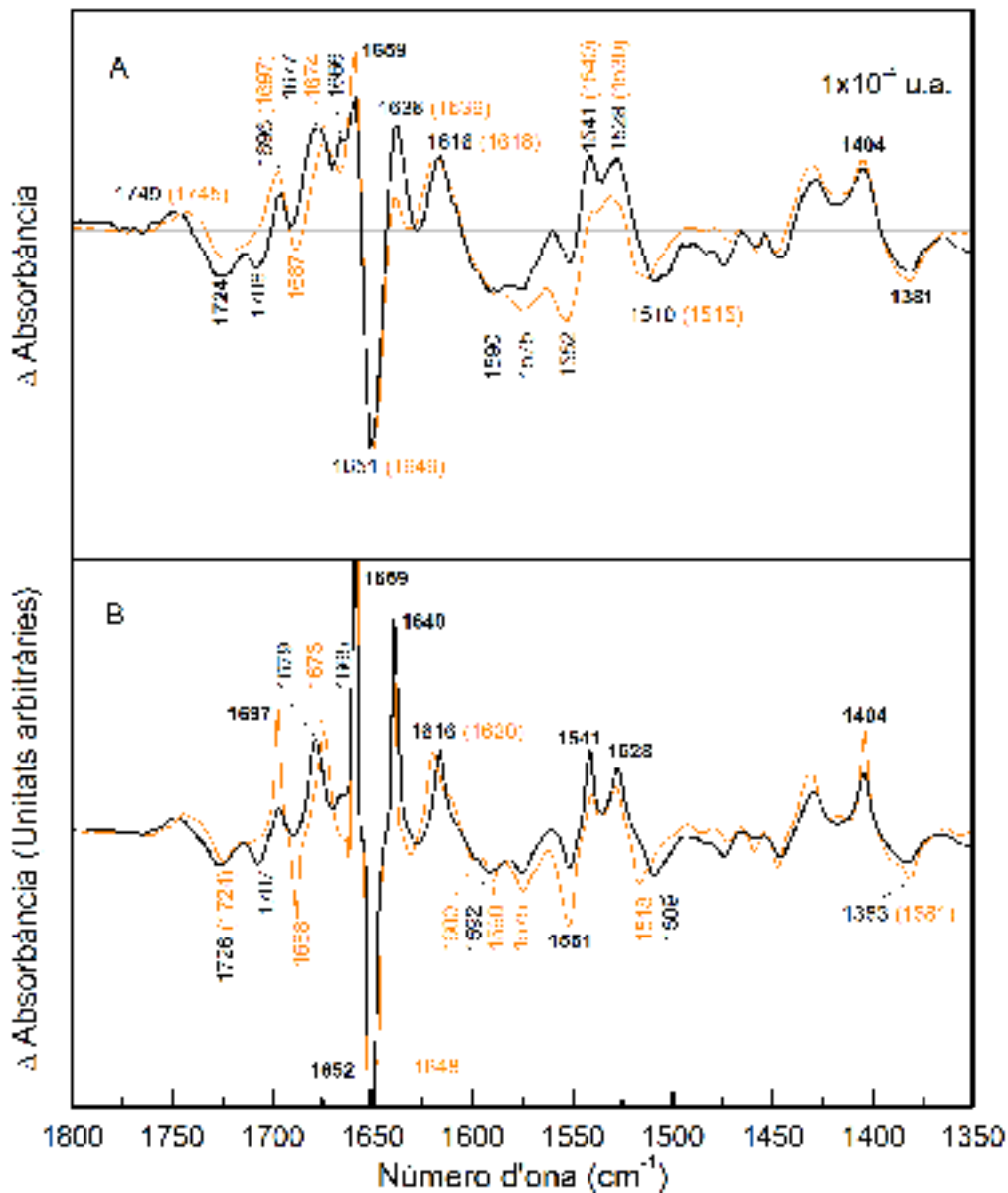


Figura 4.22. Espectre de diferència del mutant 3SV induït per la unió de Li^+ . Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negreta.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6 menys 3SV, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.13B.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

a més apareix un nou pic petit a 1665 cm^{-1} que té una assignació ambigua (hèlix α_{II} , girs, llaços oberts). A més, el pic a 1673 cm^{-1} té un desplaçament a números d'ona més grans de 6 cm^{-1} en la diferència del mutant 3SV. En canvi, altres regions com els pics al voltant de 1400 cm^{-1} , anteriorment assignats a cadenes laterals d'Asp, són molt semblants en els dos espectres. No obstant,

apareix un nou pic negatiu a 1707 cm^{-1} . Aquesta posició és massa baixa per assignar-se a lípids i massa alta per assignar-se a girs, encara que, en principi, els girs podrien absorbir fins a 1710 cm^{-1} (Krimm i Bandekar, 1986). Per tant, aquest pic probablement correspon a la desprotonació d'un àcid carboxílic (Barth, 2000) (o al canvi en l'entorn d'un carboxílic protonat) que segurament abans estava parcialment emmascarat pel pic intens a 1697 cm^{-1} en la diferència del WT.

Per tant, la unió del Na^+ en les dues permeases indueix els mateixos canvis conformacionals, en canvi l'efecte del Li^+ és lleugerament diferent en els dos transportadors.

4.7.2. Espectres de diferència induïts per la interacció de la melibiosa en presència dels diferents cations

La figura 4.23 correspon als espectres de diferència del mutant 3SV i el WT induïts per la unió/translocació de melibiosa en presència de Na^+ . Com es pot observar, els dos espectres són molt semblants, sobretot en la regió de l'amida I.

El pic negatiu a 1703 cm^{-1} que possiblement correspon a la vibració C=O d'algun Asp/Glu té la mateixa posició i intensitat tant en WT com en el mutant 3SV. En canvi, les vibracions antisimètriques (1600 cm^{-1}) i simètriques (1400 cm^{-1}) (COO^-) de les cadenes laterals dels àcids carboxílics presenten petites variacions, però es poden assignar a variacions entre experiments diferents.

Per tant, els dos espectres de diferència són molt semblants en tots els pics. Aquests resultats i els anteriors observats amb la unió del Na^+ estan amb concordança amb els resultats obtinguts per Weissborn et al. (1997), on veien que les propietats cinètiques del mutant 3SV són molt semblants a les del WT.

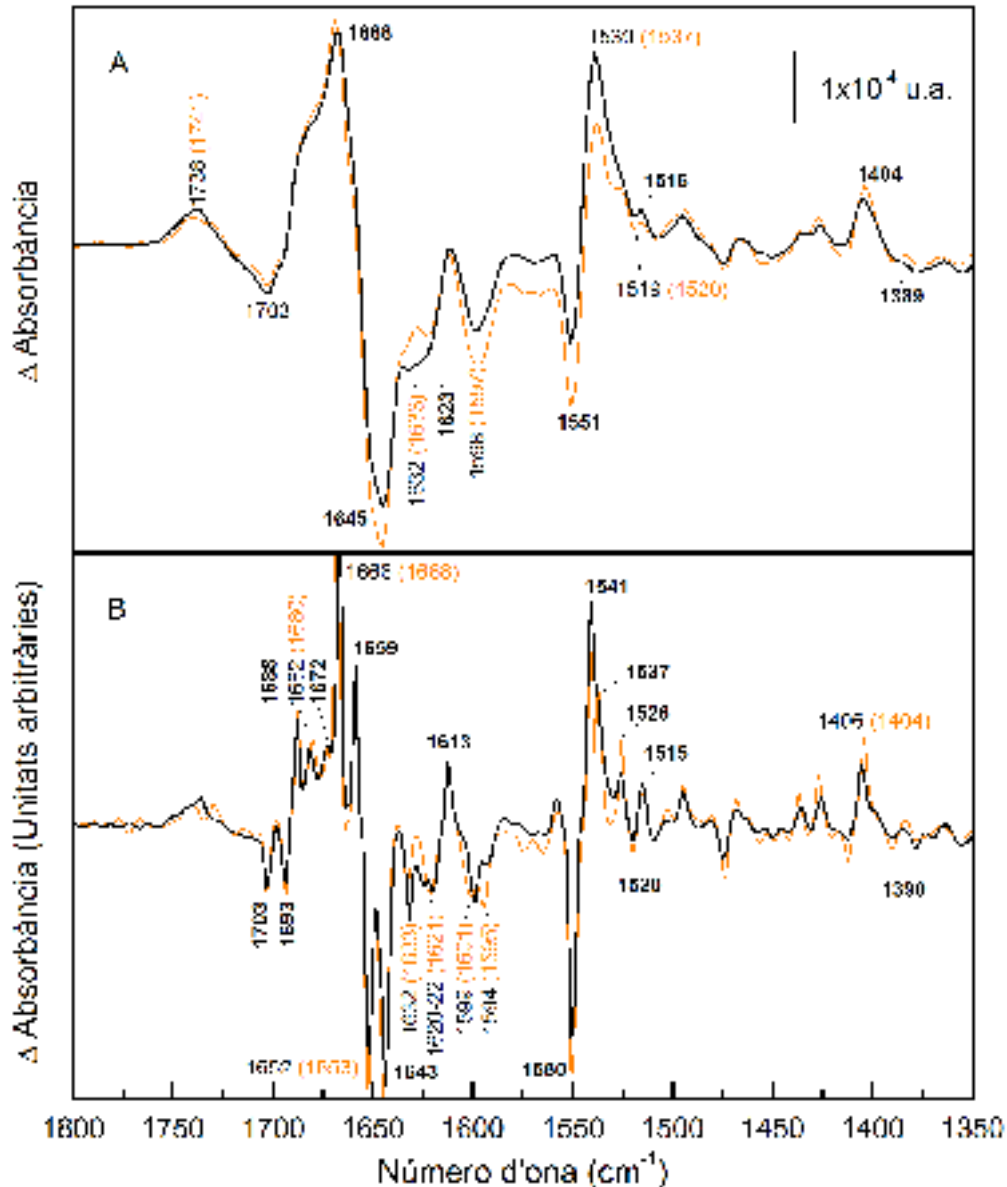


Figura 4.23. Espectre de diferència del mutant 3SV induït per la interacció de melibiosa en presència de Na⁺.

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.14A.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

La figura 4.24 mostra l'espectre de diferència degut a la unió/translocació de la melibiosa en presència de Li⁺ del mutant 3SV comparat amb el del WT. És sorprenent que les dues diferències presenten importants variacions

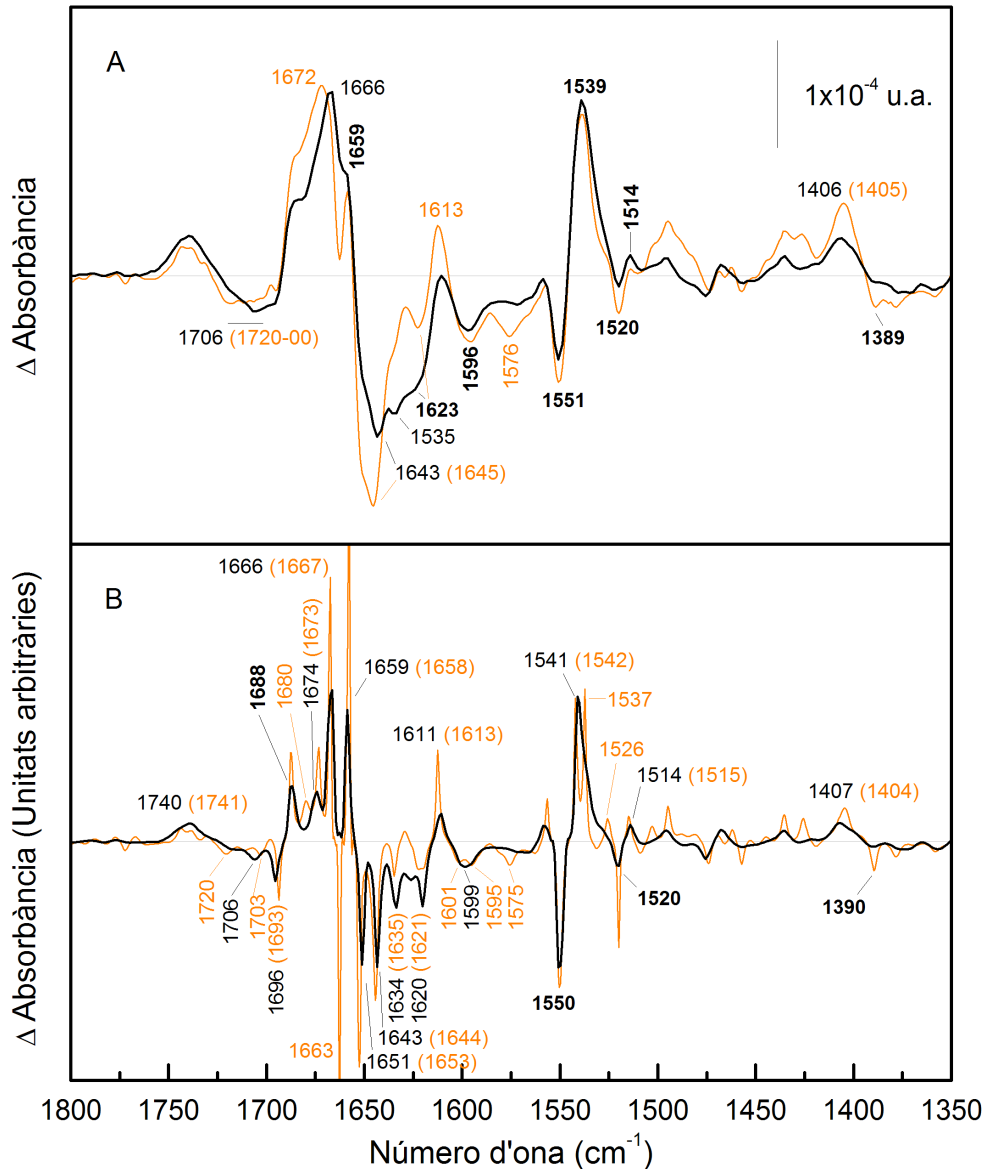


Figura 4.24. Espectre de diferència del mutant 3SV induït per la interacció de melibiosa en presència de Li^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.15 (línia vermella).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

comparat amb els espectres presentats anteriorment. Aquestes dissimilituds són presents tant en la intensitat dels pics com en la seva posició. El pic a 1680 cm^{-1} desapareix en la diferència del mutant 3SV i els pics a 1674 i 1688 cm^{-1} tenen menys intensitat. Tots aquests pics es van assignar anteriorment principalment a gir. El pic negatiu a 1663 cm^{-1} , que probablement correspon a

hèlix α , desapareix completament. Encara que no s'observen nous pics ni desaparició de cap dels ja existents en la regió entre $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ hi ha canvis en la intensitat dels pics. El mateix efecte s'observa en el pic a 1520 cm^{-1} en l'amida II.

Els pics al voltant de 1715 cm^{-1} (WT) que es poden assignar a cadenes laterals d'àcids carboxílics tenen un desplaçament cap a números d'ona menors fins a 1706 cm^{-1} (3SV), però s'ha de tenir en compte la possible contribució dels lípids en aquesta zona. Les vibracions antisimètriques i simètriques de l'enllaç COO^- també presenten dissimilituds. El pic a 1575 cm^{-1} (WT) té menys intensitat en la diferència del mutant 3SV. En canvi, el pic a 1596 cm^{-1} sembla que no es veu afectat per les mutacions i només té petits canvis en la seva intensitat que probablement deuen ser deguts a les petites variacions entre diferents mostres. Els pics a 1404 cm^{-1} (+) i 1390 cm^{-1} (-) en WT, tenen una disminució en la seva intensitat en el mutant 3SV i a més el pic de 1404 cm^{-1} té un desplaçament a 1407 cm^{-1} .

Finalment, la figura 4.25 mostra els espectres de diferència del mutant 3SV i del WT deguts a la interacció de melibiosa en presència d' H^+ . Els dos espectres de diferència presenten molta similitud i els únics canvis significatius s'aprecien per sobre de 1670 cm^{-1} que correspondria a la zona d'absorció dels girs.

El pic de carboxílics a 1708 cm^{-1} té més intensitat en la diferència del mutant 3SV que en la del WT. Però aquest augment d'intensitat deu ser degut a una major contribució de lípid, com s'observa també en el pic positiu a 1741 cm^{-1} . Finalment els pics a 1599 i 1404 cm^{-1} assignats a les cadenes laterals d'àcids carboxílics presenten molta similitud entre els dos espectres.

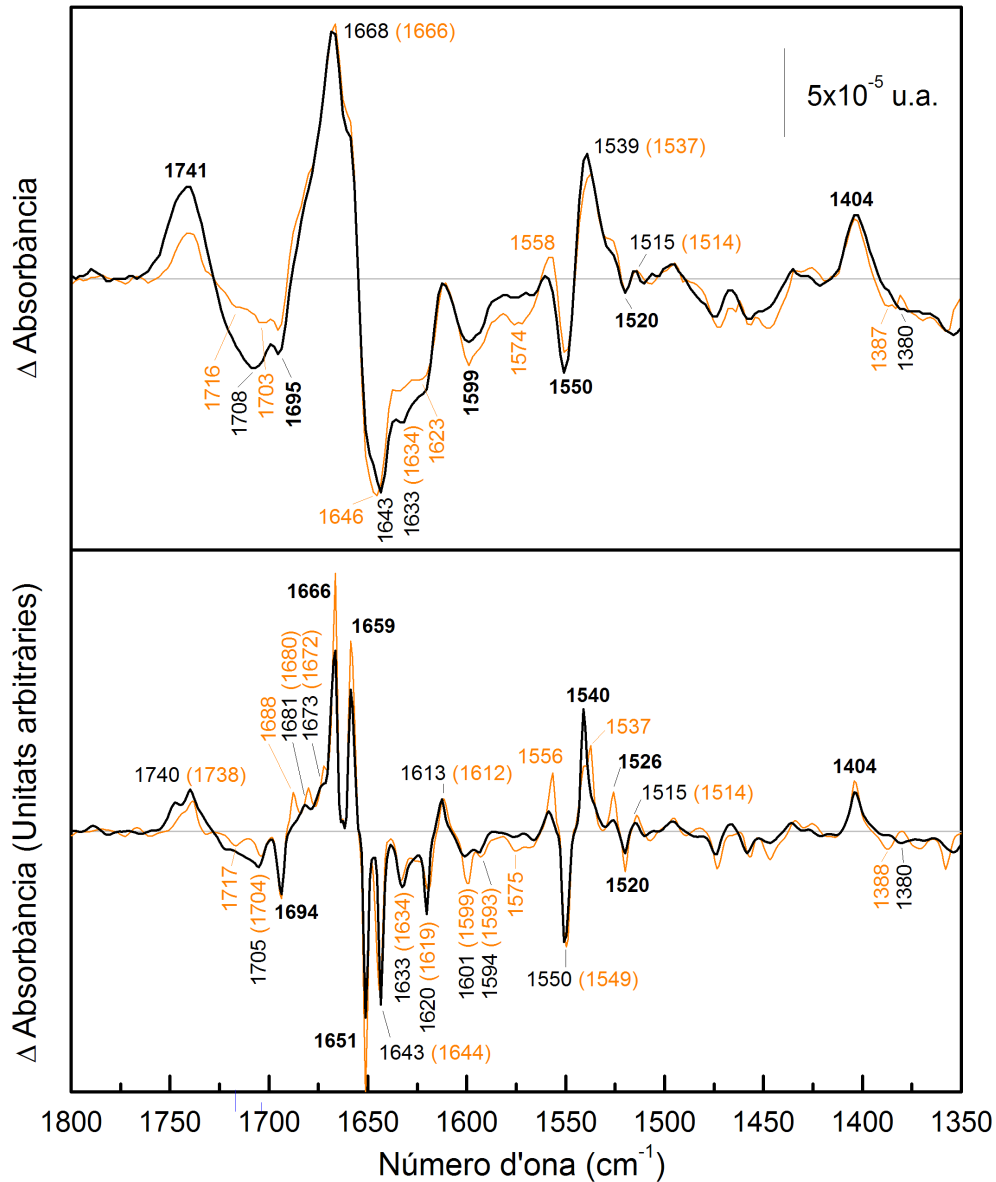


Figura 4.25. Espectre de diferència del mutant 3SV induït per la interacció de melibiosa en presència de H⁺.

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiosa, pH 6,6 menys 3SV, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.15 (línia blava).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

Per tant, les diferències en presència de Li⁺ (Li⁺·3SV vs. H⁺·3SV i melibiosa·Li⁺·3SV vs. Li⁺·3SV) són les que es veuen més afectades per la substitució de les cisteïnes. Per què hi ha aquestes diferències tan grans només en presència del catió Li⁺? Botfield i Wilson (1988) van aïllar mutants

que tenien l'especificitat del sucre i del catió alterada. Van trobar varis mutants que eren resistents a la inhibició a altes concentracions de Li^+ . Alguns d'aquest mutants estaven a prop de la Cys 364. Però és interessant que el mutant A240T, que presenta la resistència més elevada a l'efecte del Li^+ (referit com a mutant A236T en l'article), està molt proper a la Cys235. A més, el mutant A240T perd l'habilitat per transportar sucre acoblat a H^+ , encara que el transport acoblat a Na^+ és similar al WT (Kawakami et al., 1988). A més a més, aquest mutant perd l'habilitat per transportar el sucre metil- β -D-tiogalactopiranosid (TMG). Per tant, la mutació de la Cys235 per Val deu induir un canvi en l'entorn del residu A240, que se suposa que intervé tant en l'especificitat del catió com en la del sucre. Aquest canvi en l'entorn sembla que només deu afectar la interacció del Li^+ perquè l'espectre de diferència melibiosa· H^+ ·3SV vs. H^+ ·3SV és molt semblant al del WT.

4.8. Espectres de diferències del mutant R141C

Un dels mutants més interessants de la MelB és el mutant R141C degut a que té la característica de que pot unir substrats però no els pot translocar (Abdel-Dayem et al., 2003). Aquest residu es troba en el llaç 4-5 que s'ha vist que és important per la funció de la permeasa (Séry, 2002). Aquest mutant s'ha realitzat partint de la permeasa sense Cys i per tant els seus espectres de diferència es compararan amb els del mutant 3SV (veure secció 4.7).

4.8.1. Espectres de diferència induïts per la unió dels cations

L'afinitat del mutant R141C per la melibiosa, com en el mutant 3SV i el WT, augmenta en presència dels cations (Abdel-Dayem et al., 2003; Bassilana et al., 1987; Weissborn et al., 1997). Per tant, aquest mutant encara uneix Na^+ i Li^+ . Els espectres de diferència del mutant R141C i del mutant 3SV deguts a la unió de Na^+ (figura 4.26) són molt similars, per tant els canvis induïts pel Na^+ en el mutant R141C són semblant als induïts en el mutant 3SV. Com és sabut, aquests canvis conformacionals augmenten l'afinitat del transportador pel sucre. El canvi d'intensitat dels pics al voltant de 1610 cm^{-1} és possiblement degut a una variació de la línia base degut a l'absorbància de l'aigua a prop d'aquesta zona. No obstant es poden observar algunes variacions entre els dos mutants en la regió de l'amida II. En la diferència del mutant R141C hi ha una disminució de la intensitat d'aquesta regió respecte el 3SV sense la corresponent disminució de la intensitat de la regió de l'amida I. Aquesta disminució pot ser deguda a un efecte dicroic o a diferents efectes dels canvis estructurals en les dues vibracions. La disminució de la intensitat de la zona entre $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ en l'amida I no es pot relacionar amb la disminució de l'àrea dels pics de l'amida II, perquè diversos espectres de diferència mostren que no hi ha relació entre aquestes àrees. Els pics assignats a àcids carboxílics no tenen canvis en els dos espectres, exceptuant la disminució del pic a $1600 (+)\text{ cm}^{-1}$ (vibració asimètrica COO^-) que segurament també es pot assignar a una variació de la línia base.

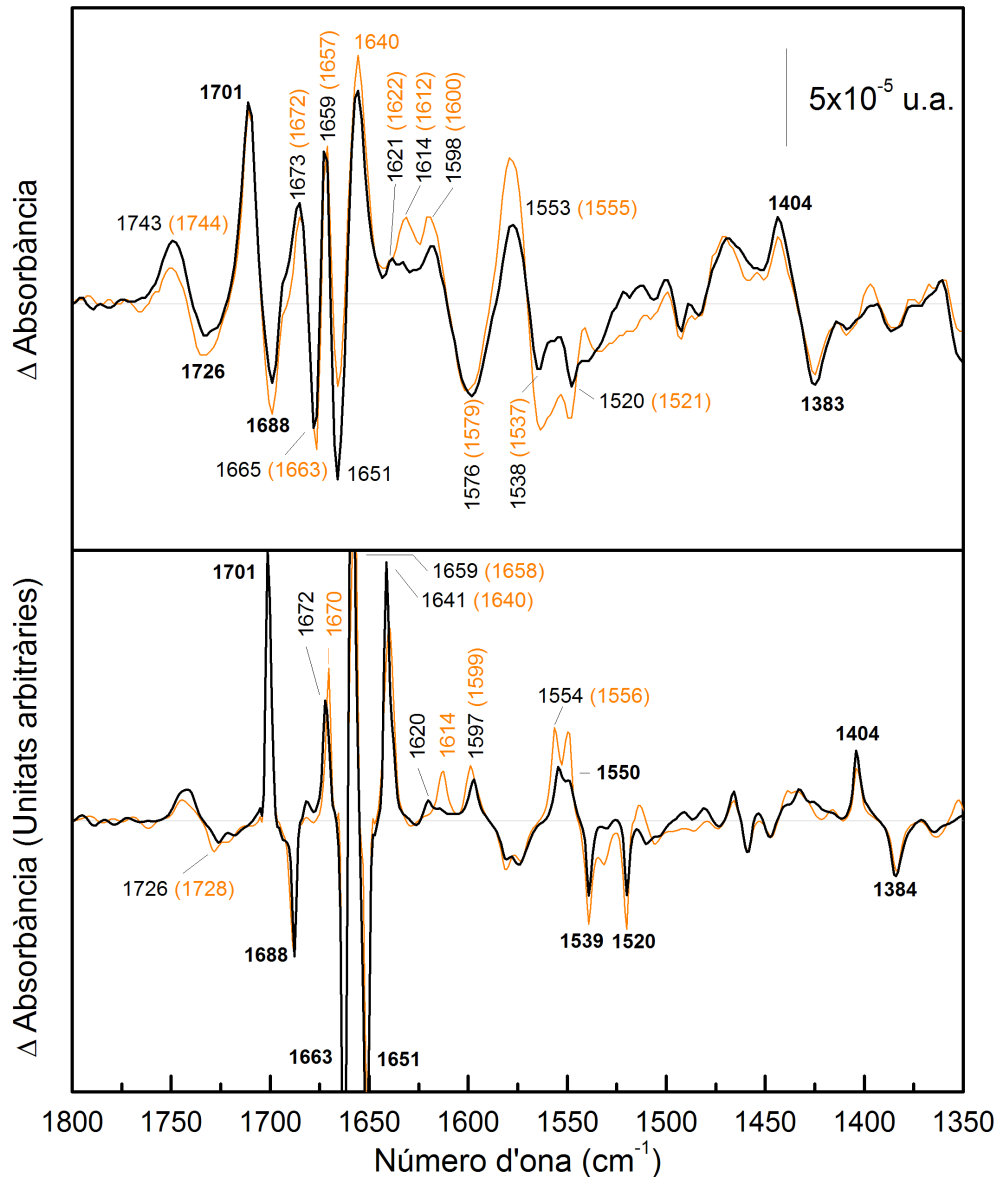


Figura 4.26. Espectre de diferència del mutant R141C induït per la unió de Na^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys R141C, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.21A (línia negra).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A (línia negra). (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

La diferència $\text{Li}^+\cdot\text{R141C}$ vs. $\text{H}^+\cdot\text{R141C}$ (figura 4.27) és molt similar a la mateixa diferència del mutant 3SV. Només s'observen canvis en la intensitat en el pic a 1659 cm^{-1} assignat a hèlix α i en els pics de la regió de l'amida II (1551 i 1541 cm^{-1}) que podria correspondre tant a fluctuació de la línia base com a

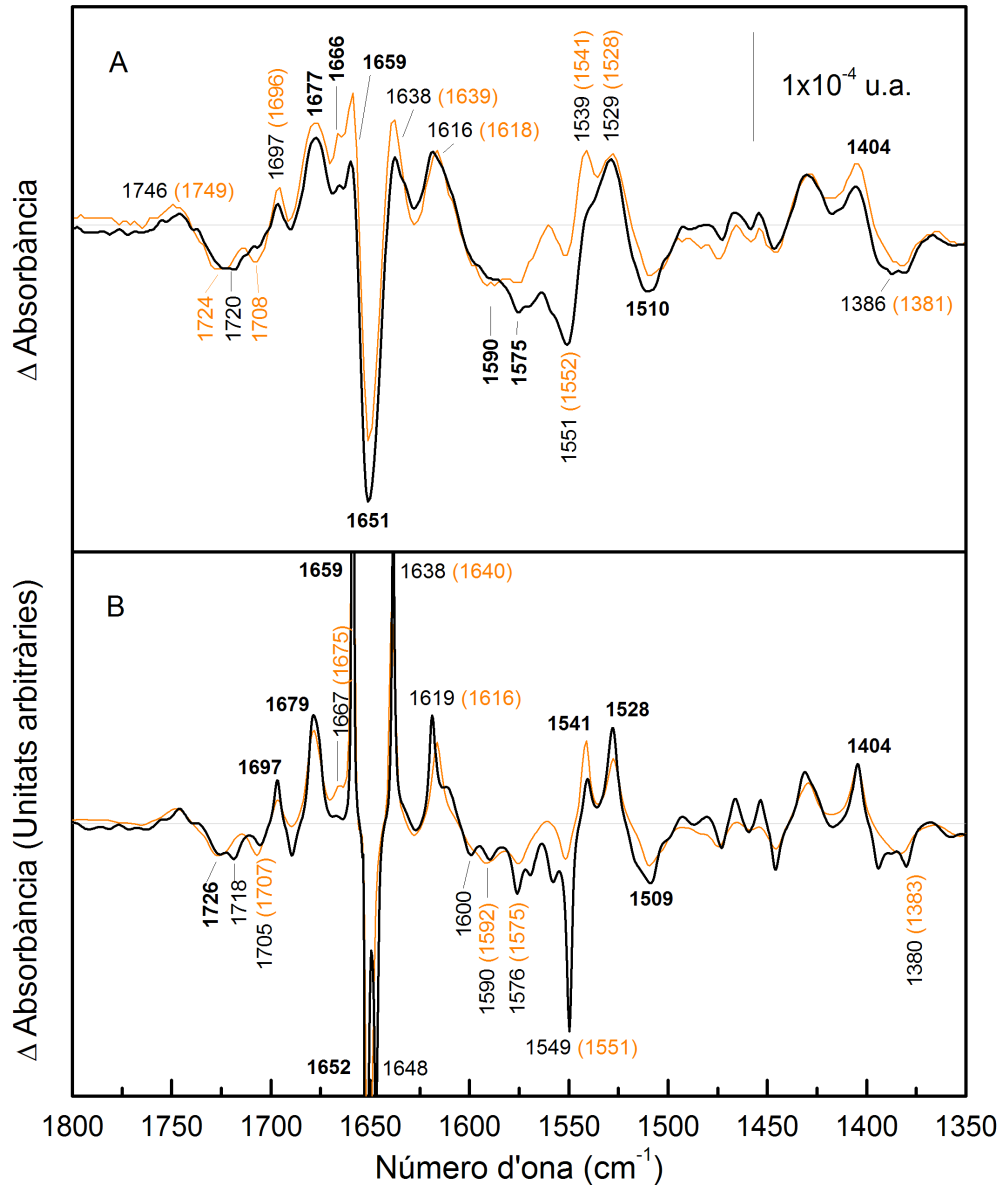


Figura 4.27. Espectre de diferència del mutant R141C induït per la unió de Li^+ . Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negreta.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6 menys R141C, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.22A (*línia negra*).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A (*línia negra*). (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (*línia taronja*).

canvis en la vibració de l'amida II. S'ha de tenir en compte que la intensitat del pic a 1659 cm^{-1} variava lleugerament entre els diferents espectres de diferència adquirits, on dos d'ells tenien la mateixa intensitat que el pic de la diferència del mutant 3SV. El pic negatiu a 1707 cm^{-1} , que es pot assignar a la vibració de la cadena lateral d'un àcid carboxílic protonat (Barth, 2000), té menys intensitat en

el mutant R141C, indicant possibles variacions en els carbonils entre el R141C i el 3SV.

4.8.2. Espectres de diferència induïts per la unió de melibiosa en presència dels diferents cations

El mutant R141C uneix però no transporta els substrats, per tant esperem observar canvis en l'espectre de diferència relacionats amb les estructures que intervenen en aquest procés. La diferència melibiosa·Na⁺·R141C vs. Na⁺·R141C (figura 4.28) té una forma similar a la mateixa diferència en el mutant 3SV però presenta algunes variacions. En la regió de l'amida I hi ha canvis en la regió dels girs (números d'ona per sobre 1670 cm⁻¹). El pic a 1672 cm⁻¹, que s'assignava a girs no accessibles al solvent o a hèlixs α_{II}, desapareix. Una altra variació en l'amida I és la desaparició del pic a 1632 (-) cm⁻¹ i l'aparició del pic a 1637 (+) cm⁻¹ en el mutant R141C. Aquests pics deuen reflectir diferents canvis en les estructures secundàries de làmines β entre els mutants R141C i 3SV degut a la interacció de la melibiosa. Estudis realitzats sobre el grau de bescanvi H/D de la MelB en presència dels diferents substrats (Dave et al., 2002) mostraven una protecció de les làmines β degut a la unió de la melibiosa. La mutació R141C es troba en el llaç 4-5 que s'ha proposat que té part d'estructura de làmina β (Dave et al., 2000).

Una de les diferències més interessants entre els dos espectres és la desaparició del pic a 1659 cm⁻¹. En el WT i en el 3SV aquest pic s'assignava a una variació en la inclinació d'algunes hèlixs α (Baenziger i Chew, 1997; Bergo et al., 2003; Marsh, 1999; Rothschild et al., 1993), en canvi aquesta variació no s'observa en el mutant R141C. Per tant, els canvis en la inclinació d'algunes hèlixs deguts a la translocació dels substrats no es deu donar en aquest mutant.

La regió de l'amida II entre 1545 i 1520 cm⁻¹ presenta diferent forma en comparació amb el 3SV. A més, els pics a 1515 (-) cm⁻¹ i 1520 (+) cm⁻¹ que prèviament s'han assignat a cadenes laterals de Tyr tenen menys intensitat en la diferència corresponent al mutant R141C, però segurament deu ser degut a una superposició d'aquests pics amb el pic a 1526 (+) cm⁻¹ que és més intens en l'espectre de diferència del mutant R141C.

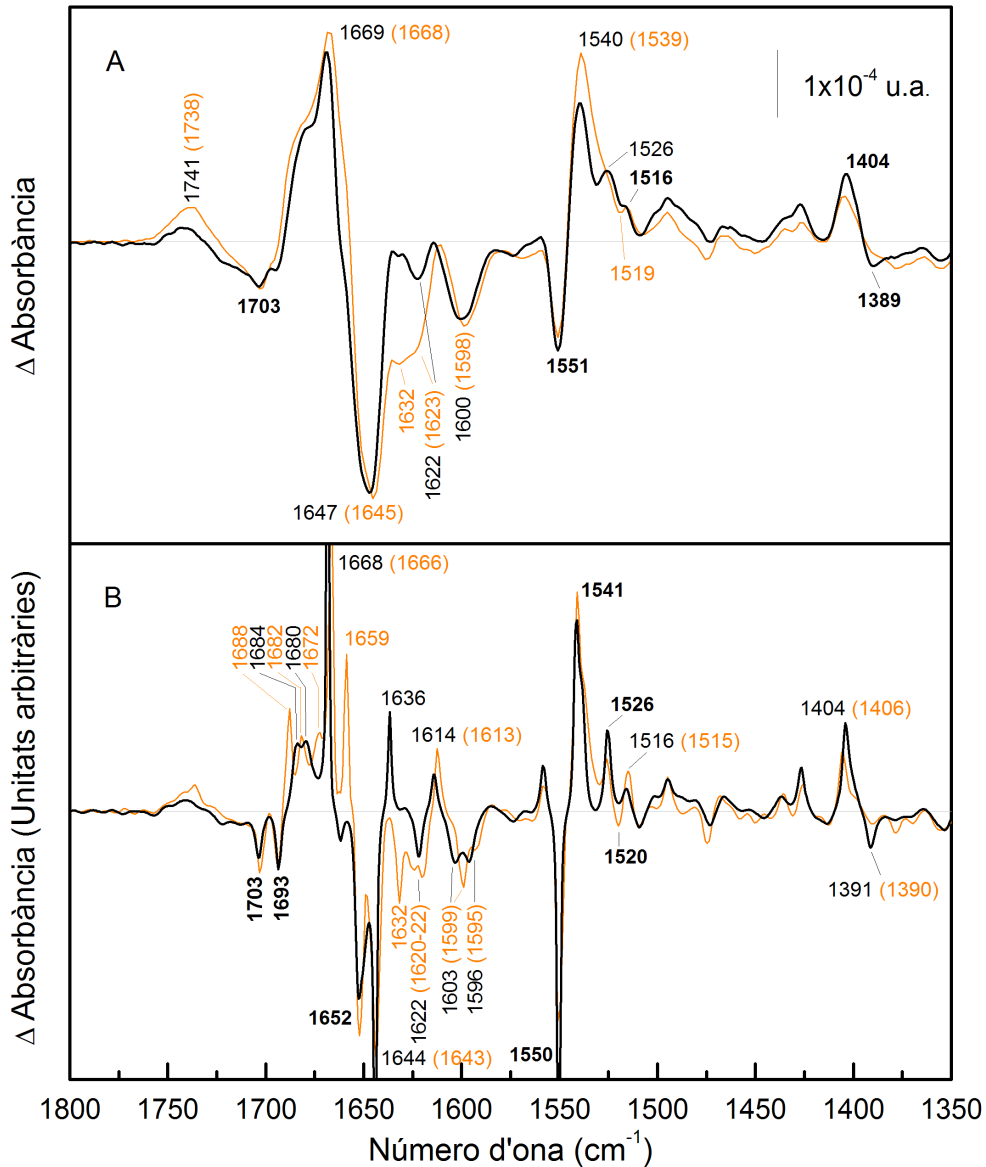


Figura 4.28. Espectre de diferència del mutant R141C induït per la unió de melibiosa en presència de Na^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.23A (*línia negra*).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A (*línia negra*). (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (*línia taronja*).

Altres pics que són d'especial interès són aquells que s'assignen a les cadenes laterals d'Asp i Glu. El pic que correspon a la vibració de l'enllaç $\text{C}=\text{O}$ a 1703 cm^{-1} té la mateixa posició i intensitat en els mutants R141C i 3SV. La vibració antisimètrica de l'enllaç COO^- a 1598 cm^{-1} és molt semblant en els dos

espectres. En canvi, la vibració simètrica al voltant de 1400 cm^{-1} té un petit desplaçament cap a números d'ona menors i augmenta lleugerament la seva intensitat. Per tant, la mutació no afecta considerablement als pics d'àcids carboxílics.

Un altre pic assignable a cadenes laterals d'aminoàcids és el pic a 1526 cm^{-1} , que podria correspondre a Lys (Barth, 2000; von Germar et al., 2000), encara que, com ja s'ha anat comentant amb anterioritat, també es pot assignar a la vibració de l'amida II (Goormaghtigh et al., 1994c). Aquest pic té més intensitat en l'espectre de diferència del mutant R141C.

La figura 4.29 presenta els espectres de diferència del mutant R141C i del mutant 3SV induïts per la interacció de la melibiosa en presència de Li^+ . L'espectre de diferència del mutant R141C és bastant diferent a la diferència del mutant 3SV. És sorprenent que les diferències del mutant R141C degudes a la unió de la melibiosa en presència de Na^+ i Li^+ siguin tan semblants, tenint en compte les dissimilituds que hi ha entre aquests espectres en el mutant 3SV (veure secció 4.7.2). Per tant, els canvis conformacionals que estan involucrats en la unió de la melibiosa deuen ser molt semblants en presència de Na^+ o de Li^+ . En canvi, les majors diferències estructurals es deuen trobar en la translocació i alliberament dels substrats.

En la diferència del mutant R141C s'observen petits desplaçaments dels pics per sobre 1674 cm^{-1} que correspon a la zona d'absorció dels girs. No obstant, el canvi més interessant és un altre cop la desaparició del pic a 1659 cm^{-1} assignat a la variació de la inclinació d'hèlixs α . Per tant, en presència de Li^+ la unió de melibiosa no provoca canvis en la inclinació d'aquestes hèlixs. Igual que en la diferència melibiosa· Na^+ ·R141C vs. Na^+ ·R141C el pic negatiu a 1634 cm^{-1} assignat a làmines β desapareix.

La forma de l'espectre en la regió de l'amida II entre $1645\text{-}1622\text{ cm}^{-1}$ és diferent entre els dos espectres de diferència, encara que també hi podria haver la contribució d'aminoàcids com Lys que correspondria al pic a 1526 cm^{-1} (Barth, 2000). En canvi, no s'observen canvis en els pics assignats a Tyr (1520 cm^{-1} (-) i 1514 cm^{-1} (+)).

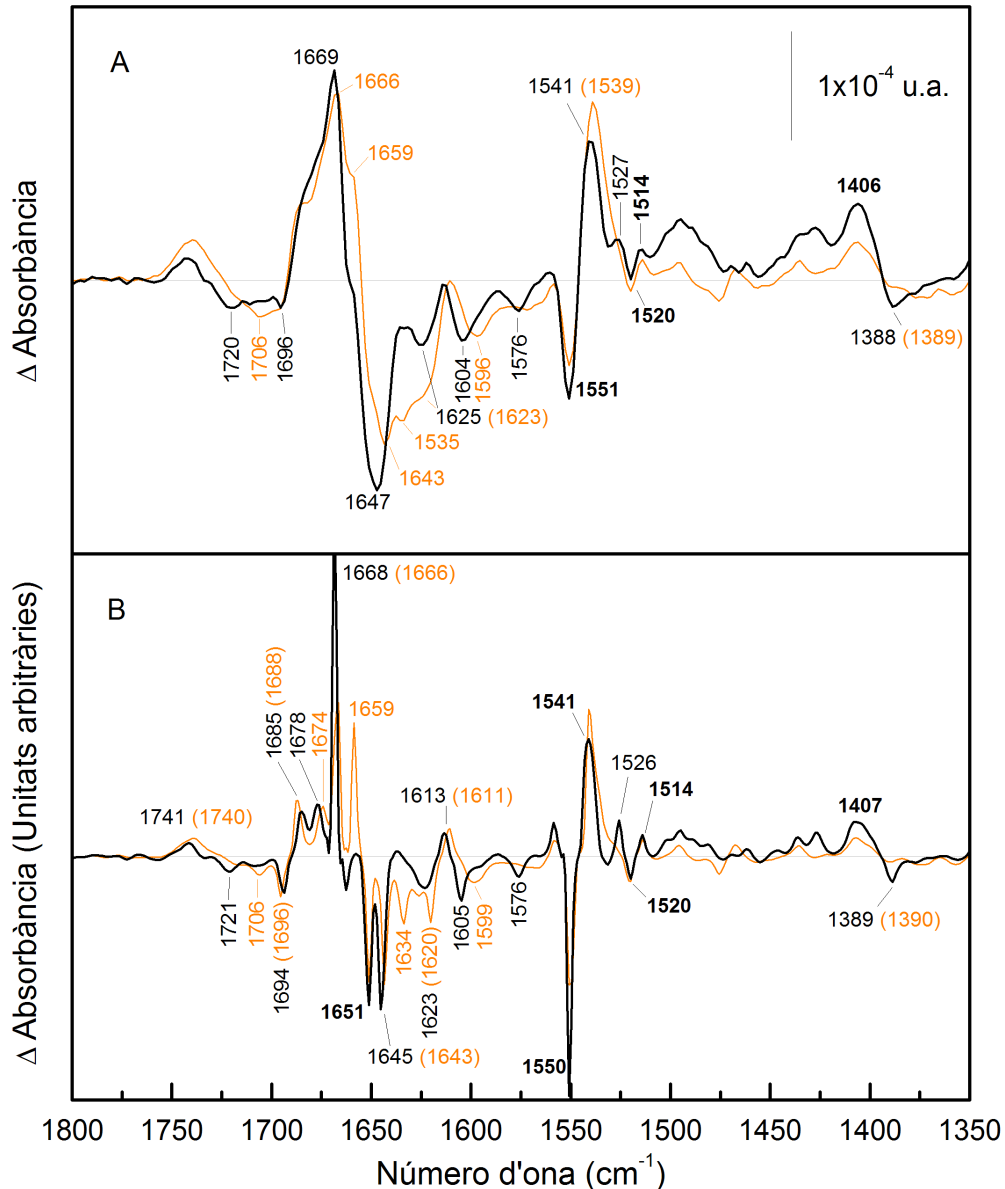


Figura 4.29. Espectre de diferència del mutant R141C induït per la unió de melibiosa en presència de Li^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.24A (línia negra).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A (línia negra). (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

El pic de carbonils a 1706 cm^{-1} té un desplaçament a números d'ona més grans, encara que s'ha de tenir en compte la possible contribució de lípids. Els pics corresponents a la vibració antisimètrica presenten molta variació, amb un desplaçament del pic a 1605 (-) cm^{-1} fins a 1599 (-) cm^{-1} . A més, els pics

negatius a prop de 1575 cm^{-1} presenten diferent forma en els dos espectres. Els pics corresponents a la vibració simètrica ($1406 (+)$ i $1388 (-)$ cm^{-1} en el mutant R141C) presenten també variacions entre els dos espectres. Per tant, els àcids carboxílics involucrats en la unió i transport de melibiosa es veuen més afectats per la mutació de l'Arg141 quan el catió responsable del co-transport és el Li^+ .

La figura 4.30 correspon a l'espectre de diferència melibiosa· H^+ ·R141C vs. H^+ ·R141C comparat amb el mateix espectre del mutant 3SV. Un altre cop s'observen canvis en la zona d'absorció dels girs. Només s'observa un pic en l'espectre desconvulat a 1680 cm^{-1} . Igual que en les altres diferències del mutant R141C degudes a la unió de la melibiosa en presència dels cations, el pic negatiu a 1633 cm^{-1} assignat a làmines β desapareix.

Els pics de Tyr no es resolen en la desconvolució, però segurament aquests pics estan emmascarats pel pic relativament intens a 1526 cm^{-1} . Per exemple, en l'espectre sense desconvular es pot veure clarament un petit pic positiu a 1515 cm^{-1} .

Les variacions que hi ha en el pic a 1708 cm^{-1} , en la zona d'absorció dels carbonils, deuen correspondre a lípid. Les vibracions simètriques i antisimètriques no presenten variacions importants, encara que la variació més significativa seria el desplaçament del pic a 1599 cm^{-1} fins a 1602 cm^{-1} .

Però un altre cop el pic més interessants és el pic a 1659 cm^{-1} . En l'espectre de diferència melibiosa· H^+ ·R141C vs. H^+ ·R141C aquest pic no desapareix com passava amb les diferències anteriors, però sí que té disminuïda la seva intensitat. El pic a 1659 cm^{-1} és un pic que s'observa en totes les diferències dels mutant 3SV (igual que el WT), tant a les diferències d'unió del catió com en les diferències d'unió de la melibiosa. Per tant, la unió dels cations provoca un canvi en la inclinació d'algunes hèlixs i la unió de melibiosa provoca canvis addicionals en aquestes estructures. En el mutant R141C la unió dels cations també provoca un canvi en la inclinació d'aquestes hèlixs, però la unió de melibiosa en presència de Na^+ o Li^+ ja no provoca més canvis en aquesta inclinació. Ara bé, els espectres de diferència obtinguts en absència de cations afegits corresponen a la proteïna en presència d' H^+ . Per tant, l'espectre de diferència melibiosa· H^+ ·R141C vs. H^+ ·R141C correspon a estats de la proteïna en la que no hi hagut prèviament una variació de la

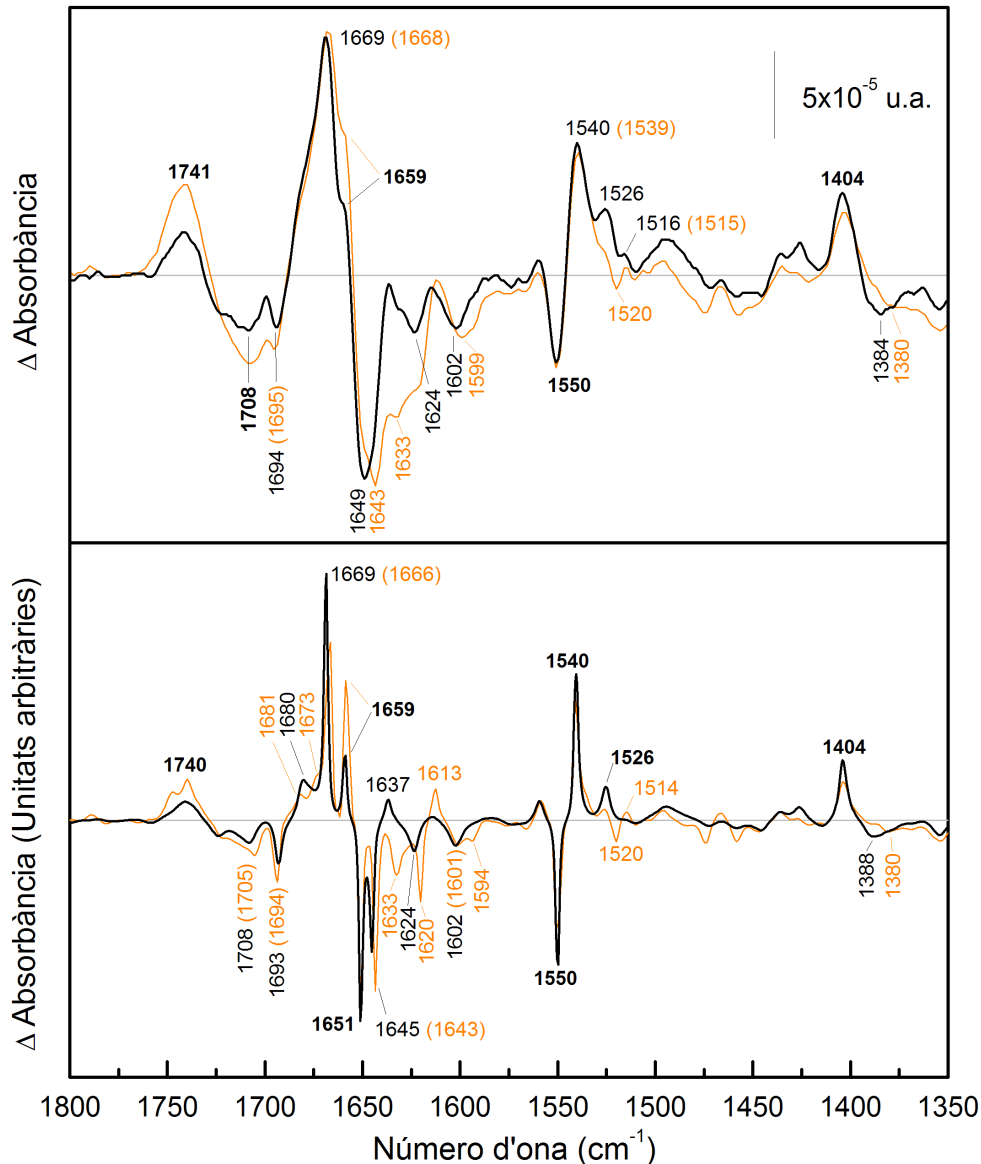


Figura 4.30. Espectre de diferència del mutant R141C induït per la unió de melibiosa en presència de H^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiosa, pH 6,6 menys R141C, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.25A (línia negra).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A (línia negra). (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

inclinació d'aquestes hèlixs deguda a la unió dels cations. Per tant, la unió de melibiosa en aquest cas sí que varia la inclinació d'aquestes hèlixs, però en menor grau que el 3SV, probablement el que correspondria a la variació que provoquen els cations Na^+ o Li^+ per sí sols.

4.9. Espectres de diferència de la MelB WT reaccionada amb NEM

En l'apart anterior s'estudiava un mutant de la permeasa que tenia l'habilitat d'unir els substrats, però no de transportar-los. La MelB reaccionada amb el reactiu N-ethylmaleimide (NEM) presenta les mateixes propietats. Però en aquest cas la inhibició ve donada per la presència del reactiu NEM unit a la Cys364 que es proposa que es troba en el llaç 10-11 (Weissborn et al., 1997). En canvi, en el cas anterior la inhibició venia donada per una mutació en el llaç 4-5. Justament s'ha proposat que aquests dos llaços són mòbils i que tenen una funció important en el transport de la MelB (Abramson et al., 2003; Ding, 2003, 2004). Per tant, l'objectiu del següent estudi és observar els canvis conformacionals deguts a la interacció dels substrats en una altra permeasa que no pot transportar-los i comparar-los amb aquells obtinguts anteriorment pel mutant R141C. També es vol establir quina és la funció d'aquests dos llaços i com la seva modificació afecta l'estructura/funció de la MelB.

4.9.1. Espectres de diferència de la MelB-NEM induïts per la unió de melibiosa en presència dels diferents cations

La figura 4.31 mostra els espectres de diferència de la MelB reaccionada i sense reaccionar amb NEM (MelB-NEM i WT, respectivament) produïts per la unió amb la melibiosa en presència de Na^+ . En els espectres sense desconvular es pot apreciar que els dos espectres de diferència són pràcticament iguals i que no hi ha diferències entre ells. En els espectres desconvulats és pot tornar a apreciar aquesta similitud, encara que es poden observar petites diferències en la zona d'absorció dels girs reversos i làmines β d'alta freqüència (per sobre 1670 cm^{-1}). S'observa una disminució de la intensitat del pic a 1688 cm^{-1} i un desplaçament cap a números d'ona majors del pic a 1672 cm^{-1} . S'ha de tenir en compte que aquest pic a 1672 cm^{-1} s'observa també en el mutant 3SV (secció 4.7.2, figura 4.23), i per tant, aquest petit desplaçament de 2 cm^{-1} a números d'ona majors d'aquest pic que apareix amb la desconvolució de l'espectre de la MelB reaccionada amb NEM és significatiu.

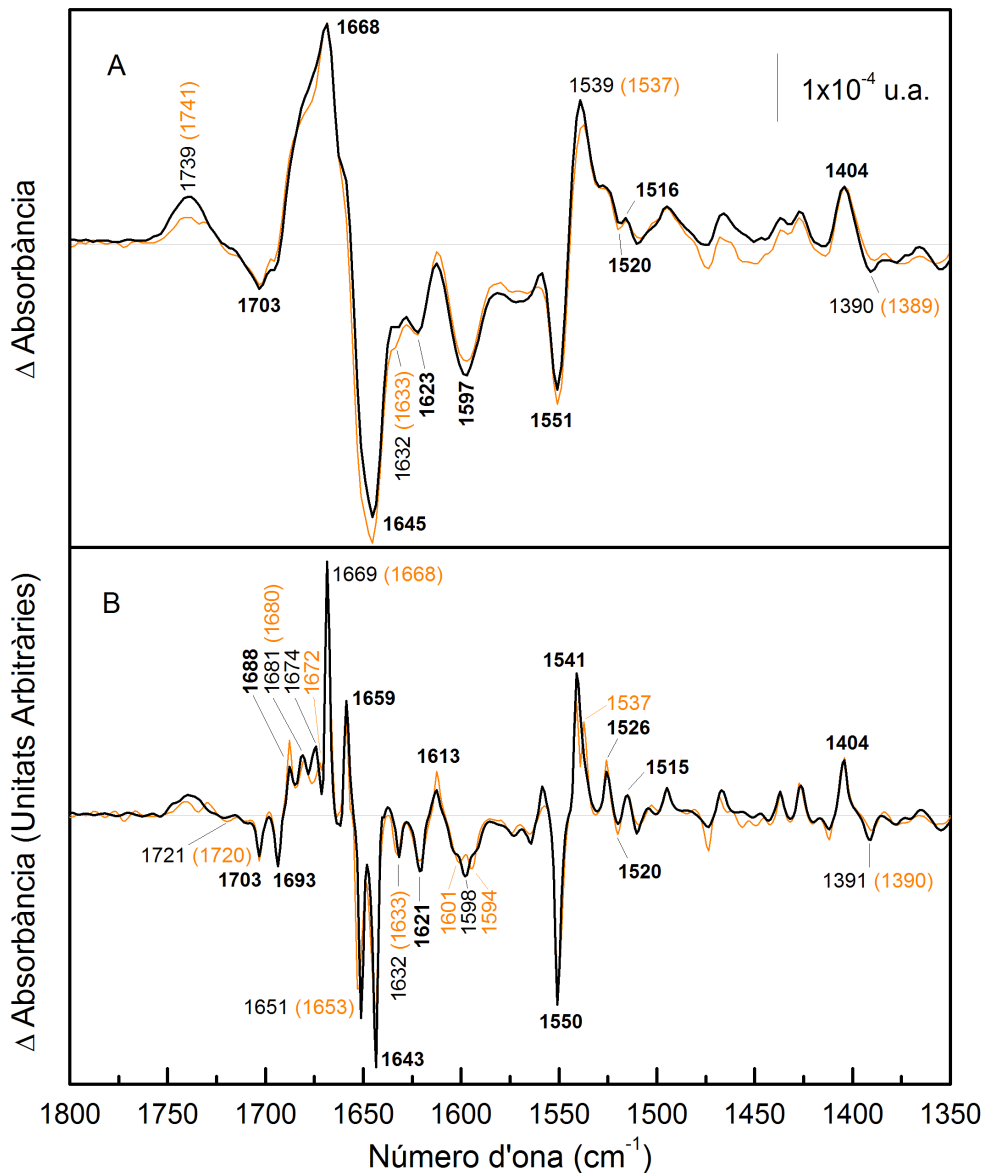


Figura 4.31. Espectre de diferència de la MelB-NEM induït per la unió de melibiosa en presència de Na^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència de la MelB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MelB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.14A.

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

La figura 4.32 presenta els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa en presència de Li^+ . Com en el cas anterior, els espectres del WT i de la MelB-NEM són molt similars. En l'espectre desconvulat els pics de la diferència MelB-NEM estan menys resolts però la majoria no presenten menor

àrea. Els canvis que es poden atribuir a la reacció amb el NEM són un altre cop a pics corresponents a girs reversos i làmines β d'alta freqüència. El pic a 1688 cm^{-1} torna a tenir disminuïda la seva intensitat i el pic a 1680 cm^{-1} té un desplaçament fins a 1682 cm^{-1} .

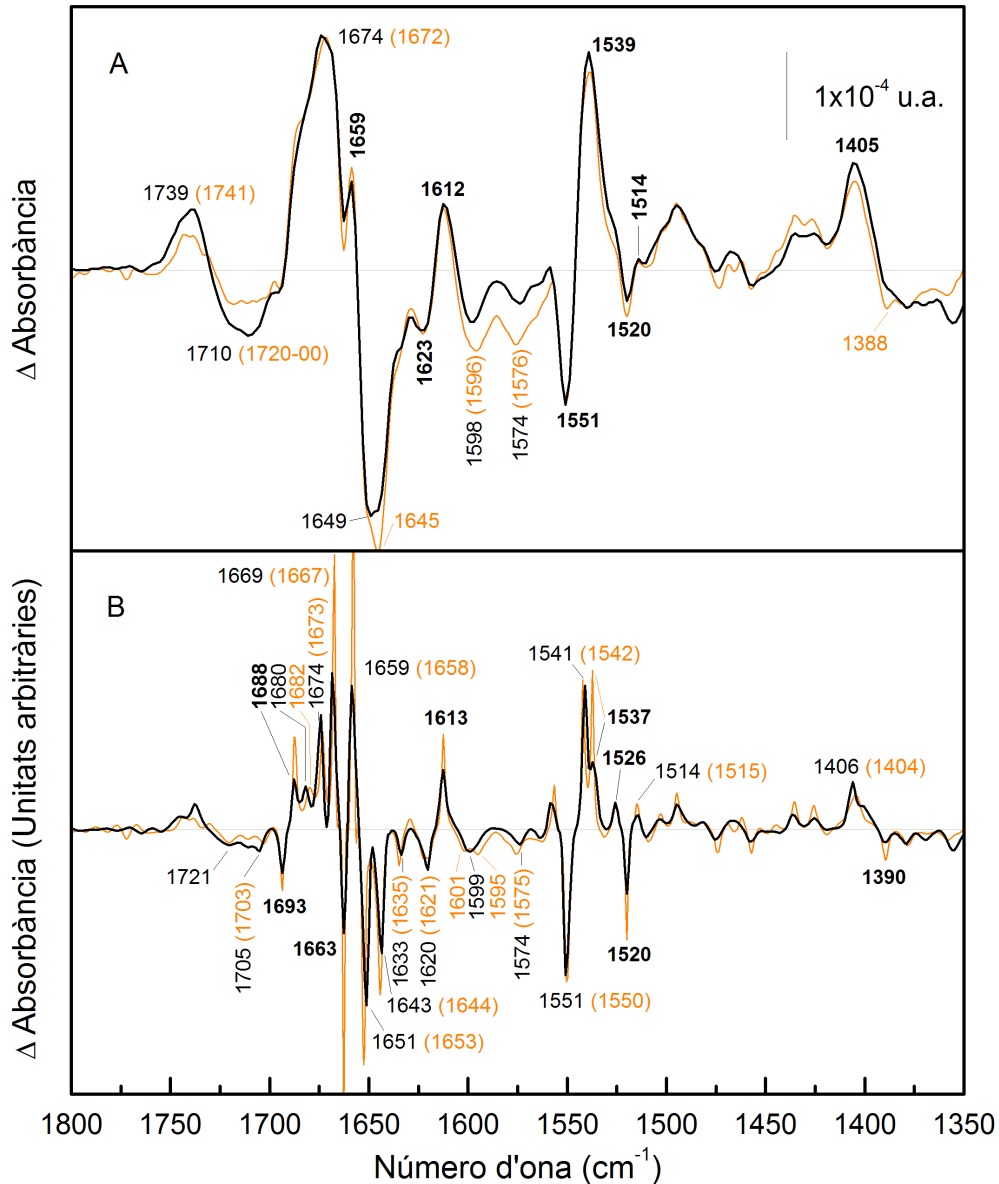


Figura 4.32. Espectre de diferència de la MeIB-NEM induït per la unió de melibiosa en presència de Li^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència de la MeIB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.15 (línia vermella).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

Finalment, les diferències que mostren més variacions són les degudes a la unió de melibiosa en presència d'H⁺ (figura 4.33). En l'amida I, en la regió de 1655-1690 cm⁻¹, la diferència MelB-NEM presenta variacions notables respecte a la del WT. En l'espectre desconvulat aquestes variacions es poden apreciar millor. El pic a 1688 cm⁻¹ té disminuïda la seva intensitat. A més, com en el cas de la diferència en presència de Na⁺ el pic a 1672 cm⁻¹ es desplaça a 1674 cm⁻¹. Tots aquests pics estan en la regió dels girs reversos i també es poden assignar a làmines β d'alta freqüència (Tatulian, 2003). En la regió de les hèlixs α el pic a 1666 cm⁻¹ sofreix un desplaçament fins a 1669 cm⁻¹. Però el més interessant d'aquesta zona és l'aparició d'un pic a 1663 cm⁻¹. Aquest pic, que s'assigna a hèlixs α (Kluge et al., 1998), és un pic característic de la diferència melibiosa·Li⁺·MelB vs. Li⁺·MelB (veure secció 4.5.3, figura 4.16), degut a que només apareix quan els dos substrats interaccionen conjuntament amb la MelB. En canvi, la interacció del Li⁺ o de la melibiosa (H⁺) per si sols no fan aparèixer aquest pic.

L'aspecte possiblement més interessant d'aquest espectre és la variació dels pics per sobre 1700 cm⁻¹. Com s'ha anat comentant en les seccions anteriors, aquesta zona d'absorció correspon a la de les cadenes laterals d'Asp i Glu (Barth i Zscherp, 2000) (encara que també hi poden absorbir girs reversos fins a 1710 cm⁻¹ (Krimm i Bandekar, 1986)) i correspon a la vibració d'estirament de l'enllaç C=O. De l'espectre sense desconvular es poden veure uns pics negatius a 1718 i 1707 cm⁻¹ i un positiu a 1699 cm⁻¹. Encara que hi pot haver una possible contribució de lípids, la forma d'alguns d'aquests pics, sobretot el de 1699 cm⁻¹, fa pensar que segurament corresponen a canvis en la protonació i/o entorn d'algun residu carbonil (Asp o Glu).

En resum, en aquesta secció i en l'anterior s'ha observat com les dues permeases que tenen inhibit el transport, però no la unió de substrats, presenten una diferent discrepància respecte els espectres corresponents a les permeases que transporten. Per tant, es pot suposar que la pertorbació dels llaços 4-5 i 10-11 deuen aturar el transport de la MelB en passos diferents.

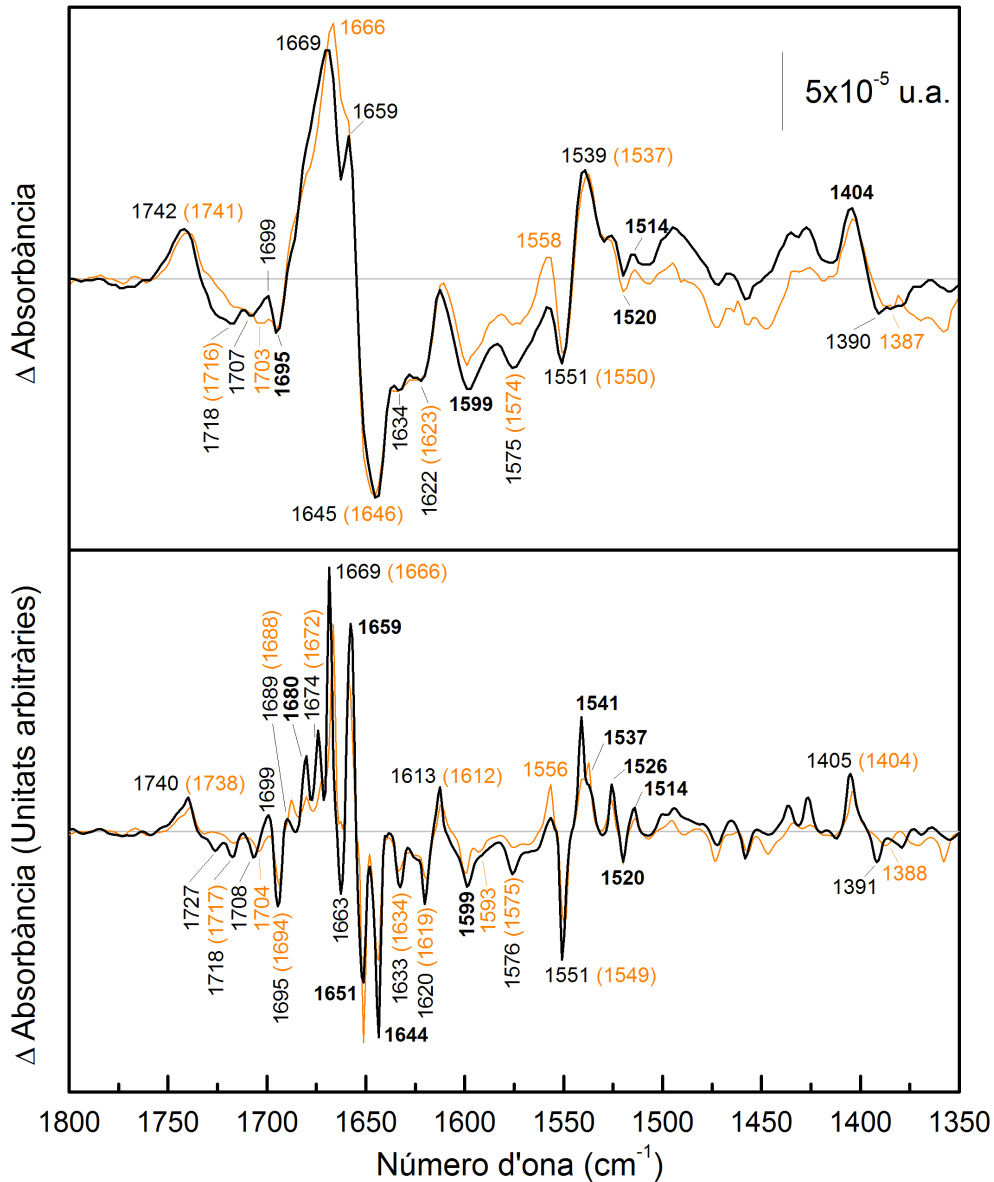


Figura 4.33. Espectre de diferència de la MeIB-NEM induït per la unió de melibiosa en presència de H^+ .

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del MeIB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiosa, pH 6,6 menys MeIB-NEM, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,6.

(*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.15 (línia blava).

B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

4.10. Espectres de diferència de la MelB salvatge reconstituïda amb fosfatidilcolina d'ou (EPC)

Un altre mètode per obtenir informació dels canvis estructurals de la MelB deguts a la unió de substrats i que a més ens permet aprofundir en l'estudi de la seva funció és modificar els lípids on es troba reconstituïda la proteïna.

S'ha observat en varis estudis, inclosa la MelB (Dumas et al., 2000), que l'activitat d'una proteïna de membrana depèn de la llargada dels lípids en que es troba reconstituïda la proteïna (Carruthers i Melchior, 1984; In't Veld et al., 1991; Montecuccio et al., 1982; Uratani et al., 1987). A més, els caps polars també són importants per a la funció dels transportadors (Tefft et al., 1986). En el cas de la permeasa de lactosa se suposa que es produeix una interacció entre les molècules de fosfatidiletanolamina i/o fosfatidilglicerol que componen la membrana d'*E. coli* i els residus carregats dels llaços (Merino-Montero et al., 2006). La composició de la membrana i la relació lípid/proteïna també afectarà a l'estructura i funció de la proteïna (le Coutre et al., 1997; Zhang et al., 2005).

Mitjançant espectres de diferència de FTIR s'ha observat que la presència de lípids aniònics és essencial per a l'activitat del receptor nicotínic d'acetilcolina (Baenziger et al., 2000), on la proteïna reconstituïda només amb EPC no mostra els pics en l'espectre de diferència que es fan servir com a marcadors per identificar el pas entre l'estat de repòs i l'estat insensibilitzat degut a la interacció de l'agonista carbamilcolina. Només recupera aquests pics amb la presència de lípids aniònics.

Finalment, la proteïna també es podrà reconstituir amb lípids amb grup èter en comptes d'èster. Els lípids amb grups èter, al contrari que els lípids amb grup èster, no absorbeixen a la zona de 1740 cm^{-1} i per tant no se superposen a la zona d'absorció dels Asp i Glu (DeGrip et al., 1988).

Per començar amb aquests experiments la proteïna solubilitzada es va reconstituir amb lípids d'EPC.

4.10.1. Composició lipídica dels proteoliposomes

Els lípids d'*E. coli* que es fan servir habitualment per a reconstituir la proteïna corresponen a un extracte total. Aquest extracte està format pel 57,5% de fosfatidiletanolamina, 15,1% de fosfatidilglicerol, 9,8% de cardiolipina i finalment una mescla d'altres lípids que suma el 17,6%. De tots aquests lípids entre el 10 i 30% corresponen a longituds de cadena de 16:1, el 40% de 16:0, el 16% de 18:1 i entre el 5 i 10% corresponen a la cardiolipina. En canvi, els lípids d'EPC que es fan servir per reconstituir la MelB en aquest estudi tenen una longitud en les cadenes alifàtiques de: 34,3% de 16:0, 16,4% de 18:0, 30,1% de 18:1 i 19,3% de 18:2. Per tant, trobem que la llargada mitja de les cadenes d'EPC és superior que en els lípids d'*E. coli*. Dumas et al. (2000) van mesurar el transport de la MelB reconstituïda amb PC de diferents longituds i van concloure que l'activitat màxima de la MelB s'observa quan es fan servir lípids amb una longitud de 16:1. La longitud d'aquestes cadenes és molt semblant a les cadenes 16:0. La major part dels lípids d'*E. coli* tenen aquesta longitud, en canvi la major part dels lípids d'EPC tenen una longitud major. Per tant, esperem observar canvis en els pics dels espectres de diferència que siguin deguts a canvis en la compactació de la MelB i canvis deguts a la variació dels caps polars dels lípids.

4.10.2. Espectres de diferència induïts per la unió de Na⁺

En comparar els espectres de diferència entre diferents condicions és interessant poder comparar els canvis en les intensitats dels seus pics. Per poder fer això es necessiten escalar els espectres de diferència. Per a la diferència Na⁺ vs H⁺ es va observar que la millor referència era agafar el pic positiu a 1700 cm⁻¹. Per a la diferència melibiosa·Na⁺ vs Na⁺ es va fer servir el mateix factor que per a l'anterior diferència. Els espectres resultants sembla que estan escalats correctament.

L'espectre de diferència degut a la unió de Na⁺ en la MelB salvatge reconstituïda en lípids d'EPC (EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺) es presenta en la figura 4.34, on es compara amb l'espectre de diferència de la MelB salvatge reconstituïda en lípids d'*E. coli* (*E. coli*-MelB·Na⁺ vs. H⁺). Els dos espectres són molt semblants en algunes zones (girs [per sobre 1670 cm⁻¹ (Tatulian, 2003)]) i molt diferents en altres (làmines β [per sota 1640 cm⁻¹ (Tatulian, 2003)]). En

canvi, tot dos espectres mostren una sèrie de pics positius i negatius que permeten observar la majoria de pics sense la necessitat de desconvolar, una característica que normalment no s'observa en les diferències degudes a la interacció de melibiosa.

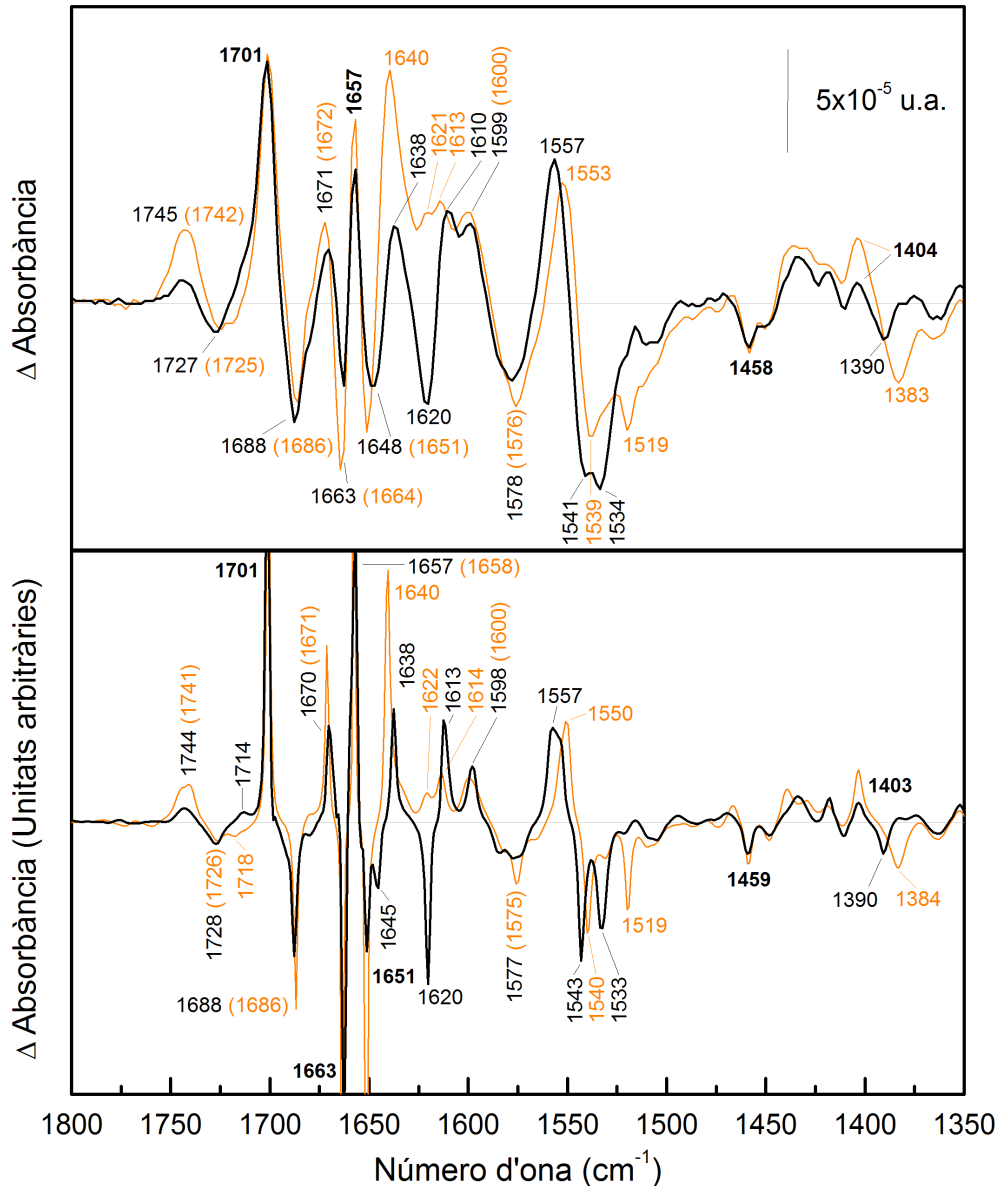


Figura 4.34. Espectre de diferència de la EPC-MelB induït per la unió de Na^+ . Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (Línia negra) Espectre de diferència del MelB-EPC, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6 menys MelB-EPC, 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6,6. (Línia taronja) Espectre de diferència de la figura 4.12B.

B) (Línia negra) Espectre desconvolat de la diferència del pannel A. (Línia taronja) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

Si ens fixem en els pics corresponents a lípids podem observar que el pic a 1742 cm^{-1} que correspon a la vibració d'estirament de l'enllaç C=O té

disminuïda la seva intensitat en la diferència EPC-MelB Na⁺ vs. H⁺, en canvi el pic negatiu a 1459 cm⁻¹ que pot correspondre a la vibració δ_s CH₂ dels lípids es manté pràcticament igual en les dues diferències. S'ha de tenir en compte que en la zona de 1740 cm⁻¹ també hi poden absorbir àcids carboxílics (Barth, 2000). Per tant, els canvis conformacionals de la MelB deguts a la unió de Na⁺ afectaria més a la zona pròxima als caps polars que no pas a les cadenes alifàtiques.

Com ja s'ha comentat anteriorment, en la zona de l'amida I podem observar com els pics corresponents a girs reversos (MelB·EPC: 1701, 1688 i 1670 cm⁻¹) són molt semblants en les diferències de la MelB reconstituïda en lípids d'*E. coli* i d'EPC. Els pics assignats a hèlixs α (MelB·EPC: 1663, 1657 i 1651 cm⁻¹) tenen menys intensitat en la diferència EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺. Aquests pics es poden veure afectats degut a una menor compactació de la proteïna reconstituïda en lípids d'EPC (Dumas et al., 2000). Això podria dur a una menor orientació de les hèlixs transmembrana i per tant disminuir la intensitat dels pics deguts a canvis en la seva orientació.

El pic negatiu a 1645 cm⁻¹ (EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺) no s'observava abans en la diferència *E. coli*-MelB·Na⁺ vs. H⁺ i la seva assignació és ambigua, ja que pot correspondre a hèlixs α , hèlixs 3_{10} o a llaços (Dave et al., 2000). Una de les variacions més grans en els espectres de diferència deguts a la unió de Na⁺ s'observa en la zona de les làmines β (pics a números d'ona inferiors a 1640 cm⁻¹ (Tatulian, 2003)).

També s'observen canvis en els pics de la regió de l'amida II i deuen reflectir els canvis observats en l'amida I. Principalment, es pot observar com l'amida II té un lleuger desplaçament cap a números d'ona més elevats en la diferència EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺.

Els pics corresponents a la vibració antisimètrica de l'enllaç COO⁻ dels àcids carboxílics presenten una posició i intensitat molt semblants (encara que amb petites diferències). En canvi, les vibracions simètriques tenen menys intensitat i fins i tot el pic negatiu a 1383 cm⁻¹ es desplaça fins a 1390 cm⁻¹. Una explicació d'aquest efecte, podria ser que altres pics intervinguin en la zona de 1400 cm⁻¹. En la zona de carbonils per sobre 1700 cm⁻¹ també s'observen variacions entre les dues diferències. Finalment, el pic a 1701 cm⁻¹, en la diferència EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺, té una petita espatlla a números d'ona

superiors. Mitjançant la desconvolució aquesta espatlla es resol en un pic a 1714 cm^{-1} . Aquest pic està a números d'ona massa baixos per correspondre a lípids (sobretot tenint en compte que té signe positiu, i la resta de la banda del lípid dóna una fluctuació en aquesta zona de lípids amb pics amb signe negatiu) i massa alts per poder correspondre a estructura secundària (els girs més elevats s'observen fins a 1710 cm^{-1} (Krimm i Bandekar, 1986)). Per tant, i a falta de confirmar la seva assignació mitjançant intercanvi H/D, aquest pic es pot assignar amb molta seguretat a la protonació o al canvi en l'entorn d'un Asp o a un Glu protonat (Barth, 2000). A més, el pic negatiu que abans s'observava a 1718 cm^{-1} i que es podia assignar a algun carbonil, desapareix en la diferència EPC-MelB·Na⁺ vs. H⁺. Per tant, totes aquestes observacions fan pensar que hi ha un canvi en l'entorn i/o en la protonació d'algunes cadenes laterals d'Asp i/o Glu.

4.10.3. Espectres de diferència induïts per la interacció de melibiosa en presència de Na⁺

Els espectres de diferència deguts a la interacció de la melibiosa en presència de Na⁺ en la MelB reconstituïda amb lípids d'EPC (EPC-MelB·mel·Na⁺ vs. Na⁺) o reconstituïda amb lípids d'*E. coli* (*E. coli*-MelB·mel·Na⁺ vs. Na⁺) presenten diferències en la seva forma (figura 4.35). Aquesta dissimilitud entre les dues diferències (EPC i *E. coli*) es veu ressaltada en els espectres desconvulats.

En general tots els pics de les diferents estructures secundàries es veuen afectades pel canvi en l'entorn lipídic, tant en la seva posició com en la seva intensitat. Cal destacar que el pic assignat a hèlixs α a 1666 cm^{-1} (1668 cm^{-1} en EPC) té disminuïda considerablement la seva intensitat i el pic a 1659 cm^{-1} desapareix. En canvi l'altre pic principal assignat a hèlixs α a 1653 cm^{-1} , no veu modificada ni la seva posició ni la seva intensitat. La disminució en la intensitat d'aquests pics, que corresponen segurament a canvis en la inclinació d'hèlixs α , deu ser deguda al canvi en les interaccions hidrofòbiques entre la proteïna i els lípids, que deuen donar lloc a una menor orientació dels segments transmembrana (Dumas et al., 2000).

Els pics corresponents a làmines β sofreixen desplaçaments en la seva posició. Es troben a 1633 i 1621 cm^{-1} en la diferència *E. coli*-MelB·mel·Na⁺ vs.

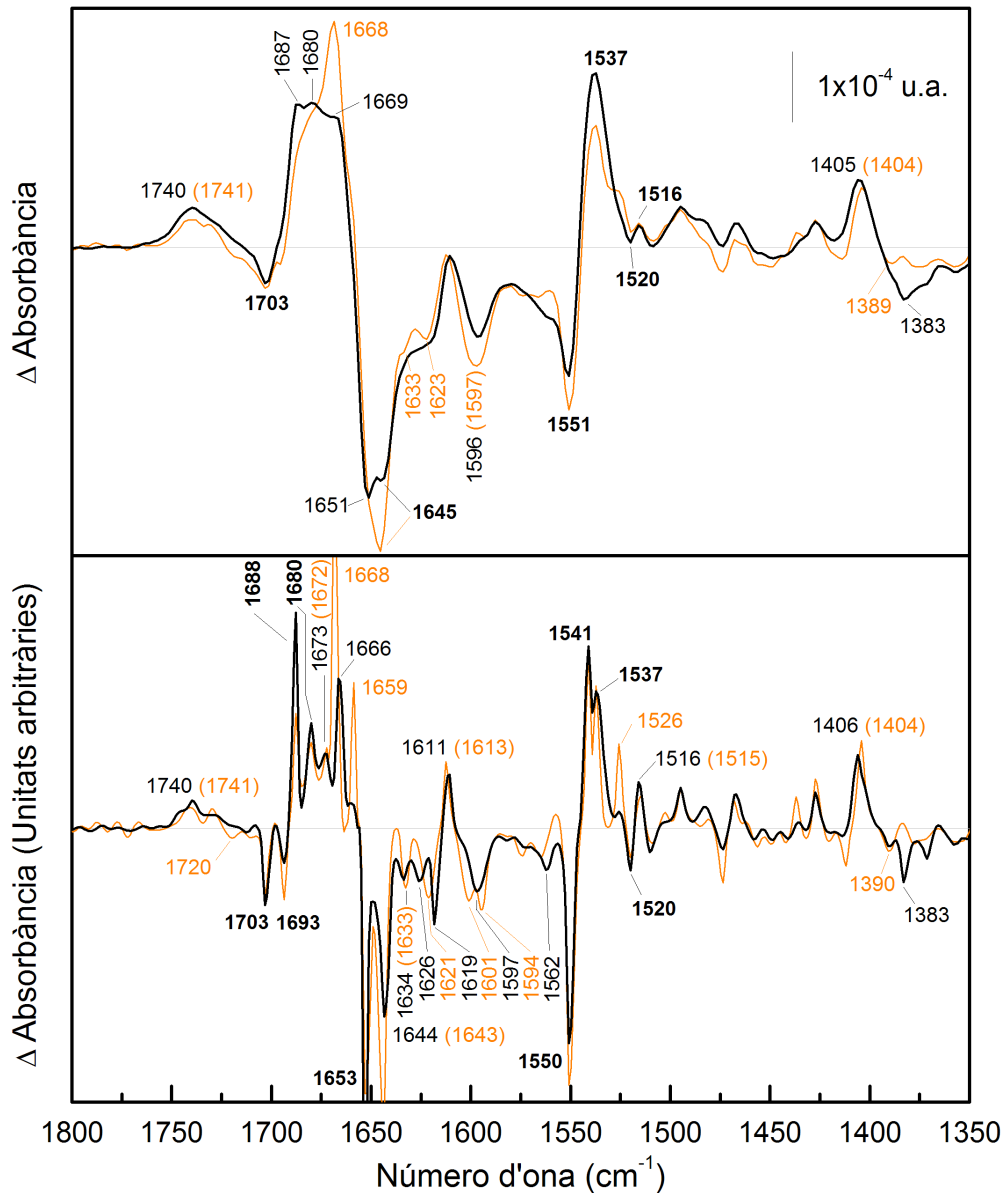


Figura 4.35. Espectre de diferència de la EPC-MelB induït per la interacció de melibiosa en presència de Na⁺.

Els números d'ona que coincideixen entre els dos espectres de diferència estan en negra.

A) (*Línia negra*) Espectre de diferència del MelB-EPC, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiosa, pH 6,6 menys MelB-EPC, 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6,6. (*Línia taronja*) Espectre de diferència de la figura 4.14A.
 B) (*Línia negra*) Espectre desconvulat de la diferència del pannel A. (*Línia taronja*) Espectre de diferència del pannel A (línia taronja).

Na⁺ i a 1634, 1626 i 1619 cm⁻¹ en la diferència EPC-MelB·mel·Na⁺ vs. Na⁺. Per tant, en les diferències degudes a la interacció de la melibiosa en presència de Na⁺ es tornen a observar canvis en els pics corresponents a làmines β, igual que en les diferències degudes a la unió de Na⁺.

El pic corresponent a un grup carbonil a 1703 cm^{-1} no té cap canvi ni en la seva intensitat ni en la seva posició. En canvi, els pics assignats a les vibracions d'estirament antisimètrica i simètrica de l'enllaç COO^- , corresponents a les cadenes laterals d'Asp i/o Glu, presenten variacions. El pic negatiu a 1597 cm^{-1} té una lleugera disminució de la seva intensitat en la diferència EPC-MelB·mel· Na^+ vs. Na^+ , i el pic positiu a 1404 cm^{-1} només sofreix un petit desplaçament a 1406 cm^{-1} en passar de lípids d'*E. coli* a lípids EPC. La major diferència s'observa en l'aparició del pic negatiu a 1383 cm^{-1} en la diferència EPC-MelB·mel· Na^+ vs. Na^+ . Per tant, en la interacció de melibiosa en presència de Na^+ es tornen a observar canvis en l'entorn i/o protonació de les cadenes laterals dels Asp i/o Glu.

5. DISCUSSIÓ GENERAL

5.1. Controls per a l'obtenció dels espectres de diferència

El primer objectiu d'aquest treball era la implementació d'un mètode per l'obtenció d'espectres de diferència mitjançant espectroscòpia d'infraroig induïts per la unió de substrats a la MelB. Per assegurar que aquests espectres de diferència eren fiables, primer s'havien de realitzar una sèrie de controls. A partir dels resultats obtinguts d'aquests controls, es pot concloure que els espectres de diferència són deguts als canvis induïts en la proteïna per la interacció amb els substrats. Per tant, donen informació dels canvis estructurals de la proteïna en realitzar la seva funció. Aquesta informació estructural correspon a la proteïna reconstituïda amb lípids i en un medi aquós tamponat on es pot controlar el pH. Per tant, encara que s'obtingui l'estructura 3D de la MelB a partir de cristalls, és necessària la utilització d'aquest tipus de tècnica per tal d'estudiar l'estructura de la MelB.

Per tal de realitzar els espectres de diferència degut a la unió de substrats, primer de tot era necessari veure si el film de proteoliposomes s'adheria al cristall d'ATR i no es desenganxava degut al flux de tampó sobre seu. En les diferents proves s'observa que el film de proteoliposomes és molt estable dintre els intervals de temps desitjats.

També es van estudiar altres paràmetres que podien influir en l'obtenció dels espectres de diferència com són: la variació de pH i de força iònica, l'absorbància dels substrats, la unió no específica de sucres que no són substrats de la MelB i la possible contribució dels lípids en la diferència. Una norma general que es pot treure dels controls a l'hora d'adquirir els espectres de diferència és que és important mantenir la mateixa força iònica en els dos tampons que passen per sobre la mostra, per evitar variacions en el gruix del film de proteoliposomes, que dóna lloc a pics en l'espectre de diferència que no corresponen a canvis conformacionals de la proteïna i que són deguts a una resta incorrecta entre les dues condicions. Petites diferències de força iònica (2 mM) es poden corregir, en canvi diferències més grans de força iònica (>5 mM) poden donar lloc a problemes a l'hora de la correcció, no tan sols per la variació del gruix del film, si no també per la diferència en la banda de l'aigua que absorbeix just a sobre de l'amida I. Això és degut a que la posició de la banda

de l'aigua és sensible a la presència de cations (Goormaghtigh et al., 1994b). Però el més important a l'hora de fer les diferències és que els dos tampons tinguin el mateix pH. Petites diferències de pH (de l'ordre de 0,2 unitats) donen lloc a distorsions degudes a variacions en el gruix del film que es poden arribar a corregir. En canvi, diferències grans de pH (>0.5), que serien les necessàries per veure canvis en l'estat de protonació de les cadenes laterals, donen lloc a distorsions en l'espectre molt difícils o impossibles de corregir.

La contribució dels substrats en l'espectre de diferència es pot corregir amb certa facilitat, bàsicament perquè cap dels substrats té una banda d'absorció intensa en la zona d'absorció de la proteïna.

Finalment, els sucres que no són substrats de la MelB, com seria el cas de la sacarosa, no donen lloc a pics inespecífics, i tampoc s'observen pics deguts a la interacció dels lípids amb els substrats de la MelB.

5.2. Espectres de diferència induïts per la unió de substrats.

Canvis en l'estructura secundària i terciària

La incubació de la MelB amb o sense substrats dóna lloc a dos espectres d'absorbància dels proteoliposomes pràcticament indistingibles. Per tal de poder observar les variacions entre els dos espectres cal realitzar la resta entre les dues condicions. L'espectre de diferència resultant presenta una sèrie de pics positius i negatius que engloben els canvis estructurals que ha sofert la MelB degut a la unió dels substrats, conjuntament amb els canvis en la protonació i/o entorn de les cadenes laterals dels aminoàcids. Els espectres de diferència obtinguts presenten una bona relació senyal/soroll i són altament repetitius.

Canvis en l'estructura de la MelB deguts a la interacció amb els substrats ja van ser prèviament observats mitjançant espectroscòpia de fluorescència (Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau i Leblanc, 1996), on el senyal de fluorescència variava en afegir els substrats. A més, experiments de transferència d'energia de fluorescència mostraven que la interacció del Na⁺ (o Li⁺) indueix un canvi en el lloc d'unió del sucre o en la seva proximitat (Cordat et al., 1998; Maehrel et al., 1998). La mesura dels senyals elèctrics originats en afegir els substrats també indica uns possibles canvis conformacionals de la proteïna (Ganea et al., 2001; Meyer-Lipp et al., 2004; Meyer-Lipp, 2005).

Mitjançant espectroscòpia de FTIR ja es van observar canvis en l'estructura secundària de la MelB en afegir els substrats, principalment en les estructures hèlixs α i làmines β (Dave et al., 2000; Dave et al., 2002). En el transportador de glucosa d'eritròcit humà (Chin et al., 1987), així com també en el transportador Na⁺/galactosa (le Coutre et al., 2002) es van observar canvis en les hèlixs α en afegir els substrats mitjançant dicroïsmes circulars i FTIR respectivament. En canvi, no s'han descrit canvis deguts a la unió de substrats pel transportador de lactosa (Patzlaff et al., 1998) fent servir espectres de FTIR.

5.2.1. Espectres de diferència de la permeasa sense Cys: 3SV

Per tal d'estudiar els espectres de diferència dels mutants de la MelB és necessari comparar-los amb el mutant 3SV ja que aquesta permeasa sense

Cys es fa servir com a punt de partida a l'hora de realitzar les mutacions. El mutant 3SV transporta melibiosa en presència d'H⁺, Li⁺ o Na⁺ amb unes propietats cinètiques semblants al WT (Weissborn et al., 1997). Els espectres de diferència en presència de Na⁺ són pràcticament iguals al WT. Els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa en presència d'H⁺ també presenten una gran similitud. En canvi, els espectres de diferència en el que participa el Li⁺ com a catió co-transportador són diferents al WT.

5.2.2. Accessibilitat de les estructures que intervenen en els espectres de diferència

El bescanvi H/D ens permet calcular el grau d'accessibilitat de la proteïna al medi aquós (Dave et al., 2002). A partir dels espectres de diferència en H₂O i D₂O s'ha obtingut el bescanvi només de les estructures que han sofert un canvi conformacional. En la diferència deguda a la unió de Na⁺ s'ha obtingut un bescanvi del 80% aproximadament i en la diferència deguda a la unió de melibiosa en presència de Na⁺ del 55%, que és semblant al bescanvi global de la proteïna que és del 56%. Per tant, les estructures modificades per la unió de Na⁺ són molt més accessibles al solvent que no pas les modificades per la unió de melibiosa.

5.2.3. Canvis estructurals induïts per la unió de Na⁺ o Li⁺

Cal dir que la MelB uneix però no transporta cations sense la presència de melibiosa (Damiano-Forano et al., 1986). Per tant, les diferències degudes a la interacció dels cations corresponen només a la unió dels substrats i no inclouen canvis corresponents a la translocació d'ells.

En els espectres de diferència deguts a la unió de Na⁺ s'observen canvis en una varietat d'estructures secundàries. S'observen pics en la zona d'absorció de les hèlixs α que deuen ser deguts principalment a un canvi en la inclinació d'aquestes hèlixs ja que es pot demostrar que una variació en la inclinació dóna lloc a un canvi en la intensitat de la banda de l'espectre d'absorbància (Baenziger i Chew, 1997; Marsh, 1999; Rothschild et al., 1993). També s'observen canvis en estructures secundàries com làmines β , girs reversos i estructures desordenades. Els canvis en l'estructura de làmina β poden ser deguts a canvis en els llaços 4-5 i 10-11 que podrien contenir

estructura de làmina β (Dave et al., 2002). Els pics corresponents a totes aquestes estructures no es veuen afectats en el mutant R141C. Això era d'esperar ja que la interacció del Na^+ amb el R141C és comparable a la del 3SV i del WT, degut a que el Na^+ encara activa la unió de α -(^3H)NPG (Abdel-Dayem et al., 2003), incrementa l'emissió de fluorescència del sucre fluorescent Dns²-S-Gal (Meyer-Lipp, 2005) i indueix el senyal elèctric ràpid (Meyer-Lipp, 2005). A més a més, la constant d'activació del Na^+ per a la unió del α -NPG (K_{Na}) (Abdel-Dayem et al 2003; Séry 2002), i la concentració de saturació mitja per al Na^+ ($K_{0.5}^{\text{Na}}$) (Meyer-Lipp, 2005) no estan alterades. Per tant, l'Arg141 no deu participar en la unió del Na^+ (Meyer-Lipp, 2005).

A més de l'espectre de diferència degut a la unió de Na^+ també s'ha obtingut el degut a la unió Li^+ . Comparant aquests espectres, el primer que es pot concloure és que els dos ions provoquen uns canvis conformacionals diferents a la proteïna. Kawakami et al. (1988) van proposar una diferenciació dels llocs d'unió per a cada catió, de manera que el Li^+ i l' H^+ compartirien un mateix domini i el Na^+ s'uniria a un altre domini. Aquesta proposta va ser revocada més tard per una sèrie d'experiments concentrats en els residus acídics (Asp19, 55, 59 i 124) localitzats en les hèlixs transmembrana (Pourcher et al., 1993; Wilson i Wilson, 1992; Zani et al., 1993), i que van donar lloc a la hipòtesi que aquests residus acídics, conjuntament amb altres residus, formen un lloc d'unió comú pels tres cations (Poolman et al., 1996). Per tant, la diferent coordinació dels cations deu ser la responsable dels diferents canvis conformacionals en la MelB produïts per la unió dels cations. Mitjançant mutagènesi dirigida s'han anat trobat les bases de la selectivitat pels diferents cations alcalins en transportadors depenents de Na^+ (i Li^+) (Habibian et al., 2005; Kuwabara et al., 2004; Ostroumov et al., 2002), on en general es pot observar que el Na^+ necessita una coordinació amb un nombre més gran de lligands que el Li^+ degut a que té un radi iònic més gran (Kaim et al., 1997; Zhang i Fillingame, 1995).

5.2.4. Canvis estructurals induïts per la unió de melibiosa

La interacció de melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ produeix uns espectres de diferència amb una altra forma comparats amb la de la unió dels cations. En aquest cas molts dels pics de l'amida I es troben superposats. Per

solucionar això s'han desconvolulat els espectres de diferència. Aquest tractament matemàtic no és gaire comú en aquests tipus d'espectres. En concret s'ha aplicat la desconvolució per màxima entropia, que permet un millor estretament dels pics sense augmentar considerablement el soroll (Lórenz-Fonfría i Padrós, 2005).

Un altre aspecte que cal destacar és que els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa tenen més intensitat que els deguts a la unió de Na^+ o Li^+ , indicant que la unió de melibiosa indueix uns canvis conformacionals més grans que els cations per si sols. A més, junt amb els canvis conformacionals induïts per la unió de la melibiosa hi deuen haver canvis involucrats en la translocació dels substrats.

Els espectres de diferència deguts a la interacció de melibiosa en presència de Na^+ , Li^+ o H^+ són molt semblants, encara que mostren algunes diferències que deuen correspondre a les diferents propietats cinètiques que té la permeasa a l'hora de transportar la melibiosa en presència dels diferents cations (Bassilana et al., 1987; Pourcher et al., 1990).

5.2.4.1. Canvis en les hèlixs transmembrana induïts per la interacció de melibiosa

En general es tornen a observar pics corresponents a estructures hèlixs α . Alguns d'aquests pics corresponen probablement a les mateixes hèlixs α que han estat modificades pel Na^+ (o Li^+), ja que tenen la mateixa posició, i que ara amb la presència de melibiosa han sofert més canvi.

En la MelB s'han observat anteriorment canvis en la inclinació de les hèlixs transmembrana degut a la interacció dels substrats mitjançant espectres d'absorbància adquirits amb llum polaritzada (Dave, 2003). En la relació entre el número d'ona i el paràmetre d'ordre, que conté la informació de l'orientació de la proteïna, s'observen dos màxims del paràmetre d'ordre en dos números d'ona corresponents a hèlixs α (1664 i 1554 cm^{-1}). Per tant, aquests canvis en la inclinació de les hèlixs transmembrana es deu reflectir en l'espectre de diferència amb pics positius i negatius. Degut a que l'espectre de diferència detecta canvis molt petits, s'observen més de dos pics d'hèlixs α .

Canvis en la inclinació de les hèlixs transmembrana deguts a la unió i transport de substrats, han estat proposats per proteïnes de la superfamília de

facilitadors majors de membrana (MFS) com són: la permeasa de lactosa (LacY) (Abramson et al., 2003), el transportador glicerol-3-fosfat (GlpT) (Huang et al., 2003) i el transportador d'oxalat (OxlT) (Hirai i Subramaniam, 2004). Moltes de les estructures 3D dels transportadors de membrana presenten hèlixs distorsionades, amb colzes i curvatures que permeten una flexibilitat estructural, podent així la molècula agafar diferents conformacions. És interessant ressaltar que dos transportadors que fan servir Na^+ pel co-transport, com són l'antiport Na^+/H^+ (NhaA) (Hunte et al., 2005), i el transportador de Leucina dependent de Na^+/Cl^- (LeuT_{Aa}) (Yamashita et al., 2005) així com l'ATPasa de Ca^{2+} tenen petits dominis en les hèlixs transmembrana que consisteixen en seqüències que no formen ponts d'hidrogen, i per tant no formen estructura d'hèlix α , on el catió interacciona amb els carbonils de l'enllaç peptídic. En la permeasa de lactosa, mitjançant estudis d'accessibilitat de reactius sulfídrics, prenent com a model l'estructura de la proteïna encarada cap l'espai citoplasmàtic, es va proposar l'estructura de la proteïna encarada cap a l'espai periplasmàtic (Abramson et al., 2003). Comparant les dues estructures es poden observar canvis en la disposició de les hèlixs α . A més, estudis d'entrecreuament de Cys en la permeasa de lactosa mostren con l'addició de substrat modifica la distància entre les hèlixs transmembrana, segurament degut a un canvi en la inclinació d'aquestes (Wu i Kaback, 1997; Wu et al., 1998a, b; Zhang et al., 2002). Moviments de les hèlixs α també s'han predit per la funció del canal de K^+ (Jiang et al., 2002) i pel receptor d'acetilcolina (ACh) (Miyazawa et al., 2003). En el cas de l'ATPasa de Ca^{2+} , on s'ha obtingut el cristall amb i sense els seus substrats units (Toyoshima i Nomura, 2002b; Toyoshima i Mizutani, 2004), s'ha pogut observar canvis en la inclinació de les hèlixs transmembrana. Per tant, sembla que aquests canvis en la inclinació de les hèlixs és una característica dels transportadors transmembrana.

Aquests canvis en la inclinació de les hèlixs α s'han observat també mitjançant espectres de diferència d'infraroig en la bacteriorodopsina (bR). En els espectres d'absorció s'observa que l'amida I té un màxim d'absorció per sobre 1660 cm^{-1} . Aquesta zona d'absorció tan elevada per les hèlixs α és característica de la bR (Rothschild i Clark, 1979a). Espectres de dicromisme mostren que la banda d'absorció de l'amida I està composta per dos

subcomponents on el component de freqüència més elevat a 1670 cm^{-1} presenta un dicroïsme fora del pla de la membrana (paral·lel a l'axis de l'hèlix α) i un segon component a prop de 1655 cm^{-1} que presenta un dicroïsme en el pla de la membrana (perpendicular a l'axis de l'hèlix α) (Rothschild i Clark, 1979b). En concret en l'estat N (bR \rightarrow N i M \rightarrow N)) s'observa un pic negatiu a 1670 cm^{-1} i un positiu a 1650 cm^{-1} que poden ser deguts a un canvi en la inclinació de les hèlixs transmembrana cap la normal de la membrana (Rothschild et al., 1993). Això provocaria que el component de fora del pla perdés intensitat mentre que el component en el pla guanyés intensitat. Vonck (Vonck, 1996, 2000) va mostrar mitjançant estructures 3D de la bR com hi ha un moviment de l'hèlix F, en passar de l'estat M al N, cap a la normal de la membrana. Aquests resultats estan amb concordança amb els experiments de diferència de FTIR.

5.2.4.2. Efecte de la mutació R141C i la reacció amb NEM en les hèlixs α

Un dels pics assignats a hèlixs α desapareix en el mutant R141C, indicant que aquest grup d'hèlixs α , que prèviament han estat modificades pel catió Na^+ o Li^+ , no es veuen modificades en afegir el sucre. En la unió de melibiosa en presència d' H^+ , com que aquest grup d'hèlixs no ha estat prèviament modificat per la unió del catió, la unió del sucre provoca un canvi en aquestes hèlixs però de menor magnitud que en el 3SV (o el WT). Com ja s'ha comentat anteriorment aquest pic i d'altres a números d'ona propers deuen correspondre a un canvi en la inclinació de les hèlixs α . Per tant, en el R141C algunes d'aquestes variacions d'inclinació en les hèlixs α no es deuen produir degut a que aquesta permeasa no transloca els substrats (Abdel-Dayem et al., 2003).

El mutant R141C no mostra increment del senyal de fluorescència degut a l'addició de melibiosa (Meyer-Lipp, 2005), per tant la seva desaparició deu ser deguda bàsicament a una desaparició de la contribució del W299 (hèlix IX) i W342 (hèlix X) (Mus-Veteau i Leblanc, 1996). Hi pot haver, per tant, una disrupció de les interaccions entre el llaç 4-5 i les hèlixs IX i X. A més, el mutant E142C té una mutació compensativa en la I22 localitzada en l'hèlix I (Séry, 2002). És sorprenent que aquesta mateixa mutació compensativa es troba en mutants de l'hèlix XI (Ding i Wilson, 2000a, b; Ding, 2004). Tot això fa que es pugui proposar que el llaç 4-5 és important per establir interaccions entre

l'hèlix I i varies hèlixs de cantó C-terminal que contenen el lloc d'unió del sucre. Com que l'hèlix I conté el residu D19, que és crític per a la unió de Na^+ , es pot proposar que les interaccions entre les hèlixs I, X i XI i el llaç 4-5 és una estructura essencial per la cooperativitat pel transport de Na^+ i melibiosa (Meyer-Lipp, 2005). Prèviament ja s'ha descrit una proximitat entre les hèlixs I, IV, X i XI (Ding et al., 2000). Més evidències que el llaç 4-5 deu estar afectant hèlixs transmembrana es troben en que el mutant R149C té una mutació compensativa en l'hèlix X (V343G) (Abdel-Dayem et al., 2003) que se suposa que forma part del lloc d'unió del sucre. Una altra possibilitat seria que la mutació R141C afectés les hèlixs X i XI degut a una interacció entre el llaç 4-5 i el 10-11. L'Arg141 afavoriria la cooperativitat entre els dos llocs d'unió. En efecte, s'han trobat varies mutacions en el llaç 10-11 que afecten conjuntament la selectivitat pel catió i pel sucre (Botfield i Wilson, 1988; Ding, 2003, 2004).

En canvi, en les diferències de la MelB-NEM induïdes per la interacció de melibiosa, no només no hi ha pics assignats a hèlixs α que desapareguin, si no que a més apareix un nou pic negatiu de poca intensitat en la diferència deguda a la unió de melibiosa en presència d' H^+ que es pot assignar a estructura d'hèlix α . Per tant, la reacció del NEM amb la MelB no afecta pràcticament a les hèlixs α observades mitjançant espectres de diferència.

5.2.4.3. Canvis en les làmines β induïts per la interacció de melibiosa

Les làmines β també es veuen afectades per la interacció de la melibiosa. Aquesta variació estructural era d'esperar tenint en compte que tant el llaç 4-5 com el llaç 10-11 s'han proposat que es tracten de llaços mòbils funcionals (Abdel-Dayem et al., 2003; Ding, 2004) i que la seva estructura secundària podria contenir làmines β (Dave et al., 2002). En els espectres de diferència del mutant R141C s'observa que els pics corresponents a estructures β estan modificats en comparació als espectres de diferència del 3SV. En concret, el pic a 1633 cm^{-1} (-) desapareix, i n'apareix un altre a 1637 cm^{-1} (+). En canvi, aquests pics corresponents a estructura β no pateixen modificacions en la MelB reaccionada amb NEM. Per tant, el pic negatiu a 1633 cm^{-1} que desapareix en el R141C en totes les condicions d'unió de melibiosa, podria correspondre al llaç 4-5, ja que l'Arg141 està situada en aquest llaç.

En relació amb això, en experiments de proteòlisi de la MelB, el llaç 4-5 es veu protegit per la unió de Na^+ i de melibiosa en presència de Na^+ (Gwizdek et al., 1997). En canvi, en el R141C el llaç està protegit per l'addició de Na^+ però no per melibiosa (Na^+) (Meyer-Lipp, 2005). Per tant, en aquest mutant el llaç 4-5 deu sofrir canvis conformacionals deguts a la unió de Na^+ que el protegeixen de l'acció de les proteases, en canvi la unió de melibiosa no deu induir canvis conformacionals en aquest llaç. Això en l'espectre de diferència es podria traduir en la desaparició del pic corresponent a làmines β . No obstant, no es pot descartar que els pics d'estructura de làmina β corresponguin parcialment o totalment al llaç 10-11. Aquest llaç és prou llarg com per contenir aquesta estructura i podria estar pròxim al llaç 4-5.

En altres proteïnes també s'han descrits llaços mòbils funcionals (Sobczak i Lolkema, 2005). Aquests llaços tenen la característica que els residus que el formen són accessibles des dels dos cantons de la proteïna per reactius sulfídrics no permeables a la membrana (Ding, 2004; Sobczak i Lolkema, 2005). S'han proposat llaços mòbils funcionals en l'intercanviador Na^+/H^+ (Wakabayashi et al., 2000), en la permeasa de lactosa de *Streptococcus thermophilus* (Poolman et al., 1996), en el transportador de glutamat (Grunewald i Kanner, 2000; Slotboom et al., 2001) i en el co-transportador Na^+/Pi (Kohler et al., 2002; Lambert et al., 2001). L'estructura secundària d'aquests llaços en alguns casos és desconeguda i en altres s'ha anat resolent gràcies a les estructures cristal·lines. En el cas del co-transportador Na^+/Pi prediuen una estructura d'hèlixs α per un dels dos llaços mòbils proposats (Lambert et al., 2001). L'estructura 3D del transportador de glutamat mostra dos possibles llaços mòbils funcionals amb un motiu hèlix-gir-hèlix (Yernool et al., 2004). En el cas de l'intercanviador Na^+/H^+ els llaços predits de ser mòbils per Wakabayashi et al. (2000) no mostren ni estructura hèlix α ni làmina β . En canvi, un altre dels llaços mostra una estructura hèlixs α seguida d'una estructura làmina β (Hunte et al., 2005). En l'aquaporina I (Murata et al., 2000) i en el canal de K^+ (Doyle et al., 1998) també s'han resolt les estructures cristal·lines dels llaços funcionals. En el primer s'observa que aquests llaços contenen estructura d'hèlixs α . Finalment, en el cas de la permeasa de lactosa ni el llaç 10-11 ni el llaç 4-5 presenten estructura d'hèlix α

o de làmina β i només el llaç 6-7 (que és el llaç citoplasmàtic més llarg) presenta dues petites regions d'hèlix α (Abramson et al., 2003).

5.2.4.4. Canvis en les girs reversos induïts per la interacció de melibiosa

Finalment la unió de melibiosa també provoca canvis en els girs reversos. Els pics corresponents a aquestes estructures també es troben modificats en el mutant R141C, però el més interessant és que és l'única estructura que es troba modificada en els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa en presència de Na^+ o Li^+ de la MelB-NEM. Per tant, aquestes estructures deuen ser importants en els canvis estructurals implicats en la translocació dels substrats.

5.2.5. Reconstituïció de la MelB amb lípids de fosfatidilcolina

La MelB reconstituïda amb lípids de fosfatidilcolina (EPC) uneix i transporta els seus substrats (Dumas et al., 2000). Els espectres de diferència de la proteïna reconstituïda amb lípids d'*E. coli* i amb lípids d'EPC difereixen tant en l'espectre degut a la unió de Na^+ com en l'espectre degut a la unió de melibiosa en presència de Na^+ . En el dos casos s'observa un canvi en les estructures làmina β . Les estructures β podrien trobar-se en els llaços citoplasmàtics 4-5 i 10-11 (Dave et al., 2002). Per tant, el canvi en els caps polars dels lípids pot induir canvis en l'entorn d'aquestes estructures que es deuen trobar pròximes. En aquesta línia, en la permeasa de lactosa ja es va proposar una interacció entre els aminoàcids carregats dels llaços i els caps polars (Merino-Montero et al., 2006). A més, també s'observen una disminució en la intensitat dels pics corresponents a estructura hèlix α . Aquesta disminució d'intensitat es pot relacionar amb una menor compactació de la proteïna (Dumas et al., 2000), que deu fer que les hèlixs transmembrana no es trobin tan orientades.

5.3. Espectres de diferència induïts per la unió de substrats.

Canvis en la protonació/entorn de les cadenes laterals

A partir dels espectres de diferència de la MelB adquirits en tampons preparats amb H₂O es feia difícil poder discernir entre l'assignació d'una cadena lateral o d'una estructura secundària. En canvi, comparant aquests espectres amb els adquirits mitjançant tampons preparats amb D₂O s'ha pogut avançar en l'assignació de les cadenes laterals degut al diferent desplaçament que sofreixen els seus pics respecte els pics corresponents a les estructures secundàries (Barth i Zscherp, 2002).

5.3.1. Canvis en la protonació/entorn de les cadenes laterals deguts a la unió de Na⁺

En l'espectre de diferència degut a la unió de Na⁺ s'observen pics a la zona d'absorció de les vibracions antisimètriques i simètriques de l'enllaç COO⁻ dels àcids carboxílics. Això està amb concordança amb el fet que el lloc d'unió dels cations es proposa que està format principalment pels Asp19, 55, 59 i 124 (Ding i Wilson, 2001b; Poolman et al., 1996; Pourcher et al., 1991; Pourcher et al., 1993; Zani et al., 1993, 1994) localitzats a les hèlixs I, II i IV. A més, els Asp transmembrana també s'ha vist que són essencials a l'hora de coordinar el catió en els transportadors antiports Na⁺/H⁺ d'*E. coli* (Hunte et al., 2005; Inoue et al., 1995) i tetraciclina/H⁺ (Yamaguchi et al., 1992). La vibració d'aquests carboxílics queda afectada en coordinar-se amb el catió, provocant un desplaçament del màxim d'absorció d'aquests pics (Deacon i Phillips, 1980; Nara et al., 1994). A més, la interacció de les cadenes laterals dels Asp amb Arg i Lys també pot donar pics en els espectres de diferència (von Germar et al., 1999).

En les diferències de la MelB reconstituïda amb lípids amb grup ester es fa difícil poder observar la vibració de les cadenes laterals d'Asp i Glu protonades (enllaç C=O) degut a la seva superposició amb els pics corresponents a la vibració del grup carbonil dels lípids. En canvi, cal destacar que en l'espectre de diferència degut a la unió de Na⁺ en la MelB reconstituïda amb lípids de fosfatidilcolina d'ou, encara que també apareixen pics

corresponents a lípids, s'observa un pic positiu que, degut a la seva posició a 1714 cm^{-1} i que el seu signe és contrari al pic assignat a lípids, es pot assignar molt probablement a la protonació d'una o varies cadenes laterals d'Asp o Glu (Barth, 2000).

Les Asn també s'han vist que són importants per a la coordinació del Na^+ . En concret, s'ha proposat que l'Asn58 forma part o està pròxima al lloc d'unió del Na^+ (Franco i Wilson, 1996; Hama i Wilson, 1994; Poolman i Konings, 1993; Poolman et al., 1996). En l'espectre de diferència degut a la unió de Na^+ en D_2O apareix un pic a 1678 cm^{-1} que pot correspondre a la vibració d'aquesta Asn (Barth, 2000). Tenint en compte el seu desplaçament degut al bescanvi H/D, aquest pic estaria prèviament emmascarat pel pic intens a 1700 cm^{-1} en H_2O .

Les estructures cristal·lines ens poden orientar a l'hora de preveure el tipus de coordinació del Na^+ . Així, s'ha descrit que tant les cadenes laterals d'Asp, Glu, Asn, Gln, Ser i Thr com els oxígens dels grups carbonils dels aminoàcids poden participar en els llocs d'unions (Glusker, 1991; Harding, 2004; Hunte et al., 2005; Yamashita et al., 2005). En la MelB fins ara s'ha descrit la importància dels Asp19, 55, 59 i 124 i de l'Asn58 en la unió del Na^+ ; en canvi no s'han trobat Glu que en formin part (Poolman et al., 1996).

5.3.2. Canvis en la protonació/entorn dels Asp i Glu deguts a la interacció de melibiosa

En la unió i translocació de melibiosa en presència de Na^+ , els pics més característics de la diferència es poden assignar amb molta seguretat a la vibració antisimètrica d'àcids carboxílics. En la zona de vibració simètrica (al voltant dels 1400 cm^{-1}) també s'observen pics, encara que la seva assignació no és tant clara com la de la vibració antisimètrica. En la zona d'absorció dels carbonils, que ens dóna informació sobre les protonacions i desprotonacions dels Asp i Glu, també s'observen pics. En concret, s'observa una possible desprotonació, encara que aquesta zona està superposada a la zona d'absorció dels lípids. Tot això corrobora estudis anteriors que proposaven que Asp i Glu prenen part directament o indirectament en la unió/translocació de la melibiosa. Aquests residus estan localitzat en el llaç 4-5 (E142) (Meyer-Lipp, 2005; Séry, 2002) i en el llaç 10-11 (D351, D354 i E357) (Ding, 2003; Séry,

2002). A més, els Asp que participen en la unió del catió podrien també estar afectats per la interacció de la melibiosa, degut a que s'ha observat que la melibiosa augmenta l'afinitat pel Na^+ (Ganea et al., 2001). En concret, el desplaçament del pic assignat a la vibració antisimètrica de carboxílics a números d'ona menors, fa pensar que els ponts salins formats entre els Asp/Glu i les Arg/Lys abans de la interacció de la melibiosa, es trenquen degut a la interacció de la melibiosa

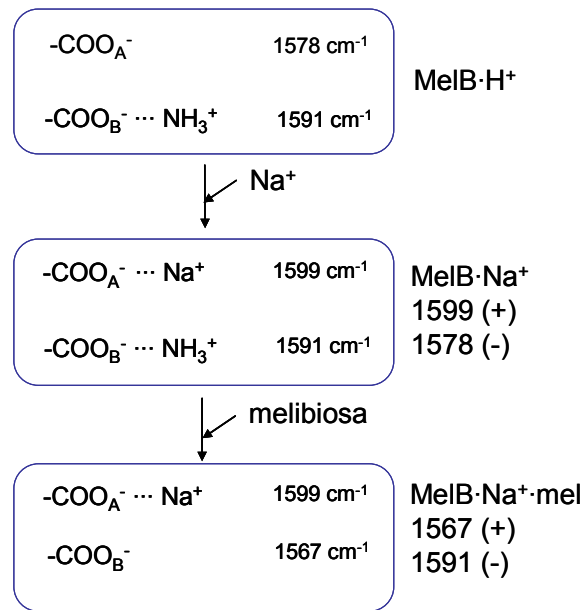


Figura 5.1. Proposta de canvis en les cadenes laterals dels carboxílics degut a la interacció dels substrats.

Els números d'ona dintre dels recuadres indiquen la posició de la banda d'absorció, mentre que els números d'ona fora dels recuadres indiquen la posició dels pics en el corresponent espectre de diferència. COO^- indica un o varis carboxílics i el NH_3^+ les cadenes laterals d'Arg o Lys.

(veure figura 5.1). En l'estat basal, se suposa que els Asp59 i Asp124 formen ponts salins amb la Lys377 connectant l'hèlix II i l'hèlix IV amb l'hèlix IX, i que els Asp19 i l'Asp55 deuen formar uns altres ponts salins amb l'Arg52 (Franco i Wilson, 1999; Franco et al., 2001; Hastings Wilson i Wilson, 1998). En aquest cas és interessant recordar que els llaços 4-5 i 10-11 estan implicats en la translocació com a possibles llaços mòbils (Abdel-Dayem et al., 2003; Ding, 2004). Per tant, cadenes laterals d'àcids carboxílics presents en aquests llaços podrien formar nous ponts d'hidrogen amb la melibiosa, desfent ponts salins inicialment formats amb Arg o Lys.

La permeasa de lactosa ens pot servir de model a l'hora d'interpretar les interaccions entre els residus ja que s'ha proposat la formació i trencament de ponts salins per en realitzar la seva activitat (Abramson et al., 2003; Guan i Kaback, 2005). Entre d'altres, s'ha proposat que el Glu126 forma un pont salí amb l'Arg144 i que aquest pont es trenca en unir-se el sucre (Guan i Kaback, 2005). En la MelB l'Asp124 (hèlix IV) podria formar un pont salí amb l'Arg149 i així connectar el lloc d'unió del catió amb el del sucre. La unió de melibiosa

donaria lloc al trencament del pont salí. Espectres de fluorescència ja van mostrar la importància de l'hèlix IV a l'hora de connectar el lloc d'unió del catió i el del sucre (Cordat et al., 2000). En la permeasa de lactosa també tenim que el Glu269 forma un pont d'hidrogen amb el Trp151 després d'interaccionar amb el sucre (Guan i Kaback, 2005). A més, aquest glutàmic està formant un pont salí amb l'Arg144 que es trenca a causa de la interacció Trp-sucre (Guan i Kaback, 2005). A més, es postula que el Glu269 està involucrat en la unió del sucre, la translocació de l'H⁺ i d'enllaç entre la translocació del sucre i de l'H⁺ (Guan i Kaback, 2005; Vazquez-Ibar et al., 2004). En la MelB s'ha vist que la mutació dels Trp116 i 128 alteren la unió del sucre i del catió conjuntament (Cordat et al., 2000). Per tant, podria ser que algun dels Asp que formen part del lloc d'unió del catió formin un pont d'hidrogen amb el Trp que interacciona amb el sucre. Per tant, la unió de Na⁺ afectaria a la unió del sucre modificant la posició del Trp, i a l'inrevés, la melibiosa provocaria un canvi en el lloc d'unió del catió en modificar la posició dels Asp que en formen part. Tots aquests canvis en els Asp poden ser observats en les zones de vibració dels carboxílics.

Els pics corresponents a carboxílics i carbonils en general no presenten gaires canvis en el mutant R141C comparat amb el 3SV, exceptuant les condicions on hi ha la presència de Li⁺. En canvi, en les diferències de la MelB-NEM només s'observen canvis clars, en comparació amb la MelB, en la zona dels carbonils en la diferència melibiosa·H⁺ vs. H⁺, indicant canvis en la protonació o canvis en l'entorn dels grups carbonils de les cadenes laterals dels Asp i/o Glu deguts a la presència del NEM. Això podria estar lligat al fet que varies mutacions del llaç 10-11 no permeten l'acumulació de melibiosa associada a H⁺ en canvi sí a Na⁺ (Ding et al., 2000).

5.3.3. Canvis en la vibració d'Asn, Tyr, Trp i Lys deguts a la unió de melibiosa

Les Asn també poden participar en la unió del sucre (Quiocho, 1986, 1988). En la diferència deguda a la unió de melibiosa en presència de Na⁺ apareix un pic negatiu a 1703 cm⁻¹ el qual, com ja s'ha comentat, té una assignació ambigua, que el bescanvi H/D no arriba a solucionar. Aquest pic podria correspondre a una Asn (Barth, 2000).

Un altre aminoàcid afectat per la unió de melibiosa és la Tyr. En estudis de mutagènesi dirigida s'han observat alteracions en la unió/translocació dels

substrats en modificar algunes Tyr (Zani et al., 1994). Degut a la presència de dos pics de signe oposat consecutius, és possible que la interacció de melibiosa doni lloc a un canvi en l'entorn d'aquest aminoàcid. Aquests canvis poden provenir d'interaccions hidrofòbiques amb el sucre (Quiocho, 1986, 1988).

Els Trp també es veuen afectats per la unió de la melibiosa. Aquests canvis deuen ser deguts a una interacció amb la melibiosa o a un canvi en el seu entorn. En experiments de mutagènesi s'han observat canvis en l'afinitat pel sucre i també canvis en l'entorn d'alguns Trp mitjançant canvis en la fluorescència (Cordat et al., 2000; Mus-Veteau et al., 1995; Mus-Veteau i Leblanc, 1996). A més, en la permeasa de lactosa es proposa que el Trp151 forma interaccions hidrofòbiques amb l'anell del galactopiranosil (Abramson et al., 2003) i en general, les interaccions hidrofòbiques prenen part en la unió dels sucres (Quiocho, 1986, 1988).

Els pics corresponents a Lys no es poden diferenciar dels pics corresponents a la vibració de l'amida II i per tant es fa difícil la seva assignació (von Germar et al., 2000). En la zona d'absorció de la Lys s'esperarien pics si aquest residu formés o desfés ponts salins amb càrregues negatives, com seria el cas dels Asp. En la MelB s'ha proposat que la Lys377 forma ponts salins amb l'Asp124, Asp55 (Ding i Wilson, 2001b; Hastings Wilson i Wilson, 1998) i Asp59 (Ding i Wilson, 2000b; Franco et al., 2001).

5.4. Modificació dels llaços citoplasmàtics 4-5 i 10-11

Una anàlisi comparativa de les seqüències d'aminoàcids del llaç 4-5 de la MelB d'*E. coli*, amb les seqüències d'altres transportadors de sucre bacterians homòlegs ens revela que hi ha una sèrie de residus molt conservats. En la figura 5.2 trobem que la seqüència (P/G)¹³²-(X₂)-(T/S)-X(D/N/S)-(X₂)-E-R¹⁴¹ del llaç 4-5 es troba conservada en tots els transportadors homòlegs. En el cas de la MelB s'ha vist que els dos únics residus carregats d'aquest llaç essencials pel funcionament de la MelB són l'Arg141 i el Glu142 (Séry, 2002). La mutació d'aquests residus a Cys dóna una permeasa que uneix però que no transporta els substrats (Abdel-Dayem et al., 2003; Séry, 2002). A més, l'Arg149 que es troba entre el llaç 4-5 i l'hèlix V és necessària per la unió del sucre (Abdel-Dayem et al., 2003). En el cas de la lactosa de permeasa trobem que l'Arg144 és essencial per la unió del sucre i que forma un pont salí amb el Glu126 (Guan i Kaback, 2005). Fins ara, no s'ha trobat cap mutació compensativa que mostri que l'Arg141 forma ponts salins (Séry, 2002), però no es pot descartar que aquest residu formi i trenqui aquestes interaccions al llarg del transport dels substrats.

	127	150
	
melb_ecoli	FWSLVPTITL	DKRERERQLVPYPRF
melb_salty	FWSLVPTITL	DKRERERQLVPFPRF
melb_klepn	FWSLVPTITL	DKRERERQLVPYPRF
melb_entae	FWSLVPTITL	DKRERERQLVPYPRF
laccp_staxy	YWSWLPNLTHD	PRERREELSVIPRF
yagg_ecoli	YCAMPGVITAD	PKERHALQSWRFF
xylp_lacpe	ITSILPSLTSNPQ	ERVTLSSTIRQF
lacy_lacde	FWAMIPALSL	DSREERKSTFARV
yicj_ecoli	YCALGGVITND	PTQRISLQSWRFV
lacy_leula	YWGMVPAISED	SKERGI FTSLGSF
rafp_pedpe	FWSMLPSLT	DSREERKTATFARL
guta_bacsu	VNSLTGRMTNS	VEERTVLTTRMI
lacy_strtr	FWSMIPALSL	DSHERERKMATFARI

Figura 5.2. Comparació de les seqüències d'aminoàcids corresponents al llaç 4-5 de la permeasa de melibiosa d'*E. coli* amb proteïnes homòlogues.

Permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium* (melb_salty), *Klebsiella pneumoniae* (melb_klepn) i *Enterobacter aerogenes* (melb_entae); permeasa de lactosa de *Staphylococcus xylosus* (laccp_staxy), *Lactobacillus delbrueckii* (lacy_lacde), *Leuconostoc lactis* (lacy_leula) i *Streptococcus thermophilus* (lacy_strtr); YAGG d'*E. coli* (yagg_ecoli), transportador de xylosa de *Lactobacillus pentosus* (xylp_lacpe), permeasa de rafinosa de *Pedicoccus pentosaceus* (rafp_pedpe), YICJ d'*E. coli* (yicj_ecoli), transportador de glucitol de *Bacillus subtilis* (guta_bacsu). La numeració segueix la seqüència d'aminoàcids de la permeasa de melibiosa d'*E. coli*.

Igual que el llaç 4-5 la seqüència del llaç 10-11 també es troba conservada en proteïnes homòlogues. En aquest llaç es pot veure com la seqüència D³⁵¹-(X₂)-(E/D)-Y-(G/A)-E-(X₅)-R³⁶⁴ es troba conservada en tots aquests transportadors homòlegs (figura 5.3) (Poolman et al., 1996). En aquest llaç trobem que els aminoàcids carregats es poden dividir en dos grups (Séry, 2002). El primer grup està compost pels residus K359, H361 i E365. Aquests residus són els residus carregats menys conservats en el llaç 10-11. La seva substitució per una Cys no modifiquen la funció de la MelB. El segon grup està compost pels residus D351, D354, E357, R363 i K377. Aquests residus estan altament conservats dintre la família de transportadors de galactòsids-pentoses-hexurònids. El D351 es proposa que forma part del lloc d'unió del sucre o que intervé en la translocació. La R363 intervé en la translocació i els residus D354, E357 i K377 tenen una funció estructural.

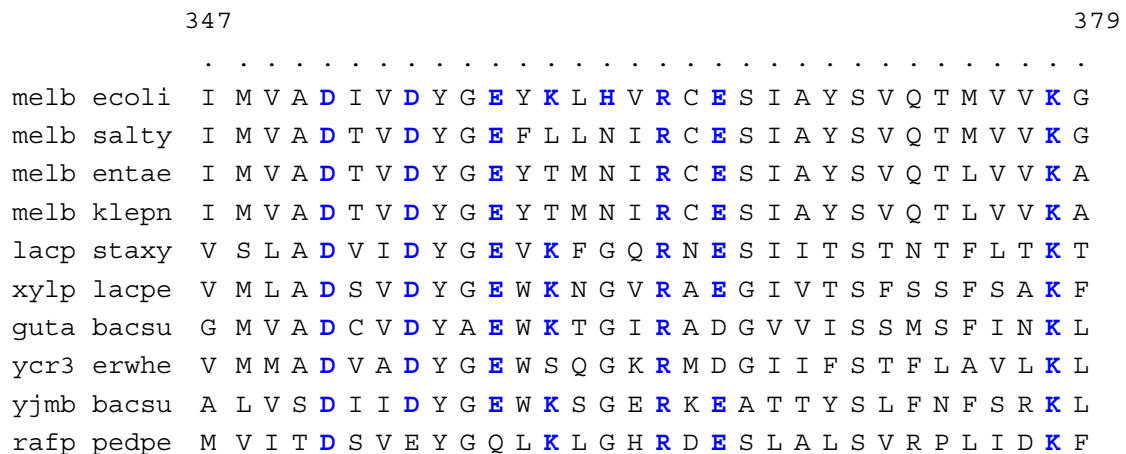


Figura 5.3. Comparació de les seqüències d'aminoàcids corresponents al llaç 10-11 de la permeasa de melibiosa d'*E. coli* amb proteïnes homòlogues. Permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium* (melb_salty), *Klebsiella pneumoniae* (melb_klepn) i *Enterobacter aerogenes* (melb_entae); transportador de xylosa de *Lactobacillus pentosus* (xylp_lacpe), permeasa de rafinosa de *Pedicoccus pentosaceus* (rafp_pedpe), transportador de glucitol de *Bacillus subtilis* (guta_bacsu), *Bacillus subtilis* (yjmb_bacsu) i la proteïna 29.9 kDa (ycr3_erwhe). La numeració segueix la seqüència d'aminoàcids de la permeasa de melibiosa d'*E. coli*.

Per tant, algunes de les càrregues positives d'aquests llaços són essencials per a la funció de la MelB i es troben altament conservades en les proteïnes homòlogues. La modificació d'aquests llaços dona lloc a dues permeases que uneixen els substrats i que no els poden transportar (Abdel-

Dayem et al., 2003; Damiano-Forano et al., 1986). Els seus espectres de diferència ja s'han anat comentant anteriorment amb les seves respectives permeases de referència (3SV i WT). En resum es pot veure que els espectres de diferència del R141C són diferents al 3SV; en canvi els espectres de la MeIB-NEM són molt semblant al WT. Això deu indicar que el mutant R141C està aturat en un estat anterior del transport que la MeIB-NEM. Aquest punt es comentarà més extensament en l'apartat següent.

5.5. Proposta del mecanisme de transport

En aquest treball es presenten els espectres de diferència deguts a la unió dels substrats de 4 formes diferents de la permeasa de melibiosa: WT, 3SV, MelB-NEM i R141C. Les dues primeres permeases uneixen i transporten melibiosa. Les dues últimes es caracteritzen per unir però no transportar els substrats, malgrat que fins ara encara no està clar en quin pas del transport afecten aquestes modificacions.

Abans de proposar cap relació entre els canvis estructurals que observem en els espectres de diferència i els passos del transport s'ha de saber què estem observant amb els espectres de diferència. El primer que s'ha de tenir en compte és que les nostres mesures no estan resoltes en el temps. (cada espectre de diferència tarda més de 2 minuts en adquirir-se). El segon aspecte important és l'estat de la MelB. La permeasa inicialment es troba en proteoliposomes. Un cop aquests proteoliposomes s'han assecat i rehidratat sobre el cristall de l'ATR es formaran una sèrie de bicapes col·locades una sobre l'altra (Goormaghtigh et al., 1999) (figura 5.4). Per tant, tot això fa que el que probablement s'observi sigui una barreja de varis estats del transport on els substrats es poden unir des dels dos costats de la proteïna. El temps de vida de cada estat determinarà la contribució de cadascun d'ells en l'espectre final.

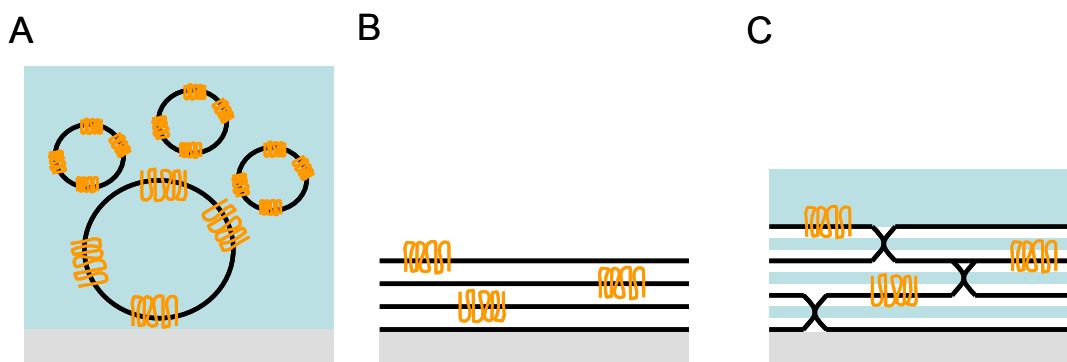


Figura 5.4. Esquematització de la formació de les bicapes sobre el cristall d'ATR a partir de la suspensió de liposomes.

A. Suspensió de liposomes. B. Un cop s'assequen els liposomes es formen bicapes una sobre l'altra. C. La rehidratació d'aquestes bicapes fa que aquestes se separin degut a l'inflament i que es comencin a formar interaccions entre elles.

El model proposat fins ara pel transport de la MelB, i per altres transportadors de membrana com la permeasa de lactosa, és un model de sis estats (Basilana et al., 1987, 1988; Pourcher et al., 1990). Aquest model de transport es basa en la hipòtesi que el lloc d'unió pels substrats es va alternant entre el costat periplasmàtic i l'espai citoplasmàtic. Les estructures cristal·lines de la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003) i el transportador glicerol-3-fosfat (Huang et al., 2003) corroboren aquesta suposició. Però l'estructura del transportador d'oxalat (Hirai i Subramaniam, 2004) mostra un pas intermediari entre els dos estats oberts de la proteïna i que correspondria a l'estat tancat (estats 3* i 6* de les figures 5.5 i 5.6). A més, mitjançant mesures de moviment de càrregues en el co-transportador Na⁺/glucosa (SLGT1) es van trobar passos addicionals als 6 inicialment proposats (Loo et al., 2005). Per descriure els diferents estats partirem de la proposta de transport dels transportadors simport fetes per Hirai i Subramaniam (2004), on a més dels estats oberts cap a un costat i l'altre de la membrana proposen un estat intermediari que anomenen estat tancat.

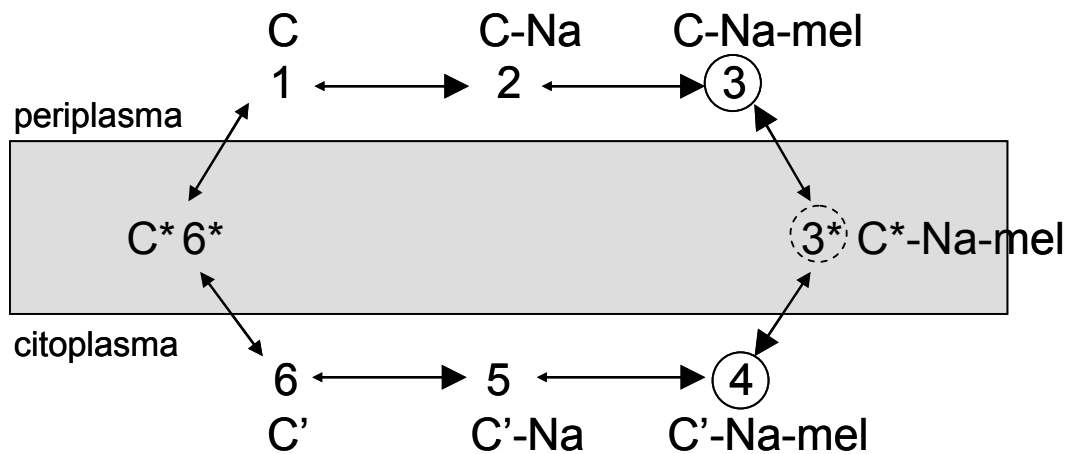


Figura 5.5. Representació dels diferents passos en el transport de la melibiosa en la membrana d'*E. coli*.

C representa les permeases obertes cap a l'espai periplasmàtic, C' les permeases obertes cap a l'espai citoplasmàtic i C* l'estat tancat de la proteïna. Encerclats els estats que deuen contribuir en els espectres de diferència deguts a la interacció de melibiosa.

Degut a que les concentracions de substrat en que es treballa són saturants i que el pas que delimita el transport és l'alliberament dels substrats (Pourcher et al., 1990), la major part del senyal deu correspondre a la

permeasa amb els substrats units i oberta cap a un costat o un altre de la membrana (estats 3 i 4) conjuntament amb una contribució, encara que possiblement menor, de l'estat 3* (figures 5.5 i 5.6). Encara que el cristall 3D de la MelB tingui molt poca resolució, s'intueix la conformació de l'estat obert (Purhonen et al., 2005).

5.5.1. Canvis en l'estructura secundària i terciària i en la protonació/entorn de les cadenes laterals en el transport de la MelB

El primer pas en el transport de la MelB (1→2 i 6→5), la unió de Na⁺ (o Li⁺), provoca els canvis conformacionals necessaris per augmentar l'afinitat del transportador pel sucre. En aquests canvis estan involucrades principalment estructures molt accessibles al solvent i en menor grau de no accessibles. Entre aquestes estructures hi trobem girs reversos, làmines β i estructures desordenades. A més, es produeix la variació de la inclinació d'algunes hèlixs α. Pel que fa a les cadenes laterals, hi ha canvis en la protonació i en l'entorn de carboxílics, principalment dels Asp que se suposa que formen part del lloc d'unió del catió. Altres aminoàcids importants per a la unió de Na⁺, com és el cas de l'Asn, també es deuen veure afectats.

Un cop s'han realitzat aquests canvis conformacionals, es produeix la unió i translocació de melibiosa que, degut al seu volum, dóna canvis estructurals més grans que la unió del catió per sí sol. En aquests canvis estan involucrades estructures menys accessibles al solvent que les observades en la unió dels cations. Aquestes estructures corresponen a varis tipus d'estructures secundàries (girs reversos, làmines β, hèlix 3₁₀, etc). Igual que en la unió de Na⁺ es produeixen canvis en la inclinació de les hèlixs. Aquests canvis corresponen a un augment en la variació de la inclinació de les hèlixs α ja afectades prèviament per la unió de Na⁺ i canvis en la inclinació de noves hèlixs α. Trp, Tyr, Lys, Asn i Arg, entre d'altres possibles residus, deuen formar part del lloc d'unió de la melibiosa. Els Asp i Glu possiblement també intervenen en la unió de la melibiosa i en el procés de translocació de la MelB, produint-se tant formació i/o trencament de ponts salins com canvis en el seu entorn/protonació.

5.5.2. Efecte de les modificacions en els llaços 4-5 i 10-11 en el transport de la MeIB

En el cas del mutant R141C i de la MeIB reaccionada amb NEM tindrem aturat el transport dels substrats. El fet que els espectres de diferència de la MeIB-NEM siguin molt semblants als del WT i que els espectres de diferència del mutant R141C difereixin dels espectres del 3SV, segurament indica que el R141C es troba aturat en un pas més primerenc en el transport dels substrats que la MeIB-NEM. A aquesta mateixa conclusió s'arriba mitjançant l'estudi del transport de la MeIB mitjançant la mesura de senyals elèctrics i canvis resolts en el temps de sondes fluorescents, on es va proposar que la mutació R141C bloqueja el pas $3 \leftrightarrow 3^*$ i que la MeIB-NEM bloqueja el pas $3^* \leftrightarrow 4$ (Meyer-Lipp, 2005).

Els espectres de diferència de la MeIB reaccionada amb NEM són pràcticament iguals als de la MeIB salvatge i sobretot, no s'observa la desaparició de cap pic corresponent a la variació en la inclinació d'hèlix α . Això concorda amb el fet que els canvis en el senyal de fluorescència deguts a l'addició de substrats en el WT i la MeIB-NEM són molt semblants (Mus-Veteau et al., 1995).

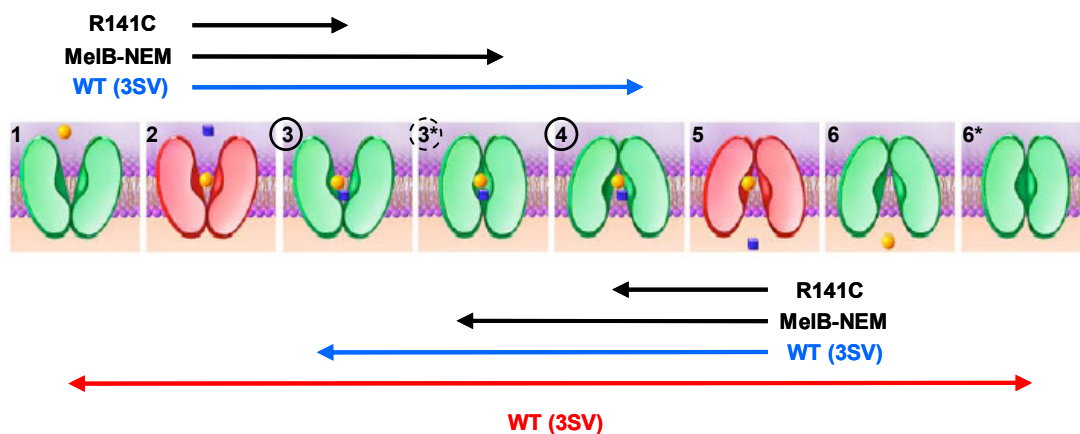


Figura 5.6. Esquematització dels passos involucrats en la unió i/o translocació de la melibiosa pel mutant R141C, per la MeIB-NEM i pel WT (3SV).

El punt groc representaria el catió i el quadre blau la melibiosa. Les permeases en vermell representen els estats en que la proteïna no pot translocar. Les línies negres corresponen als diferents passos que poden realitzar les permeases. En línia blava els diferents estats que probablement només s'observen en l'espectre de diferència del WT i 3SV. En línia vermella els diferents estats en el transport dels substrats. Encerclats els estats que deuen contribuir en els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa.

En els espectres de diferència del WT deguts a la interacció de melibiosa s'observarà la contribució de l'estat 3*, però sobretot dels estats 3 i 4. En la MelB reaccionada en NEM, si es troba aturada en l'estat 3*, en el seus espectres de diferència induïts per la interacció de melibiosa també observarem la suma dels estats 3*, 3 i 4. A més, el fet que els estats que contribueixen més a l'espectre deuen ser els de la permeasa amb els substrats units i oberta cap a un cantó, reforça que les diferències de les dues permeases siguin molt semblants. A més, no és sorprenent que l'espectre de diferència degut a la unió de melibiosa en presència d'H⁺ en la MelB-NEM sigui el més diferent al WT tenint en compte que varies mutacions del llaç 10-11 no permeten l'acumulació de melibiosa associada a H⁺ en canvi sí a Na⁺ (Ding et al., 2000).

El mutant R141C, com ja s'ha comentat abans, no mostra la resposta transitòria elèctrica corresponent a l'alliberament dels substrats i l'addició de melibiosa en presència de Na⁺ no dona senyal elèctric (Meyer-Lipp, 2005). A més, no s'observa canvi del senyal de fluorescència degut a la unió de melibiosa. En canvi, la permeasa sí que mostra canvis en l'entorn del sucre en afegir Na⁺ (Meyer-Lipp, 2005). Tots aquests aspectes fan pensar que el R141C deu estar aturat en el pas 3↔3* (Meyer-Lipp, 2005). Per tant, en els espectres de diferència hi deuen contribuir únicament els estats 3 i 4. Les diferències observades entre els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa del R141C i el 3SV deuen provenir en gran part a la contribució de l'estat 3* en els espectres de diferència del 3SV.

Tots els fets anteriors, fan pensar que els llaços proposats de ser mòbils deuen participar en etapes diferents del transport. Primer de tot la melibiosa es deu unir al seu lloc d'unio on d'entre d'altres residus hi deu participar l'Arg149. Tot seguit el moviment del llaç 4-5, on l'Arg141 té un rol essencial, deu permetre a la permeasa arribar fins a l'estat "tancat". A continuació el moviment del llaç 10-11 deu permetre a la permeasa establir la conformació de l'estat obert al cantó contrari on s'han unit els substrats, alliberant posteriorment els substrats.

6. CONCLUSIONS

- 1) S'ha implementat una metodologia per a l'obtenció d'espectres de diferència mitjançant espectroscòpia d'infraroig, produïts per la unió de substrats a la MelB reconstituïda en liposomes.
- 2) El film de proteoliposomes sobre el cristall d'ATR és suficientment estable per permetre realitzar les diferències. No es perd proteïna i la línia base es manté correcta en els intervals de temps de les diferències.
- 3) Els diferents controls demostren que en les diferències, fent servir lípids com a mostra, no s'observen bandes falses degudes a unions no específiques. A més, en els espectres de diferència de la proteïna tampoc s'observen bandes falses en presència de sacarosa (sucre que la MelB ni uneix ni transporta).
- 4) Els espectres de diferència deguts a la unió de Na^+ i de Li^+ a la MelB són diferents, indicant que els dos cations provoquen canvis conformacionals diferents.
- 5) Els canvis conformacionals induïts per la unió dels cations corresponen a canvis en làmines β , girs reversos i estructures desordenades. La major part d'aquestes estructures es deuen trobar exposades al solvent. A més, també s'observen pics que deuen correspondre a canvis en la inclinació de les hèlixs α .
- 6) La unió de cations també provoca canvis en la zona de vibració de les cadenes laterals d'Asp. La interacció dels cations provoca un desplaçament dels pics corresponents a les cadenes laterals d'aquests residus. A més, també s'observen canvis en la protonació d'aquests aminoàcids i/o canvis en l'entorn dels carbonils.
- 7) Els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa en presència d'algun dels tres cations (Na^+ , Li^+ o H^+) són molt semblants però presenten algunes diferències, que deuen correspondre a les diferents propietats cinètiques que té la MelB a l'hora de transportar la melibiosa amb els diferents cations.

8) La unió de melibiosa (indistintament del catió utilitzat) provoca canvis en estructures secundàries de làmina β , girs reversos i hèlixs 3_{10} . Aquestes estructures són menys accessibles al solvent que les corresponents a la unió del catió. A més, la unió de melibiosa també provoca canvis en la inclinació de les hèlixs transmembrana. Alguns d'aquests canvis es produeixen sobre hèlixs α prèviament modificades per la unió de Na^+ .

9) La unió de melibiosa també provoca canvis en l'estat de protonació, canvis en l'entorn i/o canvis en les interaccions d'Asp i Glu. Aquests canvis possiblement corresponen al trencament de ponts salins entre els àcids carboxílics i les cadenes laterals d'Arg i/o Lys.

10) El mutant 3SV presenta uns espectres de diferència molt semblants al WT en totes les condicions excepte quan hi ha la presència de l'ió Li^+ .

11) Els espectres de diferència deguts a la unió dels cations en el mutant R141C són molt semblants als del mutant 3SV. En canvi, els espectres de diferència corresponents a la unió de melibiosa en presència dels cations presenten variacions en els pics corresponents a girs reversos i làmines β . A més, un dels pics corresponent a canvis en la inclinació d'hèlixs α desapareix si aquestes estructures han estat modificades prèviament per la unió d'algun dels cations (Na^+ o Li^+). La unió de melibiosa en presència d' H^+ provoca un canvi conformacional en aquestes hèlixs menor que en el cas del 3SV.

12) Els espectres de diferència de la MelB-NEM són molt semblants als del WT. Per tant, la MelB-NEM deu tenir aturat el transport en etapes més avançades del transport que el mutant R141C. En concret, el mutant R141C deu només unir els substrats i la MelB-NEM deu aturar la translocació dels substrats en l'estat tancat. A més, es dedueix que el llaç 4-5 deu realitzar la seva funció abans que el llaç 10-11.

13) Els espectres de diferència de la MelB reconstituïda amb lípids d'EPC són diferents als de la MelB reconstituïda amb lípids d'*E. coli*. Els pics

corresponents a hèlixs α induïts per la unió de melibiosa es veuen afectats. Això deu ser degut a una menor compactació de la proteïna.

7. REFERÈNCIES

A

- Abdel-Dayem, M., Basquin, C., Pourcher, T., Cordat, E., and Leblanc, G. (2003) Cytoplasmic loop connecting helices IV and V of the melibiose permease from *Escherichia coli* is involved in the process of Na⁺-coupled sugar translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 1518-24.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610-5.
- Alvarez, J., Lee, D. C., Baldwin, S. A., and Chapman, D. (1987) Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 262, 3502-9.
- Ambroise, Y., Leblanc, G., and Rousseau, B. (2000) Active-site-directed photolabeling of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 39, 1338-45.
- Arkin, I. T., Russ, W. P., Lebendiker, M., and Schuldiner, S. (1996) Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle. *Biochemistry* 35, 7233-8.
- Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J., and Goñi, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
- Arrondo, J. L., and Goñi, F. M. (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367-405.

B

- Baenziger, J. E., Miller, K. W., and Rothschild, K. J. (1993) Fourier transform infrared difference spectroscopy of the nicotinic acetylcholine receptor: evidence for specific protein structural changes upon desensitization. *Biochemistry* 32, 5448-54.
- Baenziger, J. E., and Chew, J. P. (1997) Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor mainly involves a structural change in solvent-accessible regions of the polypeptide backbone. *Biochemistry* 36, 3617-24.
- Baenziger, J. E., Morris, M. L., Darsaut, T. E., and Ryan, S. E. (2000) Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 777-84.

- Barth, A., Kreutz, W., and Mäntele, W. (1990) Molecular changes in the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase during catalytic activity. A Fourier transform infrared (FTIR) study using photolysis of caged ATP to trigger the reaction cycle. *FEBS Lett.* 277, 147-50.
- Barth, A., and Mäntele, W. (1998) ATP-Induced phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase: molecular interpretation of infrared difference spectra. *Biophys. J* 75, 538-44.
- Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141-73.
- Barth, A., and Zscherp, C. (2000) Substrate binding and enzyme function investigated by infrared spectroscopy. *FEBS Lett.* 477, 151-6.
- Barth, A., and Corrie, J. E. (2002) Characterization of a new caged proton capable of inducing large pH jumps. *Biophys. J.* 83, 2864-71.
- Barth, A., and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35, 369-430.
- Bassilana, M., Damiano-Forano, E., and Leblanc, G. (1985) Effect of membrane potential on the kinetic parameters of the Na⁺ or H⁺ melibiose symport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 626-31.
- Bassilana, M., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1987) Facilitated diffusion properties of melibiose permease in *Escherichia coli* membrane vesicles. Release of co-substrates is rate limiting for permease cycling. *J. Biol. Chem.* 262, 16865-70.
- Bassilana, M., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1988) Melibiose permease of *Escherichia coli*. Characteristics of co-substrates release during facilitated diffusion reactions. *J. Biol. Chem.* 263, 9663-7.
- Behr, J. P., Lehn, J. M., Dock, A. C., and Moras, D. (1982) Crystal structure of a polyfunctional macrocyclic K⁺ complex provides a solid-state model of a K⁺ channel. *Nature* 295, 526-7.
- Bergo, V., Spudich, E. N., Spudich, J. L., and Rothschild, K. J. (2003) Conformational changes detected in a sensory rhodopsin II-transducer complex. *J. Biol. Chem.* 278, 36556-62.
- Botfield, M. C., and Wilson, T. H. (1988) Mutations that simultaneously alter both sugar and cation specificity in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 12909-15.
- Botfield, M. C., and Wilson, T. H. (1989) Peptide-specific antibody for the melibiose carrier of *Escherichia coli* localizes the carboxyl terminus to the cytoplasmic face of the membrane. *J. Biol. Chem.* 264, 11649-52.

- Botfield, M. C., Naguchi, K., Tsuchiya, T., and Wilson, T. H. (1992) Membrane topology of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 1818-22.
- Brandolin, G., Doussiere, J., Gulik, A., Gulik-Krzywicki, T., Lauquin, G. J., and Vignais, P. V. (1980) Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 592, 592-614.
- Brown, L. S., Sasaki, J., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., and Lanyi, J. K. (1995) Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 270, 27122-6.
- Butler, B. C., Hanchett, R. H., Rafailov, H., and MacDonald, G. (2002) Investigating structural changes induced by nucleotide binding to RecA using difference FTIR. *Biophys. J.* 82, 2198-210.
- Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.

C

- Cabiaux, V., Oberg, K. A., Pancoska, P., Walz, T., Agre, P., and Engel, A. (1997) Secondary structures comparison of aquaporin-1 and bacteriorhodopsin: a Fourier transform infrared spectroscopy study of two-dimensional membrane crystals. *Biophys. J.* 73, 406-17.
- Carruthers, A., and Melchior, D. L. (1984) Human erythrocyte hexose transporter activity is governed by bilayer lipid composition in reconstituted vesicles. *Biochemistry* 23, 6901-11.
- Cepus, V., Ulbrich, C., Allin, C., Troullier, A., and Gerwert, K. (1998) Fourier transform infrared photolysis studies of caged compounds. *Methods Enzymol.* 291, 223-45.
- Chin, J. J., Jung, E. K., Chen, V., and Jung, C. Y. (1987) Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in proteoliposome vesicles: circular dichroism measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 4113-6.
- Chirgadze, Y. N., Fedorov, O. V., and Trushina, N. P. (1975) Estimation of Amino-Acid Residue Side-Chain Absorption in Infrared-Spectra of Protein Solutions in Heavy-Water. *Biopolymers* 14, 679-694.
- Cohn, D. E., and Kaback, H. R. (1980) Mechanism of the melibiose porter in membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 19, 4237-43.
- Cordat, E., Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance

energy transfer. II. Identification of the tryptophan residues acting as energy donors. *J. Biol. Chem.* 273, 33198-202.

Cordat, E., Leblanc, G., and Mus-Veteau, I. (2000) Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of *Escherichia coli* melibiose permease. *Biochemistry* 39, 4493-9.

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

D

Damiano-Forano, E., Bassilana, M., and Leblanc, G. (1986) Sugar binding properties of the melibiose permease in *Escherichia coli* membrane vesicles. Effects of Na⁺ and H⁺ concentrations. *J. Biol. Chem.* 261, 6893-9.

Dave, N., Troullier, A., Mus-Veteau, I., Dunach, M., Leblanc, G., and Padrós, E. (2000) Secondary structure components and properties of the melibiose permease from *Escherichia coli*: a fourier transform infrared spectroscopy analysis. *Biophys. J.* 79, 747-55.

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

Dave, N., Lórenz-Fonfría, V. A., Villaverde, J., Lemonnier, R., Leblanc, G., and Padrós, E. (2002) Study of amide-proton exchange of *Escherichia coli* melibiose permease by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: evidence of structure modulation by substrate binding. *J. Biol. Chem.* 277, 3380-7.

Dave, N. (2003) Caracterització de l'estructura i funció del transportador de melibiosa d'*Escherichia coli* per espectroscòpia d'infraroig. *Tesi doctoral*.

de Jongh, H. H., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J. M. (1997a) Amide-proton exchange of water-soluble proteins of different structural classes studied at the submolecular level by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36, 13603-10.

de Jongh, H. H., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J. M. (1997b) Monitoring structural stability of trypsin inhibitor at the submolecular level by amide-proton exchange using Fourier transform infrared spectroscopy: a test case for more general application. *Biochemistry* 36, 13593-602.

Deacon, G. B., and Phillips, R. J. (1980) Relationships between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coordination Chemistry Reviews* 33, 227-250.

- DeGrip, W. J., Gray, D., Gillespie, J., Bovee, P. H., Van den Berg, E. M., Lugtenburg, J., and Rothschild, K. J. (1988) Photoexcitation of rhodopsin: conformation changes in the chromophore, protein and associated lipids as determined by FTIR difference spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 48, 497-504.
- Deng, H., and Callender, R. (1999) Raman spectroscopic studies of the structures, energetics, and bond distortions of substrates bound to enzymes. *Methods Enzymol.* 308, 176-201.
- Ding, P. Z., Botfield, M. C., and Wilson, T. H. (2000) Sugar recognition mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*: possible structural information concerning the arrangement of membrane-bound helices and sugar/cation recognition site. *Biochim. Biophys. Acta* 1509, 123-30.
- Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2000a) The melibiose carrier of *Escherichia coli*: cysteine substitutions for individual residues in helix XI. *J. Membr. Biol.* 174, 135-40.
- Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2000b) Physiological evidence for an interaction between helix XI and helices I, II, and V in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 409-13.
- Ding, P. Z., Weissborn, A. C., and Wilson, T. H. (2001) Cysteine substitutions for individual residues in helix VI of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* 183, 33-8.
- Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2001a) The proximity between helix I and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli* as determined by cross-linking. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 230-8.
- Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2001b) The effect of modifications of the charged residues in the transmembrane helices on the transport activity of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 348-54.
- Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2001c) Cysteine mutagenesis of the amino acid residues of transmembrane helix I in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40, 5506-10.
- Ding, P. Z. (2003) An investigation of cysteine mutants on the cytoplasmic loop X/XI in the melibiose transporter of *Escherichia coli* by using thiol reagents: implication of structural conservation of charged residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 864-9.
- Ding, P. Z. (2004) Loop X/XI, the largest cytoplasmic loop in the membrane-bound melibiose carrier of *Escherichia coli*, is a functional re-entrant loop. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 106-17.

Dioumaev, A. K. (2001) Infrared methods for monitoring the protonation state of carboxylic amino acids in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry (Mosc)* 66, 1269-76.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A. L., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Dumas, F., Tocanne, J. F., Leblanc, G., and Lebrun, M. C. (2000) Consequences of hydrophobic mismatch between lipids and melibiose permease on melibiose transport. *Biochemistry* 39, 4846-54.

F

Franco, P. J., and Wilson, T. H. (1996) Alteration of Na⁺-coupled transport in site-directed mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1282, 240-8.

Franco, P. J., and Wilson, T. H. (1999) Arg-52 in the melibiose carrier of *Escherichia coli* is important for cation-coupled sugar transport and participates in an intrahelical salt bridge. *J. Bacteriol.* 181, 6377-86.

Franco, P. J., Jena, A. B., and Wilson, T. H. (2001) Physiological evidence for an interaction between helices II and XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1510, 231-42.

Furutani, Y., Kandori, H., and Shichida, Y. (2003a) Structural changes in lumirhodopsin and metarhodopsin I studied by their photoreactions at 77 K. *Biochemistry* 42, 8494-500.

Furutani, Y., Sudo, Y., Kamo, N., and Kandori, H. (2003b) FTIR spectroscopy of the complex between pharaonis phoborhodopsin and its transducer protein. *Biochemistry* 42, 4837-42.

G

Ganea, C., Pourcher, T., Leblanc, G., and Fendler, K. (2001) Evidence for intraprotein charge transfer during the transport activity of the melibiose permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40, 13744-52.

Georg, H., Barth, A., Kreutz, W., Siebert, F., and Mäntele, W. (1994) Structural changes of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase upon Ca²⁺ binding studied by simultaneous measurement of infrared absorbance changes and changes of intrinsic protein fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 139-50.

Gerwert, K. (1999) Molecular reaction mechanisms of proteins monitored by time-resolved FTIR-spectroscopy. *Biol. Chem.* 380, 931-5.

- Glusker, J. P. (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv. Protein. Chem.* 42, 1-76.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1990) Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur. J. Biochem.* 193, 409-20.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994a) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* 23, 405-50.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994b) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. *Subcell. Biochem.* 23, 363-403.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994c) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* 23, 329-62.
- Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J. M. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 105-85.
- Goswitz, V. C., and Brooker, R. J. (1995) Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein. Sci.* 4, 534-7.
- Gregoriou, V. G., Jayaraman, V., Hu, X., and Spiro, T. G. (1995) FT-IR difference spectroscopy of hemoglobins A and Kempsey: evidence that a key quaternary interaction induces protonation of Asp beta 99. *Biochemistry* 34, 6876-82.
- Grunewald, M., and Kanner, B. I. (2000) The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *Journal of Biological Chemistry* 275, 9684-9689.
- Guan, L., and Kaback, H. R. (2005) Lessons from Lactose Permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*
- Gull, S. F., and Skilling, J. (1990) Quantified maximum entropy MemSys5 user's manual. Maximum Entropy Data Consultants Ltd.
- Gwizdek, C., Leblanc, G., and Bassilana, M. (1997) Proteolytic mapping and substrate protection of the *Escherichia coli* melibiose permease. *Biochemistry* 36, 8522-9.

H

- Habibian, R., Dzioba, J., Barrett, J., Galperin, M. Y., Loewen, P. C., and Dibrov, P. (2005) Functional analysis of conserved polar residues in Vc-NhaD, Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 280, 39637-43.
- Hackmann, C., Gujjarro, J., Chizhov, I., Engelhard, M., Rodig, C., and Siebert, F. (2001) Static and time-resolved step-scan Fourier transform infrared investigations of the photoreaction of halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: consequences for models of the anion translocation mechanism. *Biophys. J.* 81, 394-406.
- Hacksell, I., Rigaud, J. L., Purhonen, P., Pourcher, T., Hebert, H., and Leblanc, G. (2002) Projection structure at 8 Å resolution of the melibiose permease, an Na-sugar co-transporter from *Escherichia coli*. *Embo. J.* 21, 3569-74.
- Hama, H., and Wilson, T. H. (1993) Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The amino-terminal portion is crucial for Na⁺ recognition in melibiose transport. *J Biol Chem* 268, 10060-5.
- Hama, H., and Wilson, T. H. (1994) Replacement of alanine 58 by asparagine enables the melibiose carrier of *Klebsiella pneumoniae* to couple sugar transport to Na⁺. *J Biol Chem* 269, 1063-7.
- Hansen, C. (2000) Numerical aspects of deconvolution. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 71 pages.
- Hansen, C. (2001) Regularization tools: A Matlab package for analysis and solution of discrete illposed problems. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 109 pages.
- Harding, M. M. (2004) The architecture of metal coordination groups in proteins. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 849-59.
- Hastings Wilson, T., and Wilson, D. M. (1998) Evidence for a close association between helix IV and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1374, 77-82.
- Heimburg, T., and Marsh, D. (1993) Investigation of secondary and tertiary structural changes of cytochrome c in complexes with anionic lipids using amide hydrogen exchange measurements: an FTIR study. *Biophys. J.* 65, 2408-17.
- Henderson, P. J. (1993) The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 708-21.

- Heymann, J. A., Sarker, R., Hirai, T., Shi, D., Milne, J. L., Maloney, P. C., and Subramaniam, S. (2001) Projection structure and molecular architecture of OxIT, a bacterial membrane transporter. *Embo. J.* 20, 4408-13.
- Hille, B. (1990) Ionic channels of Excitable Membranes. *Sinauer. Ass. Inc. Sunderland, MA.*, 261-290.
- Hirai, T., and Subramaniam, S. (2004) Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter OxIT. *Biophys. J.* 87, 3600-7.
- Honig, B. H., and Hubbell, W. L. (1984) Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81, 5412-6.
- Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M., and Wang, D. N. (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301, 616-20.
- Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., and Michel, H. (2005) Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* 435, 1197-202.

I

- In 't Veld, G., Driessen, A. J., Op den Kamp, J. A., and Konings, W. N. (1991) Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochim Biophys Acta* 1065, 203-12.
- Inoue, H., Noumi, T., Tsuchiya, T., and Kanazawa, H. (1995) Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the transmembrane helices of a Na^+/H^+ antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 363, 264-8.

J

- Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95-120.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523-6.

K

- Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U., and Dimroth, P. (1997) Molecular basis for the coupling ion selectivity of F_1F_0 ATP synthases: probing the liganding groups for Na^+ and Li^+ in the c subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*. *Biochemistry* 36, 9185-94.

- Kandori, H., and Maeda, A. (1995) FTIR spectroscopy reveals microscopic structural changes of the protein around the rhodopsin chromophore upon photoisomerization. *Biochemistry* 34, 14220-9.
- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Cameron, D. G., and Mantsch, H. H. (1981a) Noise in Fourier Self-Deconvolution. *Applied Optics* 20, 1866-1879.
- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1981b) Fourier Self-Deconvolution - a Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. *Applied Spectroscopy* 35, 271-276.
- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1981c) Fourier-Transforms in the Computation of Self-Deconvoluted and 1st-Order Derivative Spectra of Overlapped Band Contours. *Analytical Chemistry* 53, 1454-1457.
- Kawakami, T., Akizawa, Y., Ishikawa, T., Shimamoto, T., Tsuda, M., and Tsuchiya, T. (1988) Amino acid substitutions and alteration in cation specificity in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 14276-80.
- Kluge, T., Olejnik, J., Smilowitz, L., and Rothschild, K. J. (1998) Conformational changes in the core structure of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 37, 10279-85.
- Kohler, K., Forster, I. C., Stange, G., Biber, J., and Murer, H. (2002) Identification of functionally important sites in the first intracellular loop of the NaPi-IIa cotransporter. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 282, F687-F696.
- Krimm, S., and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 38, 181-364.
- Kuwabara, N., Inoue, H., Tsuboi, Y., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2004) The fourth transmembrane domain of the *Helicobacter pylori* Na⁺/H⁺ antiporter NhaA faces a water-filled channel required for ion transport. *J. Biol. Chem.* 279, 40567-75.

L

- Lambert, G., Forster, I. C., Stange, G., Kohler, K., Biber, J., and Murer, H. (2001) Cysteine mutagenesis reveals novel structure-function features within the predicted third extracellular loop of the type IIa Na⁺/Pi⁻ cotransporter. *Journal of General Physiology* 117, 533-546.
- Larrabee, J. A., and Choi, S. (1993) Fourier transform infrared spectroscopy. *Methods Enzymol.* 226, 289-305.

- Le Besnerais, G., Bercher, J. F., and Demoment, G. (1994) A new look at the entropy for solving linear inverse problems. Scientific Literature Digital Library. <http://citeseer.nj.nec.com>.
- le Coutre, J., Narasimhan, L. R., Patel, C. K., and Kaback, H. R. (1997) The lipid bilayer determines helical tilt angle and function in lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 10167-71.
- le Coutre, J., Turk, E., Kaback, H. R., and Wright, E. M. (2002) Ligand-induced differences in secondary structure of the *Vibrio parahaemolyticus* Na⁺/galactose cotransporter. *Biochemistry* 41, 8082-6.
- Locher, K. P., Bass, R. B., and Rees, D. C. (2003) Structural biology. Breaching the barrier. *Science* 301, 603-4.
- Loo, D. D., Hirayama, B. A., Cha, A., Bezanilla, F., and Wright, E. M. (2005) Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *J. Gen. Physiol.* 125, 13-36.
- Lopilato, J., Tsuchiya, T., and Wilson, T. H. (1978) Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethylgalactoside transport by the melibiose transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 134, 147-56.
- Lórenz, V. A., Villaverde, J., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. M., Brandolin, G., and Padrós, E. (2001) The secondary structure of the inhibited mitochondrial ADP/ATP transporter from yeast analyzed by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 40, 8821-8833.
- Lórenz-Fonfría, V. A., Villaverde, J., Trezeguet, W., Lauquin, G. J. M., Brandolin, G., and Padrós, E. (2003) Structural and functional implications of the instability of the ADP/ATP transporter purified from mitochondria as revealed by FTIR spectroscopy. *Biophysical Journal* 85, 255-266.
- Lórenz-Fonfría, V. A., and Padrós, E. (2005) Maximum entropy deconvolution of infrared spectra: Use of a novel entropy expression without sign restriction. *Applied Spectroscopy* 59, 474-486.

M

- Maehrel, C., Cordat, E., Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer. I. Evidence for ion-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* 273, 33192-7.
- Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 18, 197-202.

- Marrero, H., and Rothschild, K. J. (1987a) Bacteriorhodopsins M412 and Br605 Protein Conformations Are Similar - Significance for Proton Transport. *Febs Letters* 223, 289-293.
- Marrero, H., and Rothschild, K. J. (1987b) Conformational changes in bacteriorhodopsin studied by infrared attenuated total reflection. *Biophys. J.* 52, 629-35.
- Marsh, D. (1999) Quantitation of secondary structure in ATR infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 77, 2630-7.
- Matsuzaki, S., Weissborn, A. C., Tamai, E., Tsuchiya, T., and Wilson, T. H. (1999) Melibiose carrier of *Escherichia coli*: use of cysteine mutagenesis to identify the amino acids on the hydrophilic face of transmembrane helix 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1420, 63-72.
- Merino-Montero, S., Montero, M. T., and Hernandez-Borrell, J. (2006) Effects of lactose permease of *Escherichia coli* on the anisotropy and electrostatic surface potential of liposomes. *Biophys. Chem.* 119, 101-5.
- Meyer-Lipp, K., Ganea, C., Pourcher, T., Leblanc, G., and Fendler, K. (2004) Sugar binding induced charge translocation in the melibiose permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43, 12606-13.
- Meyer-Lipp, K. (2005) Time-Resolved Measurements of Sugar-Binding-Induced Conformational Changes in the Melibiose Permease from *Escherichia coli*. *Tesi doctoral*.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-55.
- Montecucco, C., Smith, G. A., Dabbeni-sala, F., Johannsson, A., Galante, Y. M., and Bisson, R. (1982) Bilayer thickness and enzymatic activity in the mitochondrial cytochrome c oxidase and ATPase complex. *FEBS Lett.* 144, 145-8.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599-605.
- Mus-Veteau, I., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 34, 6775-83.
- Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1996) Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of cosubstrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses. *Biochemistry* 35, 12053-60.

N

- Nara, M., Tasumi, M., Tanokura, M., Hiraoki, T., Yazawa, M., and Tsutsumi, A. (1994) Infrared studies of interaction between metal ions and Ca²⁺-binding proteins. Marker bands for identifying the types of coordination of the side-chain COO⁻ groups to metal ions in pike parvalbumin (pI = 4.10). *FEBS Lett.* 349, 84-8.
- Nara, M., Torii, H., and Tasumi, M. (1996) Correlation between the vibrational frequencies of the carboxylate group and the types of its coordination to a metal ion: An ab initio molecular orbital study. *Journal of Physical Chemistry* 100, 19812-19817.
- Nara, M., Yumoto, F., Nagata, K., Tanokura, M., Kagi, H., Ojima, T., and Nishita, K. (2004) Fourier transform infrared spectroscopic study on the binding of Mg²⁺ to a mutant akazara scallop troponin C (E142Q). *Biopolymers* 74, 77-81.
- Nyquist, R. M., Heitbrink, D., Bolwien, C., Wells, T. A., Gennis, R. B., and Heberle, J. (2001) Perfusion-induced redox differences in cytochrome c oxidase: ATR/FT-IR spectroscopy. *FEBS Lett.* 505, 63-7.

O

- Oberg, K. A., and Fink, A. L. (1998) A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution. *Anal Biochem* 256, 92-106.
- Ostroumov, E., Dzioba, J., Loewen, P. C., and Dibrov, P. (2002) Asp(344) and Thr(345) are critical for cation exchange mediated by NhaD, Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio cholerae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 99-106.

P

- Patzlaff, J. S., Moeller, J. A., Barry, B. A., and Brooker, R. J. (1998) Fourier transform infrared analysis of purified lactose permease: A monodisperse lactose permease preparation is stably folded, alpha-helical, and highly accessible to deuterium exchange. *Biochemistry* 37, 15363-15375.
- Pelton, J. T., and McLean, L. R. (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry* 277, 167-176.
- Poolman, B., and Konings, W. N. (1993) Secondary solute transport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1183, 5-39.
- Poolman, B., Knol, J., van der Does, C., Henderson, P. J., Liang, W. J., Leblanc, G., Pourcher, T., and Mus-Veteau, I. (1996) Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Mol. Microbiol.* 19, 911-22.

- Pourcher, T., Bassilana, M., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., and Leblanc, G. (1990) The melibiose/Na⁺ symporter of *Escherichia coli*: kinetic and molecular properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 326, 411-23.
- Pourcher, T., Deckert, M., Bassilana, M., and Leblanc, G. (1991) Melibiose permease of *Escherichia coli*: mutation of aspartic acid 55 in putative helix II abolishes activation of sugar binding by Na⁺ ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1176-81.
- Pourcher, T., Zani, M. L., and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. I. Effect on Na⁺-dependent transport and binding properties. *J. Biol. Chem.* 268, 3209-15.
- Pourcher, T., Leclercq, S., Brandolin, G., and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: large scale purification and evidence that H⁺, Na⁺, and Li⁺ sugar symport is catalyzed by a single polypeptide. *Biochemistry* 34, 4412-20.
- Pourcher, T., Bibi, E., Kaback, H. R., and Leblanc, G. (1996) Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis. *Biochemistry* 35, 4161-8.
- Provencher, S. W. (1982) A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications.* 27, 213-227.
- Purhonen, P., Lundback, A. K., Lemonnier, R., Leblanc, G., and Hebert, H. (2005) Three-dimensional structure of the sugar symporter melibiose permease from cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 152, 76-83.

Q

- Quioco, F. A. (1986) Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 287-315.
- Quioco, F. A. (1988) Molecular features and basic understanding of protein-carbohydrate interactions: the arabinose-binding protein-sugar complex. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 139, 135-48.

R

- Rahmelow, K., Hubner, W., and Ackermann, T. (1998) Infrared absorbances of protein side chains. *Analytical Biochemistry* 257, 1-11.
- Rath, P., Delange, F., Degrip, W. J., and Rothschild, K. J. (1998) Hydrogen bonding changes of internal water molecules in rhodopsin during metarhodopsin I and metarhodopsin II formation. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 713-7.

- Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M. H., Jr. (1994) A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 133-66.
- Rich, P. R., and Breton, J. (2002) Attenuated total reflection Fourier transform infrared studies of redox changes in bovine cytochrome c oxidase: resolution of the redox Fourier transform infrared difference spectrum of heme a(3). *Biochemistry* 41, 967-73.
- Rigaud, J. L., Paternostre, M. T., and Bluzat, A. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 27, 2677-88.
- Rothschild, K. J., and Clark, N. A. (1979a) Anomalous Amide I Infrared-Absorption of Purple Membrane. *Science* 204, 311-312.
- Rothschild, K. J., and Clark, N. A. (1979b) Polarized Infrared Spectroscopy of Oriented Purple Membrane. *Biophysical Journal* 25, 473-487.
- Rothschild, K. J., Cantore, W. A., and Marrero, H. (1983) Fourier transform infrared difference spectra of intermediates in rhodopsin bleaching. *Science* 219, 1333-5.
- Rothschild, K. J. (1992) FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 147-67.
- Rothschild, K. J., Marti, T., Sonar, S., He, Y. W., Rath, P., Fischer, W., and Khorana, H. G. (1993) Asp96 deprotonation and transmembrane alpha-helical structural changes in bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 268, 27046-52.
- Ryan, S. E., Blanton, M. P., and Baenziger, J. E. (2001) A conformational intermediate between the resting and desensitized states of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 4796-803.

S

- Saarinen, P. E., Kauppinen, J. K., and Partanen, J. O. (1995) New method for spectral line shape fitting and critique on the Voigt line shape. *Appl. Spectrosc.* 49, 1438-53.
- Saier, M. H., Jr. (2000a) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 354-411.
- Saier, M. H., Jr. (2000b) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* 35, 699-710.

- Scatchard, G. (1949) The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 660-672.
- Scheirlinckx, F., Raussens, V., Ruyschaert, J. M., and Goormaghtigh, E. (2004) Conformational changes in gastric H⁺/K⁺-ATPase monitored by difference Fourier-transform infrared spectroscopy and hydrogen/deuterium exchange. *Biochem. J.* 382, 121-9.
- Schlereth, D. D., Fernandez, V. M., and Mäntele, W. (1993) Protein conformational changes in tetraheme cytochromes detected by FTIR spectroelectrochemistry: *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4 and *Desulfovibrio gigas* cytochromes c3. *Biochemistry* 32, 9199-208.
- Séry, N. (2002) Role of cytoplasmic Loops 4-5 and 10-11 in the Na⁺- symport mechanism catalyzed by the Melibiose permease of *Escherichia coli*. Diploma of Advanced Studies, Nice University, France.
- Singleto.Ws, Gray, M. S., Brown, M. L., and White, J. L. (1965) Chromatographically Homogeneous Lecithin from Egg Phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists Society* 42, 53-&.
- Slotboom, D. J., Konings, W. N., and Lolkema, J. S. (2001) The structure of glutamate transporters shows channel-like features. *Febs Letters* 492, 183-186.
- Sobczak, I., and Lolkema, J. S. (2005) Structural and mechanistic diversity of secondary transporters. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 161-7.
- Sonar, S., Lee, C. P., Coleman, M., Patel, N., Liu, X., Marti, T., Khorana, H. G., RajBhandary, U. L., and Rothschild, K. J. (1994) Site-directed isotope labelling and FTIR spectroscopy of bacteriorhodopsin. *Nat. Struct. Biol.* 1, 512-7.
- Stephenson, D. S. (1988) Linear Prediction and Maximum-Entropy Methods in Nmr-Spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 20, 515-626.
- Sujatha, M. S., and Balaji, P. V. (2004) Identification of common structural features of binding sites in galactose-specific proteins. *Proteins* 55, 44-65.
- Susi, H., Timasheff, S. N., and Stevens, L. (1967) Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. I. The amide I band in H₂O and D₂O solutions. *J. Biol. Chem.* 242, 5460-6.

T

- Tanimoto, T., Shibata, M., Belenky, M., Herzfeld, J., and Kandori, H. (2004) Altered hydrogen bonding of Arg82 during the proton pump cycle of

- bacteriorhodopsin: a low-temperature polarized FTIR spectroscopic study. *Biochemistry* 43, 9439-47.
- Tatulian, S. A., Cortés, D. M., and Perozo, E. (1998) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): secondary structure characterization from FTIR spectroscopy. *FEBS Lett.* 423, 205-12.
- Tatulian, S. A. (2003) Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. *Biochemistry* 42, 11898-907.
- Tefft, R. E., Jr., Carruthers, A., and Melchior, D. L. (1986) Reconstituted human erythrocyte sugar transporter activity is determined by bilayer lipid head groups. *Biochemistry* 25, 3709-18.
- Torres, J., and Padrós, E. (1993) The secondary structure of bacteriorhodopsin in organic solution. A Fourier transform infrared study. *FEBS Lett.* 318, 77-9.
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002a) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418, 605-11.
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002b) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418, 605-611.
- Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430, 529-535.
- Troullier, A., Gerwert, K., and Dupont, Y. (1996) A time-resolved Fourier transformed infrared difference spectroscopy study of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: kinetics of the high-affinity calcium binding at low temperature. *Biophys. J.* 71, 2970-83.
- Tsuchiya, T., and Wilson, T. H. (1978) Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of *Escherichia coli*. *Membr. Biochem.* 2, 63-79.

U

- Uratani, Y., Wakayama, N., and Hoshino, T. (1987) Effect of lipid acyl chain length on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 262, 16914-9.

V

- Vardy, E., Arkin, I. T., Gottschalk, K. E., Kaback, H. R., and Schuldiner, S. (2004) Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. *Protein. Sci.* 13, 1832-40.

- Vazquez-Ibar, J. L., Guan, L., Weinglass, A. B., Verner, G., Gordillo, R., and Kaback, H. R. (2004) Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 49214-21.
- Venyaminov, S., and Kalnin, N. N. (1990a) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* 30, 1243-57.
- Venyaminov, S. Y., and Kalnin, N. N. (1990b) Quantitative Ir Spectrophotometry of Peptide Compounds in Water (H₂O) Solutions .1. Spectral Parameters of Amino-Acid Residue Absorption-Bands. *Biopolymers* 30, 1243-1257.
- Vigano, C., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J. M. (2003) Detection of structural and functional asymmetries in P-glycoprotein by combining mutagenesis and H/D exchange measurements. *Chem. Phys. Lipids* 122, 121-35.
- von Germar, F., Galan, A., Llorca, O., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Mäntele, W., and Muga, A. (1999) Conformational changes generated in GroEL during ATP hydrolysis as seen by time-resolved infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 274, 5508-13.
- von Germar, F., Barth, A., and Mäntele, W. (2000) Structural changes of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase upon nucleotide binding studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 78, 1531-40.
- Vonck, J. (1996) A three-dimensional difference map of the N intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle: Part of the F helix tilts in the M to N transition. *Biochemistry* 35, 5870-5878.
- Vonck, J. (2000) Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography. *Embo Journal* 19, 2152-2160.
- W**
- Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., and Shigekawa, M. (2000) A novel topology model of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *J. Biol. Chem.* 275, 7942-9.
- Weissborn, A. C., Botfield, M. C., Kuroda, M., Tsuchiya, T., and Wilson, T. H. (1997) The construction of a cysteine-less melibiose carrier from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1329, 237-44.
- Williams, K. A. (2000) Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* 403, 112-5.
- Wilson, D. M., and Wilson, T. H. (1987) Cation specificity for sugar substrates of the melibiose carrier in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 904, 191-200.

- Wilson, D. M., and Wilson, T. H. (1992) Asp-51 and Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier. *J. Bacteriol.* 174, 3083-6.
- Wilson, D. M., Hama, H., and Wilson, T. H. (1995) GLY113-->ASP can restore activity to the ASP51-->SER mutant in the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 242-9.
- Wilson, T. H., and Ding, P. Z. (2001) Sodium-substrate cotransport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 121-30.
- Wu, J., and Kaback, H. R. (1997) Helix proximity and ligand-induced conformational changes in the lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed chemical crosslinking. *J. Mol. Biol.* 270, 285-93.
- Wu, J., Hardy, D., and Kaback, H. R. (1998a) Transmembrane helix tilting and ligand-induced conformational changes in the lactose permease determined by site-directed chemical crosslinking in situ. *J. Mol. Biol.* 282, 959-67.
- Wu, J., Hardy, D., and Kaback, H. R. (1998b) Tilting of helix I and ligand-induced changes in the lactose permease determined by site-directed chemical cross-linking in situ. *Biochemistry* 37, 15785-90.
- Y**
- Yamaguchi, A., Akasaka, T., Ono, N., Someya, Y., Nakatani, M., and Sawai, T. (1992) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10. Roles of the aspartyl residues located in the putative transmembrane helices. *J. Biol. Chem.* 267, 7490-8.
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437, 215-23.
- Yazyu, H., Shiota-Niiya, S., Shimamoto, T., Kanazawa, H., Futai, M., and Tsuchiya, T. (1984) Nucleotide sequence of the melB gene and characteristics of deduced amino acid sequence of the melibiose carrier in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 4320-6.
- Yazyu, H., Shiota, S., Futai, M., and Tsuchiya, T. (1985) Alteration in cation specificity of the melibiose transport carrier of *Escherichia coli* due to replacement of proline 122 with serine. *J. Bacteriol.* 162, 933-7.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811-818.

Z

- Zani, M. L., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties. *J. Biol. Chem.* 268, 3216-21.
- Zani, M. L., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1994) Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH₂-terminal domains of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 24883-9.
- Zhang, W., Guan, L., and Kaback, H. R. (2002) Helices VII and X in the lactose permease of *Escherichia coli*: proximity and ligand-induced distance changes. *J. Mol. Biol.* 315, 53-62.
- Zhang, W., Campbell, H. A., King, S. C., and Dowhan, W. (2005) Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the gamma-aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 26032-8.
- Zhang, Y., and Fillingame, R. H. (1995) Changing the ion binding specificity of the *Escherichia coli* H⁺-transporting ATP synthase by directed mutagenesis of subunit c. *J. Biol. Chem.* 270, 87-93.
- Zscherp, C., and Barth, A. (2001) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms. *Biochemistry* 40, 1875-83.

8. PUBLICACIONES

Substrate-Induced Conformational Changes of Melibiose Permease from *Escherichia coli* Studied by Infrared Difference Spectroscopy[†]

Xavier León,[‡] Víctor A. Lórenz-Fonfría,[‡] Raymonde Lemonnier,[§] Gérard Leblanc,[§] and Esteve Padrós*[‡]

Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, and Laboratoire de Physiologie des Membranes Cellulaires—LRC-CEA 16V, Université de Nice Sophia-Antipolis and CNRS (UMR 6078), 06238, Villefranche sur Mer Cedex, France

Received August 7, 2004; Revised Manuscript Received December 24, 2004

ABSTRACT: Fourier transform infrared difference spectroscopy has been used to obtain information about substrate-induced structural changes of the melibiose permease (MelB) from *Escherichia coli* reconstituted into liposomes. Binding of the cosubstrate Na⁺ gives rise to several peaks in the amide I and II regions of the difference spectrum Na⁺·MelB minus H⁺·MelB, that denote the presence of conformational changes in all types of secondary structures (α -helices, β -sheets, loops). In addition, peaks around 1400 and at 1740–1720 cm⁻¹ are indicative of changes in protonation/deprotonation or in environment of carboxylic groups. Binding of the cosubstrate Li⁺ produces a difference spectrum that is also indicative of conformational changes, but that is at variance as compared to that induced by Na⁺ binding. To analyze the following transport steps, the melibiose permease with either H⁺, Na⁺, or Li⁺ bound was incubated with melibiose. The difference spectra obtained by subtracting the spectrum cation·MelB from the respective complex cation·melibiose·MelB were roughly similar among them, but different from those induced by cation binding, and more intense. Therefore, major conformational changes that are induced during melibiose binding/substrate translocation, like those denoted by intense peaks at 1668 and 1645 cm⁻¹, are similar for the three cotransporting cations. Changes in the protonation state and/or in the environment of given carboxylic residues were also induced by melibiose–MelB interaction in the presence of cations.

The melibiose permease (MelB)¹ from *Escherichia coli* transports the disaccharide melibiose into the cell by using the transmembrane electrochemical gradient of Na⁺, Li⁺, or H⁺ (1). MelB is a member of the large family of Na⁺-solute symporters that is predicted to consist of 12 transmembrane α -helices with the N and C termini located in the cytoplasm (2–4). More direct evidence for the 12 transmembrane motif has been recently obtained upon 2D crystallization of MelB (5). Several works have allowed the determination of two regions responsible for cation binding and sugar binding, respectively. The cationic binding site appears to be located in the NH₂-terminal domain of the permease (6–8), whereas the sugar-binding site seems to be lined by the C-terminal helices IX and X (9, 10). Site-directed mutagenesis has also been used to identify other important residues for binding

and transport (7, 11–16). In this way, it has been hypothesized that at least two loops are involved in the cotransport mechanism. Gwizdek et al. (4) showed that loop 4–5 is near or is a part of the cation-binding site, and a role for helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites has been hypothesized (17). The highly conserved loop 10–11 containing several Asp and Glu residues has been implicated in the sugar binding/translocation (18). Similarly, cysteine-scanning mutagenesis has given a rough picture about the relative positions of some helices (19, 20).

In this work we further investigated conformational changes involved in substrate binding and translocation aiming at learning, among other aspects, how the cosubstrate binding increases the melibiose affinity and how both substrates are translocated and released. The first demonstration of substrate-induced changes of MelB conformation was obtained by monitoring the fluorescence of tryptophan residues (9, 21). In those works, it was pointed out that the changes in permease fluorescence reflect conformational changes occurring upon the formation of ternary sugar/cation/permease complexes. Furthermore, the analysis of fluorescence resonance energy transfer allowed the characterization of cooperative changes of the structure of the sugar-binding site or of its immediate vicinity induced by ion binding (10, 22).

Later on, analysis of MelB secondary structure by deconvoluted Fourier transform infrared (FTIR) spectra indicated the presence of conformational changes upon substrate binding (23). This was corroborated by substrate-induced

[†] This work was supported by Grants Bio4-CT97-2119 from the European Commission (to G.L. and E.P.), Picasso 98127 (to G.L.), BMC2003-04941 from the Direcció General de Investigació (MICYT) and 1999SGR-0102 from the Direcció General de Recerca, DURSI (to E.P.).

* Corresponding author. E-mail: esteve.padros@uab.es. Phone: 935811870. Fax: 935811907.

[‡] Universitat Autònoma de Barcelona.

[§] Université de Nice Sophia-Antipolis.

¹ Abbreviations: MelB, melibiose permease; mel, melibiose (6-*O*- α -galactopyranosyl-D-glucose); ATR, attenuated total reflection; FTIR, Fourier transform infrared; Na⁺·MelB, the complex formed by the melibiose permease and bound Na⁺; Li⁺·MelB, the complex formed by the melibiose permease and bound Li⁺; mel·Na⁺·MelB, the complex formed by the melibiose permease and bound Na⁺ and melibiose; mel·Li⁺·MelB, the complex formed by the melibiose permease and bound Li⁺ and melibiose.

variations in the amount and the rate of proton/deuterium exchange (24). We have now chosen FTIR difference spectroscopy as a powerful and sensitive method to detect not only subtle conformational changes in the protein induced by substrate binding and translocation but also changes in the protonation state of ionizable side chains (25, 26).

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation and Data Acquisition. MelB production and purification and preparation of MelB proteoliposomes were carried out as described (24). A sample of 20 μL of a proteoliposome suspension (about 150 μg of protein) was spread homogeneously on a germanium ATR crystal ($50 \times 10 \times 2$ mm, Harrick, Ossining, NY, yielding 12 internal reflections at the sample side) and dried under a stream of nitrogen. The substrate-containing buffer and the reference buffer (containing or not MelB substrates) were alternatively perfused over the proteoliposome film at a rate of ≈ 1.5 mL/min. The film was exposed to the substrate-containing buffer for 4 min and washed with the reference buffer for 10 min (15 min when the substrate-containing buffer had 50 mM melibiose). The switch of buffers was carried out by a computer-controlled electro valve. For each cycle, 500 scans at a resolution of 4 cm^{-1} were recorded and a total of 50 spectra were taken and averaged in order to increase the signal-to-noise ratio, i.e., a total of 25000 scans for every difference spectrum. Each experiment took about 10 h to be completed, and a minimum of two separate experiments using newly prepared films were done for each condition. Spectra were recorded with a FTS6000 Bio-Rad spectrometer, equipped with a mercury-cadmium-telluride detector. Sample temperature was adjusted to 20°C using a cover jack placed over the ATR crystal and connected to a circulating thermostatic bath. The cover jack temperature was controlled with a fitted external probe.

Data Corrections. The experimental difference spectrum contains four possible contributions: (i) sample (protein and lipid) difference spectrum induced by the substrate(s); (ii) water difference spectrum induced by the substrate(s) (27); (iii) absorbance of the substrate(s) (in our case melibiose or saccharose, since the cations do not absorb); (iv) change in the swelling of the film, with an apparent gain/loss of water with a concomitant apparent loss/gain of sample (protein and lipid). The latter contribution was corrected by subtracting, from the experimental difference spectrum, an absorption spectrum of MelB proteoliposomes in the substrate-containing buffer. The subtraction factor used was that able to remove the lipid CH_2 bands at 2920 and 2850 cm^{-1} . Contributions ii and iii were corrected subtracting from the experimental difference spectrum a difference between the substrate-containing buffer and the reference buffer. The subtraction factor was adjusted to flatten the water band between 3700 and 2800 cm^{-1} and to remove bands coming from the substrates (melibiose and saccharose give an intense band at 1080 cm^{-1} , whereas cations give no bands).

Controls. Sample losses, temperature changes, or spectrometer instabilities can generate by their own fictitious bands in difference spectra. To evaluate these possible problems, we obtained differences for MelB films using the same buffer in both containers. No signal was observed in the difference spectrum, demonstrating the reliability of the

experimental setup. Another control was to check that *E. coli* lipids do not produce difference spectra upon cation and/or melibiose interaction by their own. To this end, a film of *E. coli* lipids was spread on the germanium crystal, dried, and perfused with the corresponding buffers. After corrections, no bands were observed in the difference spectrum. Finally, to ascertain if the time exposure of the proteoliposome film to the substrate-containing buffer and posterior washing with buffer alone was long enough, the film was exposed to the substrate-containing buffer for 3, 10, 20, or 30 min and cleaned for 30 min with the reference buffer. No changes were observed between these differences, except for small perturbations in the baseline at the amide II region for longer time exposures.

Spectra Deconvolution. Deconvolution by the maximum entropy method was applied to difference spectra to resolve overlapped bands. Deconvolution strongly enhances the noise in the data. Therefore, for being applicable to real data, deconvolution must operate with some noise suppression. The most habitually used deconvolution method is Fourier deconvolution (FD), which discriminates between signal (noiseless data) and noise only on the basis of their frequency. This approach has two important limitations: (i) a frequency cut-point should be selected, making the result rather arbitrary; (ii) for some frequencies, signal and noise contributions are both significant, so we either dismiss available true signal or include important noise in the deconvolution result. Therefore, in FD we are constrained to obtain less narrowing and more noise enhancement than it is possible. On the other hand, maximum entropy deconvolution (MaxEntD) follows another approach for the discrimination of noise and signal. Signal is discriminated from noise on the basis of its property for describing the data while keeping the deconvolution solution simple, whereas noise does not. Data description is measured by chi-square function, whereas solution simplicity is measured by some entropy expression. In this way, we obtain the simplest deconvolution solution that is consistent with the data. It has been shown that MaxEntD outperforms FD, especially at low signal-to-noise conditions. Recently, we have introduced a new entropy expression that is particularly suited for the deconvolution of difference spectra (28). Deconvolution was performed using a Lorentzian band of 7 cm^{-1} width. This value was determined from the spectra as described (29). For the maximum entropy deconvolution, the same regularization parameter was used for all spectra. Its value was derived in accordance with the spectral noise content (28).

RESULTS

Na^+ and Li^+ Binding. Transport of melibiose by MelB can be coupled to Na^+ , Li^+ , or H^+ cotransport (11). Therefore, we first examined the changes induced by binding of the coupling ions Na^+ or Li^+ , with reference to MelB with H^+ bound. Figure 1A shows the absorbance spectra of a film of MelB reconstituted with *E. coli* lipids, recorded in the presence and absence of Na^+ . At first sight, the spectra are indistinguishable. Hence the difference spectrum $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ was computed (Figure 1B). The difference spectrum was found to be specific for interaction of the cotransported ion with the transporter, as neither addition of Ca^{2+} to MelB proteoliposomes nor Na^+ interaction with

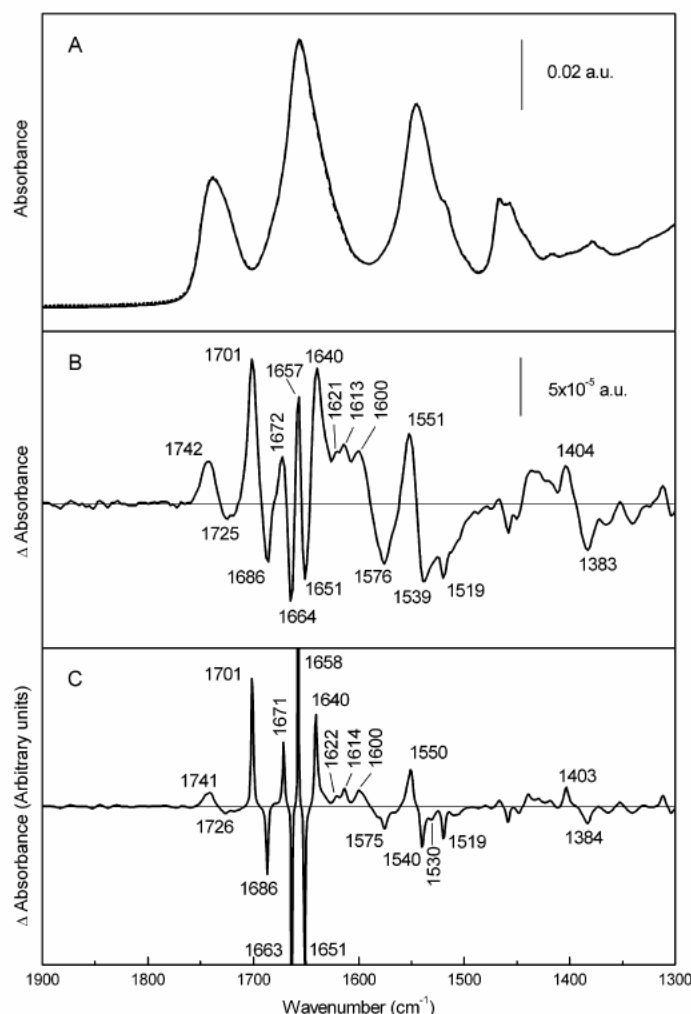


FIGURE 1: Absorption and difference spectra of $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ and $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$. (A) ATR-FTIR absorption spectra of a rehydrated film of MelB in NaCl 10 mM, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6.6 ($\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$, continuous black trace) or in 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6.6 ($\text{H}^+\cdot\text{MelB}$, dashed gray trace), after buffer subtraction. A total of 25000 scans at a resolution of 4 cm^{-1} were averaged for each spectrum. (B) Difference between the spectra $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ and $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ shown in panel A. (C) Deconvoluted spectrum of the difference shown in panel B.

a film of *E. coli* lipids alone produced significant spectral differences (data not shown). Although the majority of peaks in the difference spectrum of Figure 1B appear sufficiently narrow to presume that no overlapping between the peaks exists, the difference spectrum was deconvoluted to ensure that no band was overlooked, especially in the region $1640\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (Figure 1C). The signal-to-noise ratio of the difference spectra is sufficiently high to admit deconvolution by the maximum entropy method (28), as evidenced by the low noise level above 1750 cm^{-1} . Fourier deconvolution gave similar spectra, albeit with higher noise (not shown). On the other hand, it should be noted that, since narrow bands are favored by deconvolution, broad bands are less prominent in the deconvoluted spectrum (e.g. the band at 1740 cm^{-1}). All deconvoluted difference spectra described in this work were highly reproducible.

Some peaks may reflect changes in the secondary structure whereas others may be due to changes in residue side chains. Additionally, there may be a likely lipid contribution to the spectral changes around 1740 cm^{-1} or below 1500 cm^{-1} that, for the sake of space, we will not consider. In the amide I region ($1700\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$), large peaks are detected at 1658 and 1651 cm^{-1} , i.e. at the level of absorbance signals previously attributed to 2 distinct types of helical structures (type I and II, respectively (23)). It is striking that the two different helix signals vary in opposite directions (1658 (+); 1651 cm^{-1} (-)). The peak at 1640 cm^{-1} (+) may correspond to changes of β -sheet signal (23) whereas the intense peak at 1701 cm^{-1} (+) (30) and that at 1686 cm^{-1} (-) may reflect changes in the environment of reverse turns (23). Interpretation of the peak at 1663 cm^{-1} (-) is more difficult, as this position may correspond to signal variation arising either

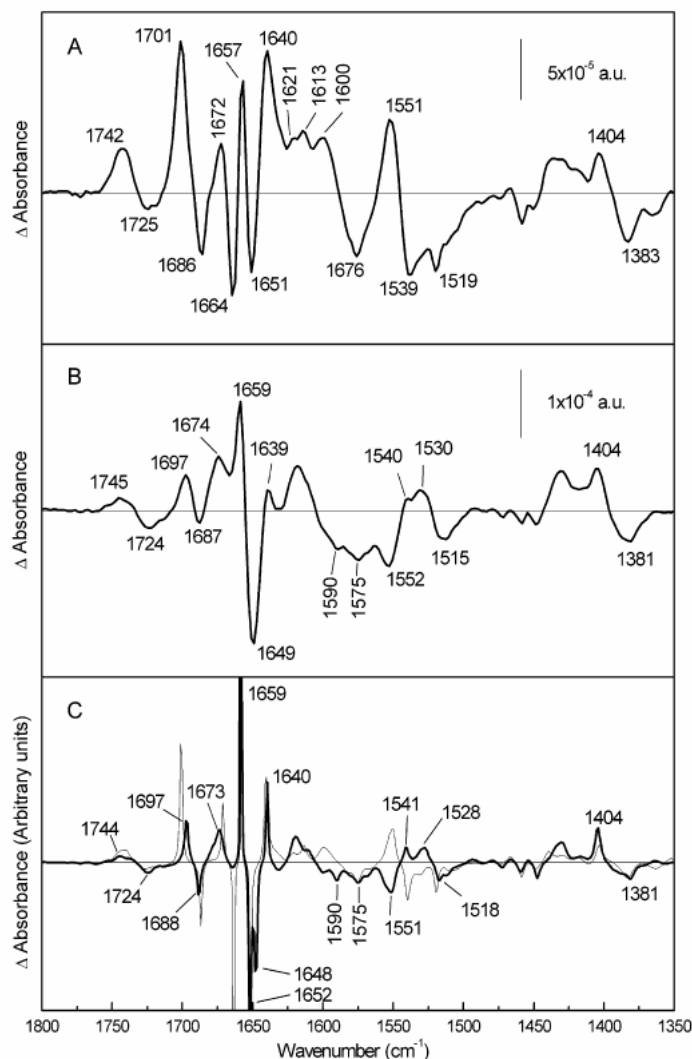


FIGURE 2: Difference spectra between cation·MelB and H⁺·MelB. (A) Spectrum of the difference between Na⁺·MelB and H⁺·MelB shown in Figure 1B. (B) ATR-FTIR difference spectrum of a film of MelB in 10 mM LiCl, 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6.6, minus the film in 20 mM MES, 110 mM KCl, pH 6.6. A total of 25000 scans at a resolution of 4 cm⁻¹ were averaged and subtracted. (C) Thick line: Deconvoluted spectrum of the difference between Li⁺·MelB and H⁺·MelB shown in panel B. Thin line: Deconvoluted spectrum of the difference between Na⁺·MelB and H⁺·MelB, shown in Figure 1C.

from α -helix or from loops (31). An additional indication of Na⁺-induced change in MelB secondary structure is given by the appearance of the pair of peaks at 1550 (+) and 1540 cm⁻¹ (-) in the amide II region (26). Of particular interest is to note that other spectral peaks suggest changes in the protonation state and/or environment of MelB acidic residues as well as change in the contribution of other side chain residues (32). Thus, the peaks at 1403 (+, COO⁻ symmetric vibrations) and 1726 cm⁻¹ (-, COOH stretching) can be due to deprotonation of carboxylic acids, while that at 1701 cm⁻¹ may also contain contribution from protonation of other carboxylic side chains (33). However, the two pair of peaks at 1403 (+)/1384 cm⁻¹ (-) and at 1741(+)/1726 (-) cm⁻¹ may indicate changes in the environment of deprotonated and protonated carboxylic acids, respectively (32). One may note that perturbations of lipid esters interacting with the

protein may well contribute the peak at 1741 cm⁻¹ (+) (34). In addition to these changes, the possibility that Na⁺ binding induces changes in Tyr side chain signal is suggested by the negative peak at 1519 cm⁻¹, whereas changes in Arg side chain may give rise to the peak at 1671 cm⁻¹ (26, 32). More ambiguous are the small peaks at 1622 and 1614 cm⁻¹ which might be a mixture of changes in the properties of Asn, Gln, Trp, or Tyr side chains (32) and of MelB β -sheet components.

Figure 2 shows the difference and the corresponding deconvoluted spectra induced by Li⁺ binding, and their comparison to those induced by Na⁺ binding. It is apparent that the changes produced by Li⁺ binding partly differ from those of Na⁺ binding. According to Figure 2C, some peaks have similar position and sign in both Na⁺- and Li⁺-difference spectra, namely those at 1688(-), 1673(+), 1659-

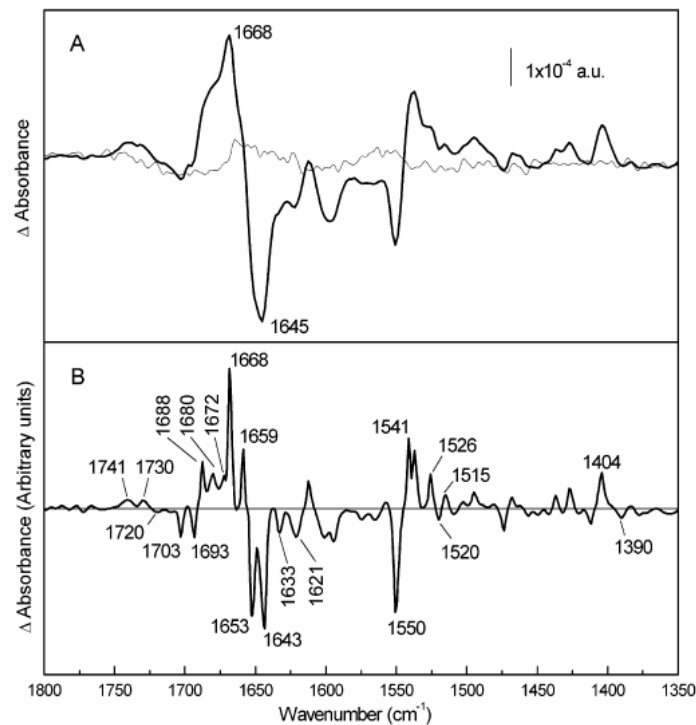


FIGURE 3: Difference spectrum between $\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ and $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$. (A) Thick line: ATR-FTIR difference spectrum of a film of MelB in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM melibiose, pH 6.6, minus the film in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, pH 6.6. Thin line: ATR-FTIR difference spectrum of a film of MelB in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM saccharose, pH 6.6, minus the film in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM NaCl. This spectrum shows a decreased signal-to-noise ratio because only 12000 scans were accumulated. (B) Deconvoluted spectrum of the difference between $\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ and $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ shown in panel A.

(+), 1652(-), and 1640 (+) cm^{-1} . In contrast, the positive peak at 1701(+) cm^{-1} in the Na^+ -induced spectrum is replaced by a peak at 1697 (+) cm^{-1} in the Li^+ -induced spectrum. The negative peak at 1663 cm^{-1} of the Na^+ spectrum does not have a correspondence in the Li^+ spectrum, whereas the negative peak at 1648 cm^{-1} induced by Li^+ is not seen in the Na^+ spectrum. In the amide II region, the difference spectra are noticeably at variance. Na^+ or Li^+ binding induces similar peaks at 1575 (-) and 1518 cm^{-1} (-), but the rest of the peaks have no correspondence; moreover, most of them appear to be of opposite sign, as those at 1600 (+), 1550 (+), 1540 (-), and 1530 cm^{-1} (-) for Na^+ ; and 1590 (-), 1551 (-), 1541 (+), and 1528 cm^{-1} (+) for Li^+ . These latter spectral variations illustrate that Na^+ and Li^+ binding may affect differently the structure of the transporter.

Melibiose Interaction in the Presence of Na^+ . After cation binding, the next step in the MelB transport cycle is melibiose binding (35). However, as substrate translocation occurs when both cosubstrates are bound to melB, the difference spectrum $\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ presented in Figure 3A (black trace) reflects not only events associated with sugar binding but also those linked to cosubstrate translocation. Possible unspecific contributions of sugar binding can be discarded as (i) saccharose, that is not a substrate of MelB, does not elicit the appearance of spectral peaks (Figure 3A, gray trace), and (ii) the difference spectrum obtained using the alternative substrate β -galactoside instead of melibiose was very similar to that of melibiose (data not shown).

Figure 3A (black trace) shows the melibiose-induced difference spectrum ($\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$) together with its deconvolution (Figure 3B). The signal variations appear more intense than those elicited by Na^+ or Li^+ binding, suggesting that melibiose induces greater conformational changes than binding of cation alone. Several peaks are observed, again reflecting changes in both the secondary structure and amino acid side chains of the transporter. The peaks centered at 1659 (+) and 1653 cm^{-1} (-), as in the $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ spectrum, suggest changes in α -helix signals. Therefore, even if these structures already change upon Na^+ binding, melibiose binding/substrate translocation produces additional changes. The main peak at 1668 cm^{-1} (+), not seen in the difference spectrum due to Na^+ binding, is expected to reflect changes in turns or in open loop signals. The peak centered at 1643 cm^{-1} (-), resolved by deconvolution, is of difficult assessment (β -sheets, 3_{10} helices or open loops; see ref 23). Bands appearing at 1680 (+) and 1672 (+) cm^{-1} may correspond to Gln, Asn, or Arg side chains (31, 32, 36). The other bands in the amide I region may correspond to changes in β -sheets or in side chains (1693 (-), 1633 (-), 1621 (-) cm^{-1}) (32, 37) and turns (1688 (+), 1703(-) cm^{-1}) (30). In the amide II, the principal peaks are consistent with the assignment to helices and sheets (1550 and 1541 cm^{-1} , respectively) (38). Another band at 1526 cm^{-1} (+) could be assigned to perturbation of lysine side chains (37) whereas that at 1515 cm^{-1} may be due to Tyr residues. On comparing the difference spectrum induced by melibiose with that induced by Na^+ , it is worth noting that

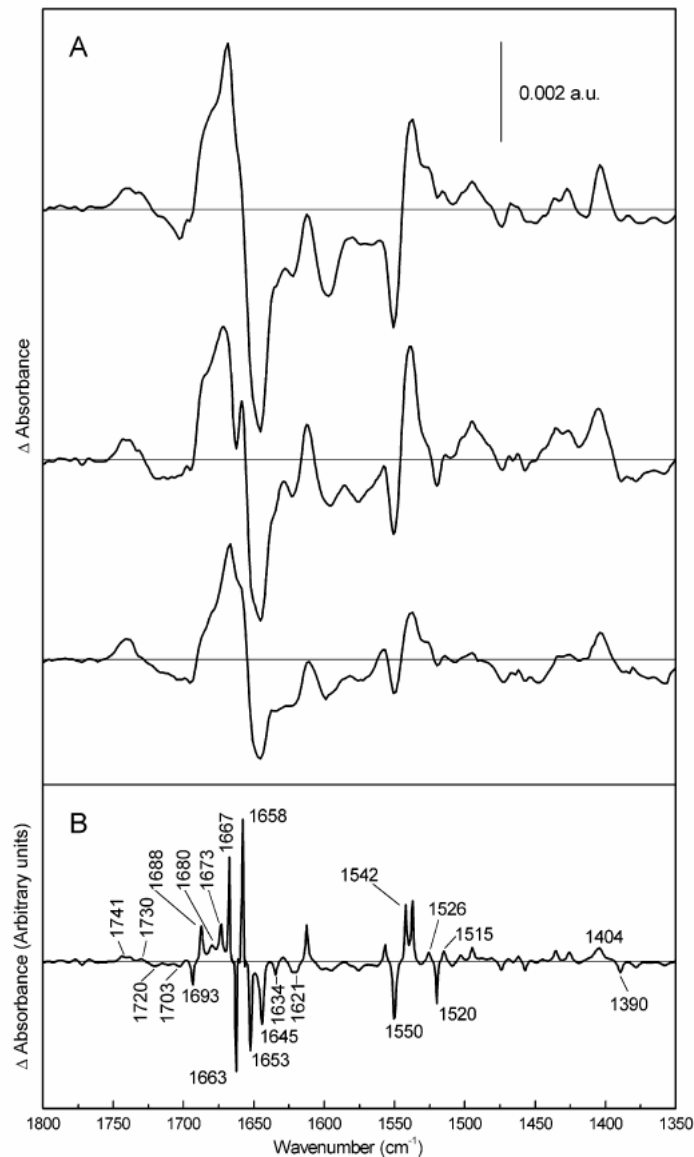


FIGURE 4: Difference spectra of melibiose binding in the presence of cations. (A) Top: Spectrum of the difference between mel·Na⁺·MelB and Na⁺·MelB shown in Figure 3A. Middle: ATR-FTIR difference spectrum of a film of MelB in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, 10 mM melibiose, pH 6.6, minus the film in 20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM LiCl, pH 6.6. Bottom: ATR-FTIR difference spectrum of a film of MelB in 20 mM MES, 100 mM KCl, 50 mM melibiose, pH 6.6, minus the film in 20 mM MES, 100 mM KCl, pH 6.6. (B) Deconvoluted spectrum of the difference between mel·Li⁺·MelB and Li⁺·MelB shown in panel A, middle.

several bands in both amide I and II regions that are located at similar wavenumbers have opposite signs (peaks at 1703, 1688, 1550, and 1541 cm⁻¹ of the Na⁺·melibiose difference spectrum). This suggests that the changes of these structures produced by Na⁺ binding are reversed by melibiose binding/substrate translocation.

As in the spectrum of Na⁺ binding, a positive peak at 1404 cm⁻¹ is observed, which can be due to deprotonation of carboxylic acids. This peak, or at least part of it, taken together with the negative peak at 1390 cm⁻¹, may indicate a change in the environment of a deprotonated carboxylic acid (32). Above 1700 cm⁻¹, there are two positive peaks

well above the noise at 1741 and 1730 cm⁻¹. As in the case of Na⁺-induced spectrum, it seems plausible that these peaks correspond to protonation of Asp or Glu side chains.

Melibiose Interaction in the Presence of Li⁺ or H⁺. Figure 4A shows the difference spectra induced by melibiose interaction in the presence of either Na⁺, Li⁺, or H⁺. The 3 spectra reveal a rough similarity, indicating that the conformational changes induced by melibiose binding/substrates translocation are comparable, irrespective of the bound cation. However, specific variations are worth noting. Figure 4A (middle trace) shows the difference spectrum mel·Li⁺·MelB vs Li⁺·MelB. In the corresponding deconvoluted

difference spectrum (Figure 4B), a negative band centered at 1663 cm^{-1} is clearly seen that does not appear in the difference spectrum caused by melibiose in the presence of either H^+ or Na^+ , nor in the difference spectrum due to Li^+ binding. This peak is an indication of distinct conformational changes triggered by melibiose interaction in the presence of Li^+ , as compared to melibiose interaction in the presence of Na^+ . Other differences are the peak at 1703 cm^{-1} , that has lower intensity in the $\text{mel}\cdot\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Li}^+\cdot\text{MelB}$, and the peak at 1520 cm^{-1} in the amide II, that is less intense in the $\text{mel}\cdot\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ vs $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ spectrum.

DISCUSSION

In agreement with our preliminary FTIR spectroscopy observation suggesting substrate-induced change in the absorbance of MelB (23), the infrared difference spectral analysis carried out in this work shows multiple and discrete absorbance changes (in the range $1740\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) of the MelB transporter associated with binding of the cosubstrates and/or with their transport. Taking data from the literature (38) and from previous FTIR studies on MelB (23), some of the sharp peaks observed at specific wavenumbers were assigned to conformational changes occurring at the level of the major structural components of MelB (α -helices, β -sheets, turns). The data also reveal substrate-induced changes in side chain properties of some acidic and tyrosyl residues, in particular.

To better appreciate the importance of these discrete absorbance changes, it is useful to relate them to the different kinetic intermediates included in the 6-state model which satisfactorily describe the major kinetic properties of MelB and which rely on the postulate of an alternating access to the substrate binding sites (11, 35). Briefly summarized, upon addition of Na^+ (or Li^+) at saturating concentration, cation binding gives rise to cation-MelB species at the expense of preexisting $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ ones (35). As MelB does not transport the coupling ion in the absence of sugar, the cation-MelB species should predominate and be mostly outwardly oriented. In the presence of melibiose and either H^+ or Na^+ or Li^+ , MelB cycles through six conformational intermediates assumed in its transport (35), partly outwardly or inwardly oriented. As the concentration of each cosubstrate is saturating, most of the transporters have both substrates bound ($\text{mel}\cdot\text{cation}\cdot\text{MelB}$ species) and in the two orientations. Therefore, the melibiose-induced difference spectrum most likely monitors the conformational changes resulting from sugar binding (in the presence of bound cation) merged with a certain percentage of translocation of the ternary complex.

Changes Induced by Na^+ or Li^+ Binding. Binding of Na^+ to MelB produces a set of positive and negative peaks in the amide I and II regions, that are due to changes in secondary and tertiary structures, as well as to changes in the environment or in the protonation state of some side chains. Most of the peaks can be assigned to changes of several kinds of secondary structures that produce shifts in the corresponding absorption bands, giving rise to pairs of contiguous positive/negative peaks in the difference spectrum. For this reason, significant conversion of a type of secondary structure to a different type does not seem to exist.

Changes in α -helices are indicated by the peaks at 1658 (+) and 1651 cm^{-1} (-). This is in keeping with the previous

description of two types of α -helices absorbing at 1660 and 1653 cm^{-1} (23). It was already noted that incubation of MelB with the substrate Na^+ induced small changes in the deconvoluted bands corresponding to these helices (23). Because the two peaks of the difference spectrum have different sign, a possibility exists that there is an interconversion between the helices absorbing at 1651 and at 1658 cm^{-1} . A second possibility is that these peaks are due to opposite changes in helix orientation. As the proteoliposomes have a net orientation in the film, change of helical orientation will change the intensity of the helical band (39).

Of interest is the positive peak at 1403 cm^{-1} , that can be due to the COO^- group of Glu or Asp side chains, i.e., to a deprotonation of these group(s). Because it is accompanied by a contiguous negative peak at 1384 cm^{-1} , it can instead correspond to a change in the environment of an already deprotonated group. Deprotonation of a carboxylate group is also suggested by the appearance of a small negative peak at 1726 cm^{-1} . In this region, the peak at 1741 cm^{-1} may correspond to lipid ester carbonyl groups, but a carboxyl protonation can also contribute in this wavenumber. It is even possible that both contribute, the resulting peak being a mixture of both (see Figure 1B as an example). If this is the case, then the peak at 1741 cm^{-1} or part of it (meaning appearance of a protonated carboxyl group) could have its counterpart in the negative peak at 1384 cm^{-1} (meaning disappearance of a deprotonated group). In any case, the peaks corresponding to carboxylic groups are of great interest because it has been previously shown that several Asp and Glu side chains are required for Na^+ binding and melibiose transport (7, 18, 40). Furthermore, bands near 1671 cm^{-1} may be assigned to Arg side chain. This would agree with the proposed existence of salt bridges near the ion binding site, such as the ones between Arg52 and Asp19 or Asp55 or Lys 377 and Asp 59 (41). Future work with MelB mutants will be necessary in order to identify the individual amino acid(s) causing these peaks.

As described in the Results, Li^+ binding also induces a typical difference spectrum that partly differs from that induced by Na^+ binding. From studies on the kinetics of substrate translocation (11), it was suggested that the complexes involving melibiose and Li^+ are more stable than those involving melibiose and Na^+ . The variations in the respective difference spectra induced by the binding of each of these two cations may reflect this fact.

Changes Induced by Melibiose Interaction. The difference spectra induced by melibiose incubation in the presence of Na^+ , Li^+ , or H^+ are comparable (see Figure 4), indicating that the protein changes induced by melibiose binding/substrates translocation are roughly similar in the three conditions. However, some dissimilarities do exist that should reflect the different kinetic properties of melibiose binding/transport under a Na^+ , Li^+ , or H^+ gradient (42). On the other hand, the sugar-induced difference spectra show an amplitude about three times larger than those observed upon binding of Na^+ or Li^+ alone, demonstrating that the changes induced by melibiose interaction are proportionally larger than the ion-induced ones. This conclusion is consistent with the previous observation of a greater protection against hydrogen/deuterium exchange by melibiose than by Na^+ ions (24). When relating these results to the six-state model for transport it seems logical in terms of the conformational changes

FTIR Difference Spectra of Melibiose Permease

inherent to the transport process. In the first step, binding of the cation should give rise to (relatively small) conformational changes that will increase the affinity of the transporter for the sugar. In the second step, binding of the sugar will lead to bigger conformational changes, as the transporter should switch its aperture from the extracellular to the cytoplasmic space. This mechanism most probably includes a variety of conformational changes but also helical tilting. In fact, changes in the orientation of helices have been described or suggested during the switching mechanism of the bacterial oxalate transporter OxIT (43) and for the lactose permease (44). These changes in orientation may not necessarily encompass the full length of helices, but may be in some cases restricted to part of them (43). On the other hand, the switching mechanism for MelB may also involve the movement of one putative reentrant loop (loop 10–11 (45)) or one putative mobile loop (loop 4–5 (16)). This would produce peaks in the difference spectra due to changes in environment and/or protonation changes of carboxylic side chains present in these loops.

Among the peaks produced by melibiose, those at 1404/1390 cm^{-1} and 1741, 1729/1720 cm^{-1} may indicate protonation/deprotonation reactions and/or changes in the environment of carboxylic groups, as pointed out in Results. Therefore, while Na^+ or Li^+ binding already originates protonation/deprotonation and/or environmental changes of Asp or Glu side chains, melibiose binding/substrate translocation produces additional changes of the same or different carboxyl groups. Here, it can be recalled that cation binding is affected by acidic residues located on helices II–IV (7) whereas sugar binding/translocation depends on acidic residues on loops 4–5 and 10–11 (45, 46). Therefore, one is tempted to relate the peaks in the cation-induced difference spectra to carboxylic side chains on helices II–IV and those due to sugar binding to acidic side chains located on the major loops 4–5 and 10–11. It could also happen that some acidic side chains perturbed by cation binding suffer additional changes induced by sugar binding/translocation. Moreover, as already pointed out above, peaks observed around 1672 cm^{-1} may be due to Arg side chains. The proposed salt bridges between Arg52 with Asp19 and Asp55 or Asp59 and Lys377 could break during the catalytic mechanism (41), thus giving rise to peaks in the difference spectrum. Arg141 is another side chain important for melibiose translocation (16) that may become altered and produce peaks.

A positive peak at 1515 cm^{-1} , that can be attributed to Tyr side chains, appears in all difference spectra induced by melibiose, whereas cation binding produces negative peaks at 1518–1519 cm^{-1} that could also be attributed to Tyr side chains. This is in keeping with site-directed mutagenesis studies showing alterations in substrate binding/transport on mutation of some Tyr side chains (13). As has been previously suggested, the putative cationic binding site contains several Tyr that may participate directly or indirectly in the binding of cations (13).

Despite the mentioned particularities, it is of interest to stress the close similarity of the difference spectra induced by melibiose incubation in the presence of either coupling ion. This indicates that the fundamental trends inherent to the mechanism of binding and cotransport of melibiose and any of the coupling ions remain very similar. Taken together,

Biochemistry, Vol. 44, No. 9, 2005 3513

the data presented in this work provide evidence for conformational changes characteristic of some steps of the transport cycle of the MelB permease. These comprise cation binding and sugar binding/substrate translocation. On the basis of these results, future work aimed at the identification of the peaks in the difference spectra, using in particular MelB mutants and/or studies in D_2O , should provide clues about the molecular mechanism of ion-coupled sugar symport.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Natàlia Dave for helpful discussions and suggestions.

REFERENCES

- Cohn, D. E., and Kaback, H. R. (1980) Mechanism of the melibiose porter in membrane vesicles of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 19, 4237–4243.
- Botfield, M. C., and Wilson, T. H. (1989) Peptide-specific antibody for the melibiose carrier of *Escherichia coli* localizes the carboxyl terminus to the cytoplasmic face of the membrane, *J. Biol. Chem.* 264, 11649–11652.
- Pourcher, T., Bibi, E., Kaback, H. R., and Leblanc, G. (1996) Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis, *Biochemistry* 35, 4161–4168.
- Gwizdek, C., Leblanc, G., and Bassilana, M. (1997) Proteolytic mapping and substrate protection of the *Escherichia coli* melibiose permease, *Biochemistry* 36, 8522–8529.
- Hacksell, I., Rigaud, J. L., Purhonen, P., Pourcher, T., Hebert, H., and Leblanc, G. (2002) Projection structure at 8 Å resolution of the melibiose permease, an Na-sugar co-transporter from *Escherichia coli*, *EMBO J.* 21, 3569–3574.
- Hama, H., and Wilson, T. H. (1993) Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The amino-terminal portion is crucial for Na^+ recognition in melibiose transport, *J. Biol. Chem.* 268, 10060–10065.
- Pourcher, T., Zani, M. L., and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. I. Effect on Na^+ -dependent transport and binding properties, *J. Biol. Chem.* 268, 3209–3215.
- Wilson, D. M., and Wilson, T. H. (1992) Asp-51 and Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier, *J. Bacteriol.* 174, 3083–3086.
- Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1996) Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of cosubstrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses, *Biochemistry* 35, 12053–12060.
- Cordat, E., Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer. II. Identification of the tryptophan residues acting as energy donors, *J. Biol. Chem.* 273, 33198–33202.
- Pourcher, T., Bassilana, M., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., and Leblanc, G. (1990) The melibiose/ Na^+ symporter of *Escherichia coli*: kinetic and molecular properties, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* 326, 411–423.
- Pourcher, T., Deckert, M., Bassilana, M., and Leblanc, G. (1991) Melibiose permease of *Escherichia coli*: mutation of aspartic acid 55 in putative helix II abolishes activation of sugar binding by Na^+ ions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1176–1181.
- Zani, M. L., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1994) Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH₂-terminal domains of the melibiose permease of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 269, 24883–24889.
- Franco, P. J., and Wilson, T. H. (1996) Alteration of Na^+ -coupled transport in site-directed mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1282, 240–248.
- Hastings Wilson, T., and Wilson, D. M. (1998) Evidence for a close association between helix IV and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1374, 77–82.

16. Abdel-Dayem, M., Basquin, C., Pourcher, T., Cordat, E., and Leblanc, G. (2003) Cytoplasmic loop connecting helices IV and V of the melibiose permease from *Escherichia coli* is involved in the process of Na⁺-coupled sugar translocation, *J. Biol. Chem.* 278, 1518–1524.
17. Cordat, E., Leblanc, G., and Mus-Veteau, I. (2000) Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of *Escherichia coli* melibiose permease, *Biochemistry* 39, 4493–4499.
18. Ding, P. Z. (2003) An investigation of cysteine mutants on the cytoplasmic loop X/XI in the melibiose transporter of *Escherichia coli* by using thiol reagents: implication of structural conservation of charged residues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 864–869.
19. Ding, P. Z., and Wilson, T. H. (2000) The melibiose carrier of *Escherichia coli*: cysteine substitutions for individual residues in helix XI, *J. Membr. Biol.* 174, 135–140.
20. Ding, P. Z., Weissborn, A. C., and Wilson, T. H. (2001) Cysteine substitutions for individual residues in helix VI of the melibiose carrier of *Escherichia coli*, *J. Membr. Biol.* 183, 33–38.
21. Mus-Veteau, I., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1995) Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy, *Biochemistry* 34, 6775–6783.
22. Maehrel, C., Cordat, E., Mus-Veteau, I., and Leblanc, G. (1998) Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer. I. Evidence for ion-induced conformational change, *J. Biol. Chem.* 273, 33192–33197.
23. Dave, N., Troullier, A., Mus-Veteau, I., Duñach, M., Leblanc, G., and Padrós, E. (2000) Secondary structure components and properties of the melibiose permease from *Escherichia coli*: a Fourier transform infrared spectroscopy analysis, *Biophys. J.* 79, 747–755.
24. Dave, N., Lórenz-Fonfría, V. A., Villaverde, J., Lemonnier, R., Leblanc, G., and Padrós, E. (2002) Study of amide-proton exchange of *Escherichia coli* melibiose permease by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: evidence of structure modulation by substrate binding, *J. Biol. Chem.* 277, 3380–3387.
25. Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D., and Heberle, J. (1999) In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5498–5503.
26. Baenziger, J. E., Miller, K. W., and Rothschild, K. J. (1993) Fourier transform infrared difference spectroscopy of the nicotinic acetylcholine receptor: evidence for specific protein structural changes upon desensitization, *Biochemistry* 32, 5448–5454.
27. Venyaminov, S. Y., and Kalnin, N. N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptides compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption band, *Biopolymers* 30, 1243–1257.
28. Lórenz-Fonfría, V. A., and Padrós, E. (2005) Maximum entropy deconvolution of infrared spectra: Use of a novel entropy expression without sign-restriction, *Appl. Spectrosc.*, in press.
29. Saarinen, P. E., Kauppinen, J. K., and Partanen, J. O. (1995) New method for spectral line shape fitting and critique on the Voigt line shape, *Appl. Spectrosc.* 49, 1438–1453.
30. Krimm, S., and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins, *Adv. Protein. Chem.* 3, 181–364.
31. Troullier, A., Gerwert, K., and Dupont, Y. (1996) A time-resolved Fourier transformed infrared difference spectroscopy study of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: kinetics of the high-affinity calcium binding at low temperature, *Biophys. J.* 71, 2970–2983.
32. Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141–173.
33. Furutani, Y., Kandori, H., and Shichida, Y. (2003) Structural changes in lumirhodopsin and metarhodopsin I studied by their photoreactions at 77 K, *Biochemistry* 42, 8494–8500.
34. DeGrip, W. J., Gray, D., Gillespie, J., Bovee, P. H., Van den Berg, E. M., Lugtenburg, J., and Rothschild, K. J. (1988) Photoexcitation of rhodopsin: conformation changes in the chromophore, protein and associated lipids as determined by FTIR difference spectroscopy, *Photochem. Photobiol.* 48, 497–504.
35. Bassilana, M., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1988) Melibiose permease of *Escherichia coli*. Characteristics of co-substrates release during facilitated diffusion reactions, *J. Biol. Chem.* 263, 9663–9667.
36. Baenziger, J. E., and Chew, J. P. (1997) Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor mainly involves a structural change in solvent-accessible regions of the polypeptide backbone, *Biochemistry* 36, 3617–3624.
37. von Germar, F., Barth, A., and Mäntele, W. (2000) Structural changes of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase upon nucleotide binding studied by fourier transform infrared spectroscopy, *Biophys. J.* 78, 1531–1540.
38. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds, *Subcell. Biochem.* 23, 329–362.
39. Marsh, D. (1999) Quantitation of secondary structure in ATR infrared spectroscopy, *Biophys. J.* 77, 2630–2637.
40. Zani, M. L., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties, *J. Biol. Chem.* 268, 3216–3221.
41. Franco, P. J., and Wilson, T. H. (1999) Arg-52 in the melibiose carrier of *Escherichia coli* is important for cation-coupled sugar transport and participates in an intrahelical salt bridge, *J. Bacteriol.* 181, 6377–6386.
42. Bassilana, M., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1987) Facilitated diffusion properties of melibiose permease in *Escherichia coli* membrane vesicles. Release of co-substrates is rate limiting for permease cycling, *J. Biol. Chem.* 262, 16865–16870.
43. Hirai, T., and Subramaniam, S. (2004) Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter OxIT, *Biophys. J.* 87, 3600–3607.
44. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*, *Science* 301, 610–615.
45. Ding, P. Z. (2004) Loop X/XI, the largest cytoplasmic loop in the membrane-bound melibiose carrier of *Escherichia coli*, is a functional re-entrant loop, *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 106–117.
46. Sery, N. (2002) Role of cytoplasmic loops 4–5 and 10–11 in the Na⁺-symport mechanism catalyzed by the melibiose permease of *Escherichia coli*, Diploma of Advanced Studies, Nice University, France.

BI048301Z

Moltes gràcies a totes aquelles persones que en menor o major grau m'han ajudat en la realització de la meva tesi doctoral:

A l'Esteve per tots aquests anys de direcció de tesi.

A en Gérard Leblanc per la seva valuosa col·laboració.

Als meus pares que, encara que el seu ajut a la tesi ha sigut indirecta, sens dubte són els que es mereixen els màxims agraïments.

A la Raymonde Lemonnier per ensenyar-me a purificar la MeIB, però sobretot per les seves excel·lents purificacions.

A la Natàlia per ajudar-me al principi del meu doctorat amb l'infraroig i amb la MeIB.

Degut a que durant la realització de la tesi també he sigut professor associat, gràcies a totes aquelles persones que m'han ajudat a realitzar les pràctiques de laboratori: Mònica, Jose, Irene, Mireia Torres, Mireia Duñach i Pep.

A la Neus, Mercè i Elòdia per preocupar-se sempre en realitzar la seva feina el millor possible.

A en Ramon, juntament amb l'Elòdia, per la purificació de la fosfatidilcolina.

A en Manel i a en Ramon per ajudar-me amb el microfluiditzador.

A la Meritxell Granells per ajudar-me a purificar la MeIB.

A la Patrícia, Julio, Imma, Guio, David, Rosana, Alba i Anna per ajudar-me amb la biologia molecular.

A en Víctor Buzón per solucionar-me els dubtes del fluorímetre i dubtes en general i pels seus consells.

A l'Àlex per ajudar-me amb l'ordinador, l'infraroig, la biologia molecular, per solucionar-me dubtes en general i pels seus consells.

A en Víctor Lórenz per guiar-me al principi i meitat de la meva tesi, per ensenyar-me infraroig i solucionar-me els dubtes, per ensenyar-me a purificar l'Anc2p, per ensenyar-me a desconvular i tots els processos matemàtics necessaris per a la realització de la nostra feina, per solucionar-me dubtes en general i pels seus consells.