

-Tesis Doctoral-

***Influencia de la movilidad
de las hélices en la función
de la bacteriorodopsina***

Rosana Simón Vázquez

Unitat de Biofísica. Departament de Bioquímica i de
Biologia Molecular
Centre d'Estudis en Biofísica
Universitat Autònoma de Barcelona

- Febrero 2009 -

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	1
1.1.1	Descubrimiento de la Bacteriorodopsina	1
1.1.2	Evolución del estudio de la BR desde su descubrimiento hasta la actualidad	4
1.2	HALOBACTERIUM SALINARUM	13
	MEMBRANA PÚRPURA	16
1.3.1	Características	16
1.3.2	Síntesis	17
1.4	BACTERIORODOPSINA	18
1.5	RETINAL	19
1.5.1	Características	19
1.5.2	Adaptación luz-oscuridad	21
1.6	FOTOCICLO	24
1.6.1	Introducción	24
1.6.2	Intermediarios	26
1.7	LIBERACIÓN DEL PROTÓN	29
1.7.1	Acoplamiento del Asp 85 y el grupo X	29
1.7.2	Identificación del grupo X	31
1.8	FORMA AZUL Y FORMA ROJA DE LA BR	34
1.9	MOVIMIENTO DE LAS HÉLICES Y REPROTONACIÓN DE LA BASE DE SCHIFF	35
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIALES Y METODOS	40
3.1	OBTENCIÓN DE BACTERIORODOPSINAS MUTANTES	40
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO	42
3.2.1	Cepas bacterianas	42
3.2.2	Gen bop	43
3.2.3	Vectores	44
3.2.4	Medios de cultivo y antibióticos utilizados	45
3.2.5	Cultivo y conservación bacteriana	46
3.3	TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE	47
3.3.1	Mutagénesis dirigida por PCR	47
3.3.2	Manipulaciones enzimáticas	50
3.3.2.1	Digestiones con enzimas de restricción	50
3.3.2.2	Ligación del DNA	50
3.3.3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	50
3.3.4	Purificación de DNA	51
3.3.5	Competencia de células de E.coli	51

3.3.6	Transformación de células competentes de E.coli.....	52
3.3.7	Extracción del DNA plasmídico en E.coli y secuenciación	52
3.3.8	Competencia y transformación de células de H.salinarum.....	53
3.4	MANIPULACIÓN DE LA MEMBRANA PÚRPURA.....	54
3.4.1	Extracción de la membrana púrpura de H.salinarum.....	54
3.4.2	Tratamiento de los mutantes con cisteína	55
3.4.3	Determinación de la concentración y pureza de la proteína	56
3.4.3.1	Determinación de la concentración de bacteriorodopsina.....	56
3.4.3.2	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	57
3.4.4	Determinación fluorimétrica del estado de oxidación de las cisteínas	58
3.5	ESTUDIOS ESTRUCTURALES	59
3.5.1	Adaptación luz-oscuridad	59
3.5.2	Titrición de la BR frente al pH.....	61
3.5.3	Estabilidad térmica	62
3.5.3.1	Espectroscopía UV-Vis	62
3.5.3.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	62
3.6	ESTUDIOS FUNCIONALES	64
3.6.1	Determinación del bombeo de protones de la bacteriorodopsina incorporada en liposomas.....	64
3.6.2	Fotólisis de destello	67
3.6.2.1	Cinéticas de intermediarios del fotociclo.....	69
3.6.2.2	Determinación de cambios de pH del medio	70
3.6.3	Caracterización de intermediarios del fotociclo mediante FTIR	71
3.6.3.1	FTIR estático a baja temperatura	71
3.6.3.2	Estudios dinámicos del fotociclo: ss-FTIR	74
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
4.1	AUMENTO DE LA FLEXIBILIDAD DE LAS HÉLICES E Y F. OBTENCIÓN DEL MUTANTE LOOP5	76
4.1.1	Caracterización estructural del mutante Loop5	78
4.1.1.1	Adaptación luz-oscuridad.....	79
4.1.1.2	Titrición ácida.....	80
4.1.1.3	Titrición alcalina.....	81
4.1.1.4	Estabilidad térmica.....	82
	a) Espectroscopía UV-Vis	83
	b) Calorimetría diferencial de barrido.....	84
4.1.2	Caracterización funcional del mutante Loop5	85
4.1.2.1	Estudio del fotociclo mediante fotólisis de destello.....	85
4.1.2.2	Bombeo de protones.....	90
	a) En presencia de piranina.....	90
	b) Proteína incorporada en liposomas.....	91
4.1.2.3	Estudio del mutante Loop5 mediante FTIR	93
	a) FTIR estático a baja temperatura	93
	b) FTIR resuelto en el tiempo (ss-FTIR)	99
4.1.3	Discusión	107

4.2	RESTRICCIÓN DE LA MOVILIDAD DE LAS HÉLICES E-F: ESTUDIO DEL MUTANTE F153C/R175C	112
4.2.1	Obtención del mutante F153C/R175C y de los mutantes simples F153C y R175C	113
4.2.2	Caracterización del estado de oxidación de las cisteínas.....	113
4.2.3	Estudio funcional de los mutantes simples F153C y R175C.....	117
4.2.3.1	Estudio de intermediarios del fotociclo mediante fotólisis de destello	117
4.2.3.2	FTIR a baja temperatura.....	119
4.2.3.3	Bombeo de protones en presencia de piranina	122
4.2.4	Estudio del doble mutante F153C/R175C	124
4.2.4.1	Adaptación luz-oscuridad.....	124
4.2.4.2	Estabilidad térmica.....	126
	a) T_m de desnaturalización determinada mediante espectroscopia UV-Vis.....	126
	b) T_m determinada mediante DSC.....	127
4.2.4.3	Estudio de intermediarios del fotociclo.....	130
4.2.4.4	Espectros de FTIR a baja temperatura	132
4.2.4.5	Bombeo de protones.....	136
	a) Mediante el uso de piranina.....	136
	b) Proteína incorporada en liposomas.....	137
4.2.5	Discusión	140
4.3	RESTRICCIÓN DE LA MOVILIDAD DE LAS HÉLICES F-G: ESTUDIO DEL MUTANTE E166C/A228C....	145
4.3.1	Caracterización del mutante E166C/A228C reducido y oxidado mediante fluorescencia...	146
4.3.2	Adaptación luz-oscuridad	147
4.3.3	Estabilidad térmica	148
4.3.3.1	Determinada mediante espectroscopia UV-Vis	148
4.3.3.2	Calorimetría diferencial de barrido del mutante E166C/A228C oxidado	149
4.3.4	Estudio de intermediarios del fotociclo	150
4.3.5	FTIR a baja temperatura	151
4.3.6	Bombeo de protones	153
4.3.6.1	En presencia de piranina	153
4.3.6.2	Proteína incorporada en liposomas	154
4.3.7	Discusión	156
5	DISCUSIÓN GENERAL	159
6	CONCLUSIONES	168
7	BIBLIOGRAFÍA	171

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción histórica

1.1.1 Descubrimiento de la Bacteriorodopsina

La presencia de vida en ambientes extremos ha sido siempre una temática de gran interés en la comunidad científica. Entre estos ambientes se encuentran los entornos hipersalinos, como son las salinas o lagos salados, donde la vida es prácticamente imposible debido a la extrema toxicidad de las sales a tan elevadas concentraciones. La observación del color rojo-púrpura que presentan algunos de estos hábitats (figura 1.1) se asoció, al principio de los años 60, con la presencia, entre otros, de la arqueobacteria halófila *Halobacterium salinarum*. El origen de su coloración y su capacidad de supervivencia en condiciones tan extremas generó un gran interés en la comunidad científica.



Figura 1.1. Fotografía de un lago salino habitado por *Halobacterium salinarum* con el característico color púrpura debido a la bacteriorodopsina.

Al aislar *H.salinarum* el primer hecho que se observó fue que al poner la bacteria en agua destilada se producía la disgregación de las células como consecuencia de un choque osmótico. La fragmentación de la membrana celular de la bacteria dio lugar a fragmentos de membrana diferenciados de la membrana citoplasmática que, debido a que presentan una coloración púrpura, se denominó membrana púrpura (MP). Se descubrió que la MP estaba constituida por una única proteína transmembrana y que tenía una molécula de retinal unida (Oesterhelt et al., 1971).

Al analizar en más profundidad la membrana púrpura se comprobó que tenía un máximo de absorbancia en el visible de 560 nm. Este máximo variaba cuando la MP era iluminada con diferentes longitudes de onda, intuyendo que la proteína podía actuar como fotorreceptor. Este comportamiento junto con el hecho de que la proteína tuviera una molécula de retinal unida, hacían que la proteína de la MP tuviera mucha similitud con la rodopsina visual. Es por este motivo que a esta proteína se la llamó Bacteriorodopsina (BR) (Oesterhelt et al., 1971).

Estudios más detallados revelaron que la iluminación de la bacteriorodopsina daba lugar al cambio reversible de absorbancia desde 560 a 415 nm (Oesterhelt et al., 1973). Se comprobó que este hecho provocaba al mismo tiempo un cambio en el pH del medio. Estudios con células enteras y vesículas demostraron que este cambio de pH era debido al movimiento de protones desde un lado de la membrana hacia el otro, hecho que sugirió que la BR era una proteína bombreadora de protones. Así pues la iluminación de la BR producía un transporte de protones desde el citoplasma al espacio extracelular generándose un gradiente electroquímico de protones. Este gradiente era aprovechado por ATPsintasas (figura 1.2) que con mecanismo antiporte introducían un protón en la célula y expulsaban dos Na^+ hacia el exterior generándose así ATP a partir de ADP (Oesterhelt et al., 1973).

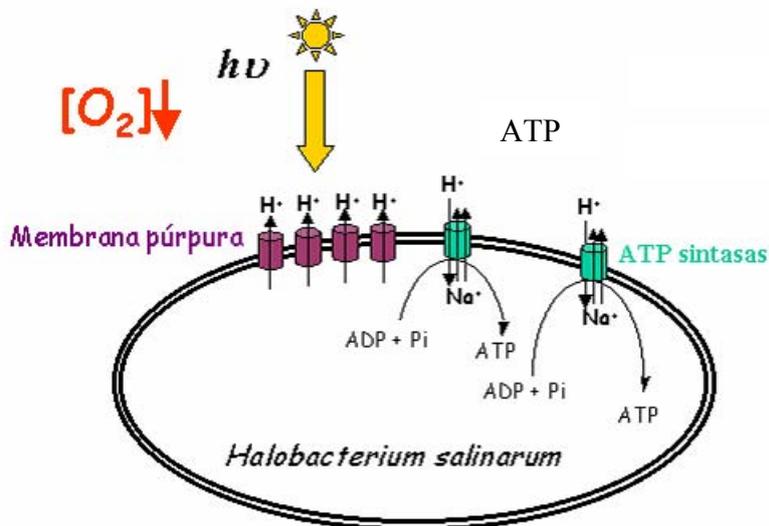


Figura 1.2. Esquema del proceso de obtención de energía química a partir de la energía lumínica en *H.salinarum*.

Este mecanismo de producción de ATP se vio que no era el habitual de la bacteria sino que se trataba de un mecanismo de emergencia que desarrollaba el organismo cuando había limitación de oxígeno en el medio, ya que *H.salinarum* es una bacteria aerobia que normalmente obtiene la energía de la fosforilación oxidativa de los aminoácidos. Así pues, en ausencia de cantidades suficientes de O₂ se detiene el crecimiento de la bacteria y se ponen en marcha una serie de mecanismos para sintetizar la MP y poder transformar la energía de la luz en ATP. El ATP producido bajo estas condiciones, sin embargo, sólo permite la subsistencia de la bacteria hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables, es decir, es un mecanismo de resistencia (Oesterhelt et al., 1973).

El único dato estructural de la BR que se tenía hasta el momento era que se trataba de una proteína transmembrana. No fue hasta el año 1975 que Henderson et al. (1975) obtuvieron mediante difracción de electrones un modelo de la BR, con una resolución de 7 Å, que constaba de 7 estructuras, seguramente hélices, perpendiculares al eje de la membrana y que tenía unas dimensiones de 25 x 35 x 45 Å. Estudios posteriores corroboraron esta hipótesis (Unwin et al., 1975; Ovchinnikov et al., 1979) y obtuvieron la estructura con mejor resolución de la época (3,5 Å). Con la obtención de cristales (figura 1.3) se conocieron más detalles de la estructura de la proteína, que al ir mejorando la técnica de elaboración de cristales, permitió obtener estructuras de mayor resolución (Pebay-Peyroula et al., 1997).

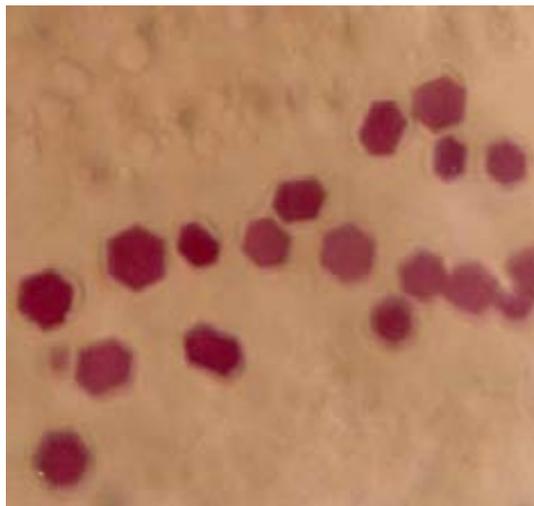


Figura 1.3. Imagen por microscopio óptico invertido de cristales de BR elaborados en nuestro laboratorio.

Hasta el momento los mecanismos de producción de energía química a partir de la energía lumínica que se conocían en la naturaleza consistían en una compleja cadena de transporte de electrones como es la fotosíntesis. El descubrimiento de un sistema tan simple y diferente como el que se lleva a cabo en *H.salinarum* despertó la curiosidad del mundo científico y repercutió en la aparición y desarrollo de muchos grupos de investigación por el mundo que dedicaron sus esfuerzos al estudio de la BR y su mecanismo de bombeo de protones. El revuelo que produjo el descubrimiento de la BR, junto con el hecho de que se obtenga fácilmente y en grandes cantidades, ha hecho que sea la proteína transportadora con la función y estructura más conocida. Por otra parte, la bacteriorodopsina ha servido como modelo de estudio para otras proteínas transmembrana como la rodopsina (Hoflack et al., 1994; Neumuller et al., 1996; Riek et al., 2001).

La BR sin embargo, no sólo es interesante como modelo de estudio para el conocimiento de otras proteínas, sino también como base para posibles aplicaciones en el mundo de la microelectrónica, memoria holográfica (Hampp, 1990; Birge, 1999), memoria óptica (Hampp, 2000), potabilización de aguas salinas (Oesterhelt, 1976), sondas de pH (Padros et al., 2001), obtención de energía química a partir de luz para alimentar microsistemas (Lanyi et al., 2001; Pohorille et al., 2002) microchips informáticos (Birge, 1995), etc. Además la BR se ha utilizado como herramienta para el estudio de otras moléculas, como por ejemplo para orientar proteínas y poder estudiarlas por resonancia magnética nuclear (Bernado et al., 2002), o para estudiar bucles de la rodopsina por microscopia de fuerza atómica (Schafmeister et al., 1993; Heymann et al., 2000).

1.1.2 Evolución del estudio de la BR desde su descubrimiento hasta la actualidad

El estudio del mecanismo mediante el cual la BR realiza su función ha evolucionado mucho desde su descubrimiento hasta la actualidad, aunque todavía se desconoce cómo se suceden algunos cambios en la proteína.

La evolución en la caracterización de la BR ha sido paralela a la evolución en las técnicas de estudio de proteínas, por ello constituye un buen ejemplo de cómo han cambiado las técnicas fisico-químicas aplicadas al estudio de proteínas transmembrana durante las últimas cuarenta décadas, y también de cómo ha influido el desarrollo de la informática aplicada al estudio de sistemas biológicos, y en especial, de proteínas.

La bacteriorodopsina realiza el transporte de protones desde el citoplasma al espacio extracelular mediante un ciclo de reacciones que comienza con la isomerización de su cromóforo, el retinal, mediante la absorción de un fotón. Esto da lugar a diversos cambios en el espectro UV-Vis de la proteína que son cíclicos. Por este motivo se denominó fotociclo a esta reacción como abreviatura de ciclo de fotoreacción. Pero se ha de tener en cuenta que además de los cambios en el espectro de absorción de la proteína se producen otros cambios cíclicos que dan lugar a otros fotociclos, como por ejemplo cambios en la carga eléctrica, protonaciones y desprotonaciones de residuos, cambios estructurales, etc..., con cinéticas relacionadas pero no necesariamente idénticas (Stoeckenius, 1999).

Los descubrimientos más importantes por décadas son los siguientes:

-1970-1980: la bacteriorodopsina, producida por la arqueobacteria *Halobacterium salinarum* (denominada originalmente *Halobacterium halobium*) fue descubierta en 1966 y fue en 1970 cuando se vio que era una proteína similar a la rodopsina, lo que dio origen a su nombre. En 1972 se descubrió su función como bomba de protones inducida por la luz o fotorreceptor en células de *H. salinarum*, y ya en 1977 se conocían los datos básicos de su estructura y función. Se vio que era una proteína de membrana intrínseca de aproximadamente 26 KDa que formaba parches en la membrana celular, que se denominaron membrana púrpura (ver apartado 1.3). También se vio que su cromóforo estaba unido a la proteína formando una base de Schiff (BS) con el grupo amino de una lisina. Una estructura de baja resolución (7 Å) obtenida en 1975 mediante cristalografía electrónica mostró un conjunto de siete segmentos α -hélice que cruzan los 50 Å de grosor de la membrana con una disposición casi perpendicular (Henderson et al., 1975). El retinal no pudo resolverse pero su localización fue obviamente asignada en el interior hidrofóbico de la proteína. La apoproteína produce un desplazamiento en la absorción del retinal a una longitud de onda mucho mayor que la que tiene el retinal formando una BS en disolución. Asimismo actúa como una retinal isomerasa e incrementa el pK_a de la BS desde ~ 7 hasta >13 .

Estudios cinéticos del fotociclo mediante espectroscopia en el visible y en el UV cercano permitieron identificar cinco intermediarios con un tiempo de vida media que varía entre unos pocos picosegundos hasta una escala de milisegundos:



Los subíndices indican el máximo de absorción y la secuencia K, L, M... usada para designar los intermediarios se debe a la similitud de los intermediario 2 y 3 con los fotoproductos lumirodopsina y metarodopsina del pigmento visual. El resto de los intermediarios se designaron siguiendo un orden alfabético.

Sólo el primer paso requiere luz ya que la energía necesaria para que transcurra el resto del fotociclo se acumula en la proteína. Los protones salen al espacio extracelular durante la transición $L \rightarrow M$ y aparecen en el medio extracelular después de menos de 1 ms. Después entran a la proteína desde el espacio citoplasmático durante la caída del intermediario N unos milisegundos más tarde. En principio se propuso una estequiometría de 1 protón/ciclo pero más tarde se planteó la posibilidad de que este número fuese mayor.

En 1976 se presentó ya un modelo para el mecanismo de bombeo de protones de la BR. En este momento ya se había confirmado que la BR era una bomba de protones, hecho que se validó reconstituyendo los fragmentos de MP en liposomas y demostrando que se producía fotofosforilación (Drachev et al., 1974; Kayushin et al., 1974).

El modelo mecanístico asumía que la BS estaba localizada en el interior de la proteína y que cambiaba transitoriamente su accesibilidad de una superficie de la membrana a la otra. Por otro lado asumía que los cambios estructurales en la proteína estaban restringidos debido a la compactación y el ordenamiento para-cristalino que presenta la proteína en los parches de MP, que harían imposible la existencia de largos cambios conformacionales.

También se planteó la existencia de una red de moléculas de agua permanente en ambos lados de la proteína. Mediante espectroscopia de resonancia de Raman (espectroscopia RR) se vio que existía al menos una conexión de este tipo con la BS ya que se producía un intercambio muy rápido de su protón, pero no se pudo determinar a partir de que superficie de la membrana se producía.

Se planteó que la fuerza motora del fotociclo consistía en cambios de pK_a de la BS y otros residuos de la proteína implicados en el transporte del protón. La causa más probable de estos cambios de pK_a era presumiblemente cambios conformacionales del cromóforo y/o de la BS.

Los primeros estudios mediante espectroscopia de alta resolución temporal permitieron obtener el primer modelo del fotociclo. En este caso se trataba de espectroscopia de resonancia de Raman (tr-RR) basándose en que la absorción de

energía comenzaba en el cromóforo y el intermediario M tenía un máximo de absorbancia a 410 nm, indicando que se producía la desprotonación de la BS y sugiriendo que el transporte se originaba allí (Mendelsohn, 1976). Este primer modelo planteaba ya el cambio de accesibilidad de la proteína y lo situaba entre BR₅₇₀ y el intermediario M. Más tarde se vio que este cambio se produce durante un subintermediario de M (ver apartado 1.6). A pesar de que se suponía que el retinal se isomerizaba durante el fotociclo todavía no se estableció en este modelo.

Este modelo sobrevivió durante un tiempo con algunas modificaciones y sus postulados básicos fueron puestos a prueba de forma extensiva. Estos postulados consistían en:

- 1- localización de la BS en el interior hidrofóbico de la membrana
- 2- origen del transporte en la BS mediante un cambio conformacional
- 3- desprotonación y reprotonación de la BS desde otros residuos y/o moléculas de agua y cambio de accesibilidad de un lado a otro de la proteína, dando lugar a dos intermediarios con la BS desprotonada conectados a lados opuestos de la proteína (designados más tarde como MI y MII)
- 4- requerimiento de pequeños cambios conformacionales
- 5- estequiometría de un protón transportado por ciclo

La analogía con la rodopsina sugirió que el retinal se isomerizaba como consecuencia de la absorción de la luz por parte de la BR y pronto se vio que este cambio consistía en el paso del isómero *todo-trans* al isómero *13-cis*. Esto hizo necesario establecer un modelo más refinado que apareció en 1979 en donde se recogía esta nueva idea de que la isomerización del retinal era la fuerza motora del fotociclo.

En 1979 se consiguió secuenciar la proteína conociendo así su composición aminoacídica y permitiendo la conexión tentativa de los datos espectroscópicos con la estructura de la proteína.

-1980-1990: este período se caracterizó por un progreso continuo en la caracterización de la química y cinética de las fotoreacciones de la BR, y por los importantes avances en las técnicas.

Las gráficas de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica, en combinación con datos de accesibilidad de la proteína a enzimas proteolíticos y otros reactivos, identificaron 7 segmentos hidrofóbicos en la secuencia que aparentemente constituían las hélices transmembrana vistas en el mapa de densidad electrónica.

El sitio de unión del retinal, la Lys216, fue localizado cerca de la mitad de la hélice G y el Asp212 fue identificado como el contraión de la BS más probable.

Cuando todavía se carecía de suficiente información estructural se hizo una aproximación a la orientación de las hélices en la membrana a base de estudios muy detallados de la secuencia. Para ello se asumió que los residuos hidrofílicos tendrían una orientación preferente hacia el interior de las hélices y se maximizó el número de puentes salinos que pueden formarse entre ellas. Mediante estudios informáticos se dedujo la posible conformación de las hélices basándose en esa permisa y más tarde se vio que resultó ser correcta.

Aún así este modelo de proteína no contribuyó mucho al desarrollo de un modelo de transporte debido a las dudas generadas respecto a su validez. Fueron los posteriores estudios de difracción de neutrón de MP reconstituida con retinal selectivamente deuterado los que permitieron localizar la BS y el anillo β -ionona en el mapa. Asimismo, el estudio de mutantes de la BR permitió conocer algunos residuos directamente implicados en el transporte, localizados en las hélices C y G.

La base para el desarrollo de un nuevo modelo de transporte fueron los estudios de absorción en el visible del fotociclo, resueltos en el tiempo y a baja temperatura.

Nuevos programas informáticos permitieron el estudio de constantes cinéticas y análisis global de los datos, así como la posibilidad de estudiar la influencia de factores como la temperatura y el pH. También se tuvieron en cuenta factores como la fotoselección o la dispersión de la luz.

Se introdujeron nuevos conceptos para explicar el fotociclo como las reacciones bidireccionales (*backreactions*), la posibilidad de tener caminos ramificados y múltiples formas de la BR con diferentes fotociclos.

Estudios complementarios del fotociclo de elevada resolución temporal por medio de fotocorrientes, o estudios cinéticos de fotovoltaje confirmaron la relación entre traslocaciones de cargas eléctricas y cambios espectrales.

Aunque todavía existía controversia sobre el número de protones transportados en cada ciclo, la inclusión de monómeros de proteína en liposomas permitió ver que el transporte era similar al de los trímeros de proteína en la MP justificando así un modelo de transporte basado en una única molécula de BR.

En esta década también fue posible obtener estudios de espectroscopia vibracional y RMN que se ajustaban bien a la secuencia de intermediarios detectados mediante espectroscopia UV-visible.

El avance de la espectroscopia resuelta en el tiempo hasta el rango de femtosegundos permitió identificar los intermediarios K y J (ver sección 1.6) y la observación directa de la isomerización del retinal.

Los primeros avances en la caracterización del fotociclo provinieron de la espectroscopia de RR de alta resolución temporal. Mediante esta técnica se vio que la BS se desprotonaba en la transición L→M y se asignó la reisomerización del retinal a la transición N→O entre otras cosas.

Pero mientras que la espectroscopia de RR se limitaba al cromóforo, el desarrollo de la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) permitía extender estos estudios a toda la proteína, identificando residuos implicados en la función. Los cambios observados para el cromóforo coincidían con los que se habían determinado mediante RR, lo que permitió separar las bandas del cromóforo de las bandas de la apoproteína. La espectroscopia de FTIR de alta resolución temporal proporcionó también una mejor caracterización de los intermediarios de la segunda parte del fotociclo, que no había sido posible resolver con la espectroscopia UV-vis.

Después de 1985 la técnica de FTIR empezó a reemplazar a la espectroscopia de RR y se comenzó a trabajar con proteína marcada isotópicamente que se obtenía a partir de cultivos de bacteria que crecían en medios con aminoácidos marcados.

Por medio de estos estudios se vio la existencia de cuatro aspárticos en el entorno hidrofóbico de la proteína que participaban en cambios que tenían lugar durante el fotociclo y que podían ser asignados a transiciones entre intermediarios. Pero no fue posible distinguir entre ellos. Estos residuos eran importantes en el transporte y su identificación en la secuencia y asignación individual constituyó un desafío.

Mientras tanto el gen de la BR fue clonado, secuenciado, expresado en *E.coli* y reconstituido con retinal en vesículas lipídicas y micelas de detergente. Esto permitió la expresión de mutantes y su caracterización. A pesar de que la expresión en *E.coli* tenía el inconveniente de obtener la proteína en un entorno que no era el nativo, además de necesitar la incubación con retinal y la reconstitución en micelas o liposomas, que ya se había visto para la BR nativa que introducía algún cambio en la función, la obtención de mutantes mediante este método, junto con la mutación al azar de cepas deficientes en otros pigmentos, así como el estudio de la proteína nativa y los mutantes mediante FTIR permitió obtener muchos datos nuevos en este periodo.

Fue por medio de estas técnicas que se identificó la función de los aspárticos 85 y 96, ambos localizados en la hélice C como los residuos que se protonaban y

desprotonaban durante el fotociclo. El Asp115 y el Asp212 fueron identificados como los dos aspárticos que sólo sufrían cambios en su entorno durante el fotociclo.

A partir de estos nuevos datos, y sabiendo que la mayoría de los residuos que interaccionaban con la BS estaban localizados en las hélices C, D, F y G, se intentó ajustar el modelo estructural de la proteína a los datos espectroscópicos. En estos momentos la participación de las moléculas de agua no fue considerada.

La idea de que el cambio de accesibilidad de la proteína consistía en cambios en el estado de isomerización del retinal, que era la base del segundo modelo del fotociclo, se abandonó y se propuso como mecanismo algunos cambios conformacionales indefinidos en el transcurso de L a N. Aquí surgió la idea de un papel relevante de las prolinas intrahélice en este proceso corroborado por estudios de FTIR. La difracción de neutrón, que anteriormente no había proporcionado mucha información debido a limitaciones técnicas, se desarrolló y a partir de 1984 se convirtió en una fuente importante para el estudio estructural de la proteína. En contraste con la cristalografía electrónica y de rayos-X permitía localizar el retinal y las moléculas de agua en la estructura.

Mientras que los cambios estructurales que sucedían en la primera parte del fotociclo eran ignorados por ser más sutiles, los que suceden en la segunda parte del fotociclo permanecieron enmascarados en la suposición de que se producía un cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático, y en la creencia de que la transferencia del protón desde el Asp96 a la BS se producía por medio de otros residuos localizados entre ambos durante la transición M→N.

A pesar de que ya se conocía bastante bien el fotociclo en términos de transferencia de protones e isomerización del retinal al principio y al final del mismo, todavía se tenía un gran desconocimiento de cómo se producían estos cambios, siendo motivo de profunda controversia.

Fue en este periodo (1985) que se descubrió también la existencia de otras proteínas similares a la bacteriorodopsina presentes en la membrana del *H. salinarum* (ver sección 1.2), y que además de tener una secuencia aminoacídica homóloga, eran activadas mediante la luz y presentaban también un fotociclo, aunque en algunos casos con diferencias importantes respecto a la BR. La comparación de las secuencias de estos pigmentos permitió identificar también otros aminoácidos importantes en la función de la BR y viceversa. Incluso resurgió la idea de que la BR transportase OH^- en lugar de H^+ por analogía con la hR, que es una bomba de iones Cl^- , aunque esta

idea nunca fue tomada muy en serio. Pero fue difícil reconciliar la similitud de sus fotociclos con sus funciones tan diferentes, y el modelo de transporte de protones de la BR permaneció igual pese al descubrimiento de estos pigmentos.

A finales de esta década el modelo de fotociclo en condiciones casi fisiológicas se parecía bastante al actual.

-1990-2000: en 1990 la cristalografía electrónica produjo un mapa tridimensional de la BR a 3,5 Å de resolución en el plano de la membrana y 10 Å en plano perpendicular (Henderson et al., 1990). Los datos cristalográficos fijaron la posición rotacional de las hélices, excepto para la hélice D que posteriormente fue corregida, el anillo β -ionona y seis aminoácidos aromáticos (4 Trp y 2 Tyr) definiendo así el bolsillo de unión del retinal. Asimismo permitió ver la localización de la BS en el interior de la proteína y determinar que el espacio citoplasmático es estrecho e hidrofóbico en contraste con el espacio extracelular, que es más ancho y muestra una zona abierta entre la BS y la superficie que ya en ese momento se propuso que estaría ocupada por moléculas de agua. Esto era consistente con la observación del rápido intercambio protónico entre la BS y el medio extracelular en la oscuridad y el hecho de que el 80 % de los movimientos de cargas tenían lugar durante la segunda parte del fotociclo, que transcurre en el espacio citoplasmático, a pesar de la localización central de la BS. Aunque no supuso un gran avance en el conocimiento de la estructura adquirido anteriormente mediante otras técnicas, sentó las bases de posteriores intentos de refinar el modelo estructural y funcional de la proteína. Aún así, la mayor limitación del modelo no era su resolución sino el hecho que sólo permitía ver el estado basal de la BR.

En 1991 estudios de RMN en estado sólido introdujeron la idea de que el contraíón de la BS era más complejo que un simple aspártico y consistía de varios grupos, incluida una molécula de agua. Este contraíón permitiría una deslocalización de la carga y sería más débil y polarizable. Este descubrimiento fue útil para explicar otros procesos, como el cambio en el pK_a de la BS, el desplazamiento hacia el rojo del retinal en la proteína, etc.

Estudios cinéticos y termodinámicos más detallados sugirieron la existencia de un cambio irreversible entre dos intermediarios M consecutivos y el cambio de accesibilidad de la proteína durante este intermediario. Estos resultados fueron confirmados mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD) y FTIR, que

determinaron importantes cambios conformacionales en el intermediario M que implicaban prolinas intrahélice así como numerosos cambios en enlaces de hidrógeno. Estudios de la MP parcialmente deshidratada así como de mutantes que carecían del grupo donador del protón, como por ejemplo el mutante D96N, permitieron atrapar el espectro de M₁, M₂ y N.

Los intentos de ver estos cambios estructurales en las estructuras cristalográficas dieron resultados negativos debido a que no resulta fácil atrapar M₂ o N en un estado razonablemente puro. Pero la combinación de las estructuras cristalográficas, los estudios de FTIR a baja temperatura y de muestras parcialmente deshidratadas y el estudio de mutantes de BR ha permitido resolver en parte este problema.

Los datos de cristalografía electrónica de esta época ya introducían la posibilidad de un desplazamiento de la hélice F en el lado citoplasmático hacia el exterior durante el intermediario M tardío o M₂, sugiriendo el papel que jugaría la apertura de esta hélice en la entrada de moléculas de agua en el espacio citoplasmático para facilitar la reprotonación de la BS.

La disponibilidad de estructuras más refinadas, junto con nuevos datos de difracción de neutrones y RMN de estado sólido enfatizando el papel del agua intramolecular sentó las bases para el desarrollo de estudios de dinámica molecular, cálculos electrostáticos y químico-cuánticos del centro activo de la molécula, el camino del protón y los cambios de la proteína durante el fotociclo.

Los modelos estructurales y funcionales de esta década permitían ya deducir los defectos funcionales producidos por una mutación puntual, e incluso como revertir esos cambios mediante modificaciones en el entorno de la mutación, en el cromóforo o mediante una segunda mutación.

Asimismo la estructura de la BR ha servido como molde para deducir la estructura de muchas GPCRs, entre ellas la rodopsina, cuando todavía no era posible obtener su estructura cristalográfica.

-2000-2009: al comienzo de esta década se publicaron estudios de otras proteínas de membrana utilizando la BR como molde, mediante la construcción de quimeras de BR con segmentos de otras proteínas (Heymann et al., 2000; Abdulaev et al., 2002). Esto ha permitido caracterizar los bucles funcionales de otros receptores (Geiser et al., 2006).

Asimismo la BR ha sido ampliamente utilizada para validar nuevas técnicas de estudio de proteínas, como por ejemplo la cristalografía crio-electrónica (de Groot et al., 2000) o la microscopia de fuerza atómica (Scheuring et al., 2002; Kuhn et al., 2005).

En cuanto al estudio de su mecanismo de transporte de protón el papel de las aguas intramoleculares cobró una gran importancia (Grudinin et al., 2005; Garczarek et al., 2006; Lorenz-Fonfria et al., 2008) determinando su gran relevancia en el transporte del protón desde el lado citoplasmático al lado extracelular, en donde actúan como un residuo más de la proteína.

El estudio del movimiento de las hélices durante la reprotonación de la BR también ha centrado gran parte de la atención en este campo, así como la caracterización de los intermediarios que intervienen en la segunda parte del fotociclo y durante los cuales suceden estos cambios estructurales.

El fotociclo, tal y como se conoce en la actualidad, aparece descrito en el apartado 1.6. El presente trabajo pretende aportar nueva información sobre el papel que tiene la flexibilidad de las hélices E, F y G en la función de la BR, y en especial, en la segunda parte del fotociclo donde sucede la reprotonación de la proteína desde el lado citoplasmático.

1.2 *Halobacterium salinarum*

Halobacterium salinarum forma parte de la familia *Halobacteriaceae*, que consta de 10 géneros, de los cuales solamente 4 contienen alguna proteína asociada a retinal (Ihara et al., 1999). Hay que destacar que en algunos de los artículos referenciados se habla de *H.halobium* en vez de *H.salinarum*; eso es debido a que en un principio hubo una confusión en cuanto a la identidad del organismo.

H.salinarum es una arqueobacteria halófila que se ha adaptado de tal forma a vivir en ambientes de extrema salinidad, del orden de 4 M, que la elevada concentración de sal se ha hecho indispensable para su supervivencia (Oesterhelt et al., 1971). Tanto en las células eucariotas como procariotas el catión acumulado intracelularmente es el Na⁺. En el caso de *Halobacterium*, sin embargo, se acumula K⁺, altamente tóxico para el resto de organismos (Lanyi, 1979). Esta acumulación permite contrarrestar la elevada salinidad del medio y mantener la funcionalidad de la célula, ya que la mayoría de sus enzimas, al igual que sus ribosomas, son dependientes de sal (Oesterhelt et al., 1974; van de Vossenberg et al., 1999).



Figura 1.4. Imagen de *H.salinarum* adquirida por microscopia electrónica. En la imagen se aprecia claramente la forma de bacilo de la arqueobacteria.

El ambiente salino donde se desarrolla *H.salinarum* suele ir acompañado de elevadas temperaturas, hecho que ha provocado que la bacteria pueda crecer a altas temperaturas, con un óptimo de 57° C (Oesterhelt et al., 1974).

Como características generales de la arqueobacteria, hay que destacar que las células tienen forma de bastón, un tamaño de 0,5-1,2 μ m x 1,0-6,0 μ m (figura 1.4), son móviles gracias a varios flagelos polares y se tiñen como gram negativos. Tienen vacuolas gasíferas que se han eliminado en la cepa R1 con el fin de facilitar la extracción de la membrana púrpura. Su genoma es rico en G/C (66-71 %), tienen un código genético común pero un uso de codón especial con un 81% de codones acabados en C o G (Dunn et al., 1981). Forman colonias de coloración roja o púrpura. Son quimiorganotrofos y aerobios estrictos, y su mecanismo de resistencia es la MP ya que no forman esporas. El crecimiento en cultivo de la arqueobacteria ha sido posible gracias a la elaboración de medios ricos en aminoácidos y sales. Para su crecimiento es necesario una buena aireación y mantener la temperatura en torno a los 40° C. Bajo estas condiciones de crecimiento el tiempo de duplicación de la bacteria es de 8-10 horas (Oesterhelt et al., 1974), muy largo comparado con los 20 minutos de *Escherichia coli*.

La composición de la membrana citoplasmática es especial ya que está formada por fosfatidilglicerolfosfatos (70%), glicolípidosulfatos (20%) y escualeno (10%); en vez de los tradicionales fosfolípidos. Estos lípidos además no poseen enlaces éster sino éter (Kates, 1988). La pared celular de la bacteria está constituida principalmente por proteína con pequeñas proporciones de carbohidratos; no hay peptidoglicanos, ni lípidos ni ácidos teitoicos como en el resto de bacterias (Oesterhelt et al., 1974).

En la célula coexisten con la bacteriorodopsina diferentes pigmentos (Stoeckenius et al., 1982):

- Bacterioruberina: pigmento transmembranal β -carotenoide que tiene como función proteger la bacteria frente la intensa iluminación existente en su nicho ecológico. Este pigmento es el responsable de la coloración roja de la bacteria (Oesterhelt et al., 1971, 1974).
- Halorodopsina (hR): proteína transmembrana que al igual que la BR tiene unida una molécula de retinal y está ordenada triméricamente, y que, activada por la luz, bombea iones cloro desde el espacio extracelular al citoplasma con el fin de mantener el balance osmótico durante el crecimiento de la bacteria. Su estructura fue obtenida a 1,8 Å de resolución por Kolbe et al. (2000).
- Rodopsina sensorial I (sR): proteína transmembrana con retinal unido y que actúa como fotorreceptor atrayente (Spudich et al. 1988; 1994).
- Rodopsina sensorial II (pR): nombrada también foborodopsina, también es transmembranal y tiene unido retinal, actúa como fotorreceptor repeliendo la radiación azul-verde (Spudich et al., 1988; 1994). Las dos rodopsinas sensoriales actúan direccionando la bacteria hacia intensidades de luz adecuadas para la funcionalidad del organismo, huyendo de la luz ultravioleta y migrando hacia regiones de elevada intensidad de luz naranja. Este fenómeno es el llamado fototaxis.

El alineamiento de secuencias de las cuatro arqueorodopsinas (bR, hR, sR, pR) de diferentes especies muestra que hay 16 aminoácidos completamente conservados, diez de los cuales se encuentran localizados en el bolsillo de unión del retinal. Estudios filogenéticos usando el ARNr 16 S como cronómetro, muestran que estas cuatro arqueorodopsinas probablemente derivan de una misma rodopsina ancestral vía duplicaciones génicas. En una de las primeras duplicaciones se produjo la diversificación en dos grupos, uno formado por el par bR-hR y el otro por sR-pR (Ihara et al., 1999) a partir de los cuales se obtuvieron las arqueorodopsinas actuales.

1.3 Membrana púrpura

1.3.1 Características

Los fragmentos de MP se reparten homogéneamente en la membrana citoplasmática de la bacteria y pueden llegar a ocupar hasta el 50 % de la superficie total (figura 1.5) (Oesterhelt et al., 1973).

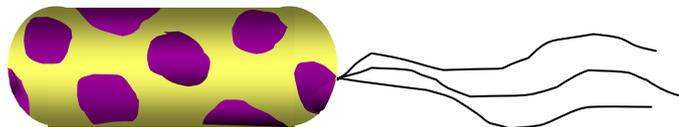


Figura 1.5. Esquema de *H. salinarum* donde se puede apreciar la presencia de los flagelos unipolares y los parches de membrana púrpura distribuidos por la membrana citoplasmática de la bacteria.

Lo parches de MP tienen forma regular y por microscopia electrónica se observó que tienen un diámetro de unos 0,5-1 μm y 45 Å de grueso (Oesterhelt et al., 1974; Henderson, 1975). Un análisis más en profundidad de estos fragmentos reveló que la MP posee una estructura paracristalina consistente en una red hexagonal perfecta de trímeros de BR (Blaurock et al., 1971), (figura 1.6). Los espacios entre las proteínas están ocupados por lípidos en una proporción de 75% de proteína y un 25% de lípido en peso (Henderson, 1975). Cada monómero está rodeando de unas 6 (Kates, 1988) a 10 moléculas lipídicas (Grigorieff et al., 1996).

Los monómeros no se encuentran aislados los unos de los otros ya que mantienen interacciones de carácter hidrofóbico-hidrofóbico entre las hélices transmembrana, necesarias para mantener la estabilidad del trímero. Estas interacciones no se producen al azar sino que se dan entre la hélice B de un monómero y las hélices C y E del siguiente (Fujiyoshi, 1999). La ordenación de la BR en trímeros parece tener una importancia funcional ya que, aunque los monómeros transportan protones, lo hacen de manera menos eficiente que la BR trimérica (Dencher et al., 1979). La forma trimérica además de asegurar la correcta estructura de las hélices en conformación α_{II} característico de la BR (ver apartado 1.4), también confiere una mayor estabilidad a la bacteriorodopsina frente elevadas temperaturas (Brouillette et al., 1987), seguramente debido a la mayor compactación de las hélices existente en los trímeros (Subramaniam et al., 1991). La ordenación en trímeros no sólo afecta a las propiedades de la proteína, sino también de las formas isoméricas del retinal (Scherrer et al., 1989) (ver apartado 1.5.2).

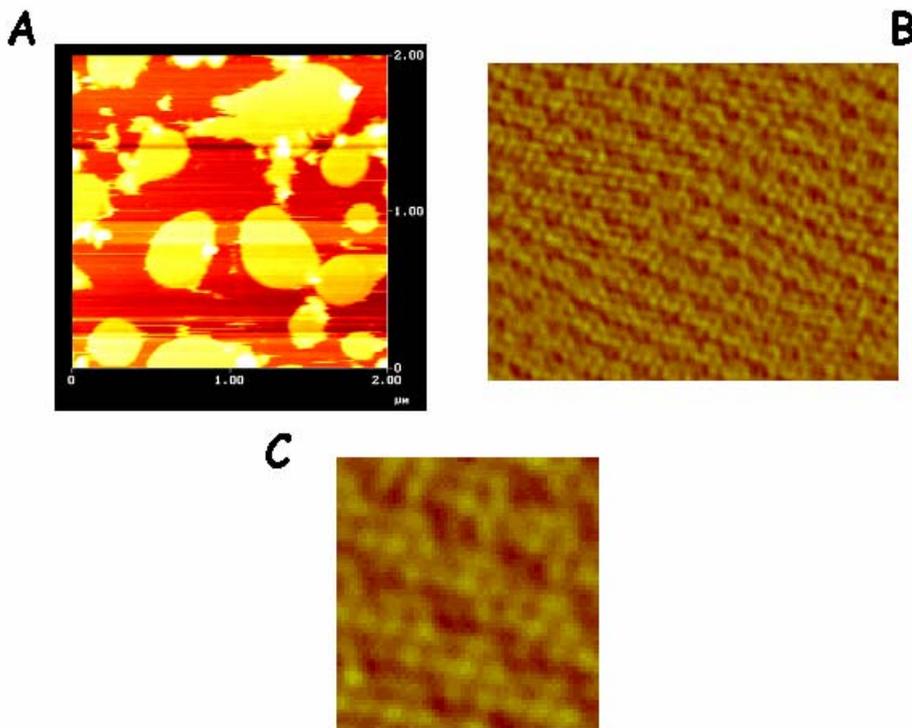


Figura 1.6. (A) Imagen de varios fragmentos de membrana púrpura. (B) Imagen de la membrana púrpura obtenida por microscopía de fuerza atómica. Se observa claramente una ordenación hexagonal de trímeros. (C) Ampliación de un hexámero. Imágenes obtenidas por nuestro grupo.

1.3.2 Síntesis

La Bacterioopsina (bO), es la parte proteica de la BR en ausencia de retinal; su gen es el llamado *bop*. La expresión de este gen viene activada por la unión del sensor de oxígeno Nifl en el gen *brp*, gen que forma parte del cluster donde está incluido el gen *bop*. Este sensor se une únicamente cuando existen condiciones de microanaerobiosis en el entorno y se hace necesaria la formación de MP (Peck et al., 2001).

La expresión del gen *bop* da lugar a un ARN mensajero (ARNm) que es traducido a un precursor de la bO que presenta 13 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y un aspártico en el C-terminal. Estos elementos son cortados antes de que la bO se inserte en la membrana de manera que están ausentes en la BR (Dunn et al., 1981). En un principio se pensó que esta secuencia hacía la función de péptido señal para anclar la bO en la membrana citoplasmática, pero Xu et al. (1995), demostraron que estos 13 aminoácidos no eran necesarios para la proteína sino que en realidad eran el producto de la traducción de una secuencia de nucleótidos de la región 5' del ARNm necesarios para formar un bucle. Este bucle se forma gracias a la presencia de una

repetición de 9 nucleótidos y su formación es necesaria para que se pueda unir el ribosoma en el ARN (Dunn et al., 1981).

Este ARNm no es solamente característico por presentar este bucle sino que lo es también por presentar solamente 2 nucleótidos en el extremo 5' antes del codón de inicio de traducción comparado con los 26 nucleótidos del resto de organismos (Dunn et al., 1981; Dassarma et al., 1984). Además en este ARN los sitios de unión del ribosoma se encuentran down-stream de los codones de inicio en lugar de up-stream.

La bO obtenida de la traducción del ARNm se inserta en una zona de la membrana citoplasmática llamada membrana parda donde se dispone de manera desordenada sin formar la estructura paracristalina típica de la membrana púrpura. Al mismo tiempo, la síntesis de bO induce la ciclación del licopeno a β -caroteno que dará lugar al retinal, el cual se unirá a la bO ya insertada en la membrana parda. Una vez realizada esta unión entre la bO y el retinal, se empieza a producir la ordenación de la BR (Sumper et al., 1976).

1.4 Bacteriorodopsina

La BR es una proteína de 248 aminoácidos que tiene un peso molecular de 26 KDa (Ovchinnikov et al., 1979; Dunn et al., 1981) donde hay que destacar la ausencia de histidinas y cisteínas y la gran abundancia en aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos. La estructura de la BR consiste en 7 hélices (figura 1.7.A) nombradas de la A a la G conectadas entre sí por bucles citoplasmáticos y extracelulares con el extremo N-terminal en el lado extracelular y el extremo C-terminal en el lado citoplasmático (Ovchinnikov et al., 1979). En muchas ocasiones se habla de lado extracelular, pero se tiene que tener en cuenta que en realidad es el espacio periplasmático. Hacia la mitad de la proteína, y casi perpendicular al eje de las hélices, se encuentra unida la molécula de retinal (figura 1.7.B), mediante una Base de Schiff (BS) protonada.

Las hélices de la BR no se encuentran totalmente en conformación α_I como sucede en la mayoría de proteínas, sino en una mezcla de α_I y α_{II} (Krimm et al., 1982). Esta variedad de hélice se caracteriza sobre todo por ser menos compacta. Las principales diferencias entre las dos formas se encuentran resumidas en la tabla 1-1.

El hecho de que presente esta configuración inusual de las hélices parece que es debido a que la estructura α_{II} permite una mayor estabilidad del retinal en su conformación *13-cis*, necesaria para el correcto funcionamiento de la BR (ver apartado 1.5.2).

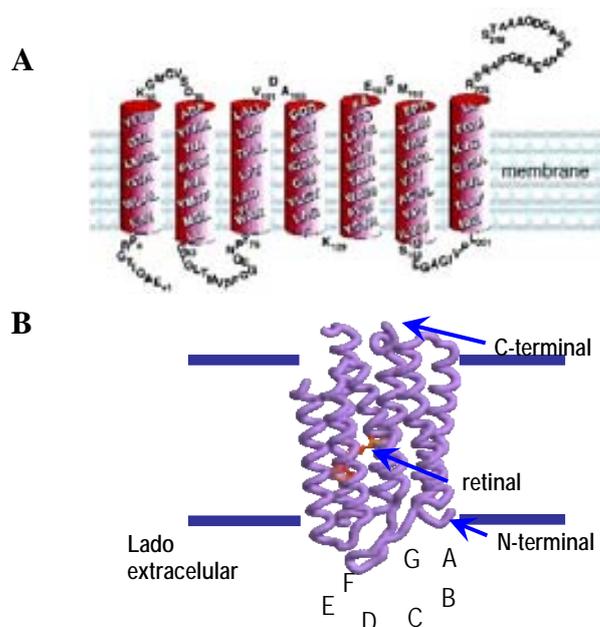


Figura 1.7.A. Estructura primaria y secundaria de la BR. **B.** Estructura terciaria obtenida a partir de difracción de rayos X de cristales de la proteína (código 1c3w en el PDB). Las letras indicadas en la parte inferior dan nombre a las siete hélices α , siendo la G la que tiene unida la molécula de retinal. Los extremos N- y C-terminal así como el bucle E-F no aparecen en el patrón de difracción debido a su alta movilidad.

Tabla 1-1. Características generales de la estructura de las hélices α_I y α_{II} .

Características	α_I	α_{II}
Plano del enlace peptídico	Paralelo al eje de la hélice	El enlace N-H apunta hacia el eje
Longitud del puente de hidrogeno C=O...H-N	2,86 Å	3 Å
Frecuencia de vibración del puente de hidrogeno	Menor	Mayor
Fuerza de los enlaces C=O y N-H	Menor	Mayor

1.5 Retinal

1.5.1 Características

Hacia la mitad de la BR la molécula de retinal se encuentra unida covalentemente, mediante una Base de Schiff protonada (Oesterhelt et al., 1971), con la lisina 216 (Seiff et al., 1985) (figura 1.8.A). El retinal es el cromóforo responsable de la absorción de la luz y de iniciar los cambios necesarios para que la BR bombee protones, y de que la bacteriorodopsina presente una coloración púrpura (Lewis et al., 1974). El retinal está compuesto de un anillo β -ionona y una cadena poliénica de 16 carbonos con dobles enlaces conjugados. El cromóforo se encuentra anclado en la BR formando un ángulo

de 20° con respecto al plano de la membrana citoplasmática (Heyn et al., 1977) dividiendo así la proteína en dos partes, la parte citoplasmática y la extracelular.

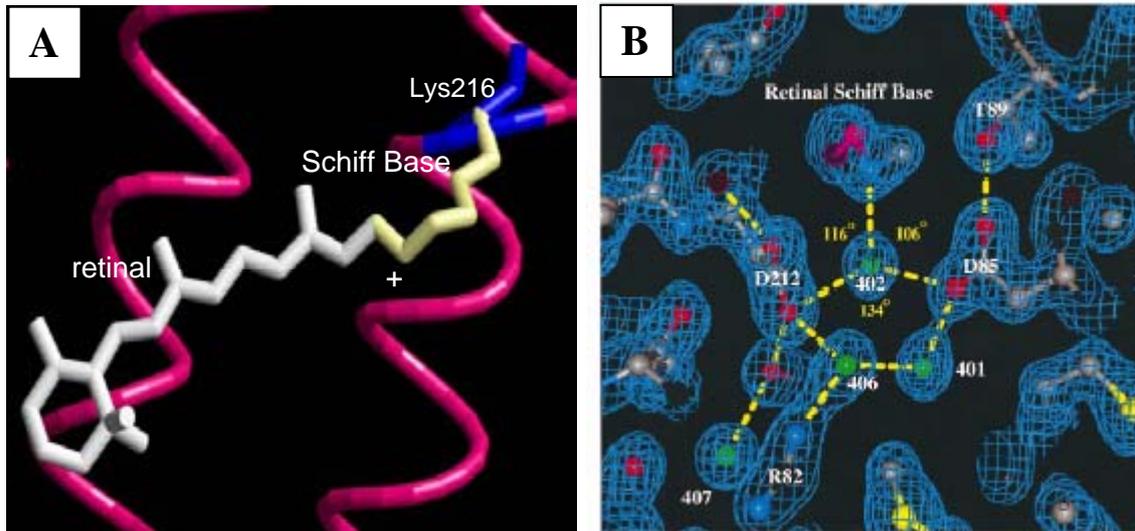


Figura 1.8.A. Representación de la Base de Schiff entre el nitrógeno de la cadena lateral de la Lys216 y el C₁₅ del retinal. El signo positivo indica el estado protonado. **B.** Mapa de densidad electrónica de la región circundante de la Base de Schiff a 1,55 Å de resolución. En la imagen se aprecia un complejo formado por la molécula de agua 402 unida mediante puentes de hidrógeno por un lado con la BS y por el otro a los aspárticos 85 y 212. Estos aspárticos se encuentran conectados con la arginina 82 mediante las aguas 401 i 406. Este complejo sería el contraión de la Base de Schiff (Luecke et al., 1999b).

El retinal tiene la capacidad de absorber luz presentando un máximo de absorbancia dependiente de su entorno, así pues, cuándo el retinal se encuentra disuelto en etanol su máximo se encuentra a 380 nm. Sin embargo, cuando se encuentra unido a la proteína, la carga positiva de la BS que se ha formado se estabiliza mediante puentes de hidrógeno directos o indirectos, con el contraión formado por los aspárticos 85, 212, la arginina 82 y moléculas de agua (figura 1.8.B), (Grigorieff et al., 1996; Kimura et al., 1997; Luecke et al., 1998; Edman et al., 1999; Mitsuoka et al., 1999). El microambiente generado por estos residuos afecta de manera importante a la densidad electrónica del retinal haciendo que su máximo de absorbancia se encuentre a 558 nm.

El retinal, sin embargo, no sólo es responsable de la absorción de luz y de iniciar el bombeo de protones (apartado 1.6), sino que además tiene un papel importante en la compactación de las hélices y por lo tanto en la estabilidad de la estructura de la BR (Cladera et al., 1996; Ludlam et al., 1997).

1.5.2 Adaptación luz-oscuridad

La BR presenta dos estados denominados forma adaptada a la oscuridad (DA) y forma adaptada a la luz (LA) (Oesterhelt et al., 1973). Estas dos formas se diferencian claramente por presentar un máximo de absorbancia en el visible característico, siendo de 558 nm para la forma DA y 568 nm para la LA. El estudio de ambas mostró que había diferentes formas isoméricas del retinal.

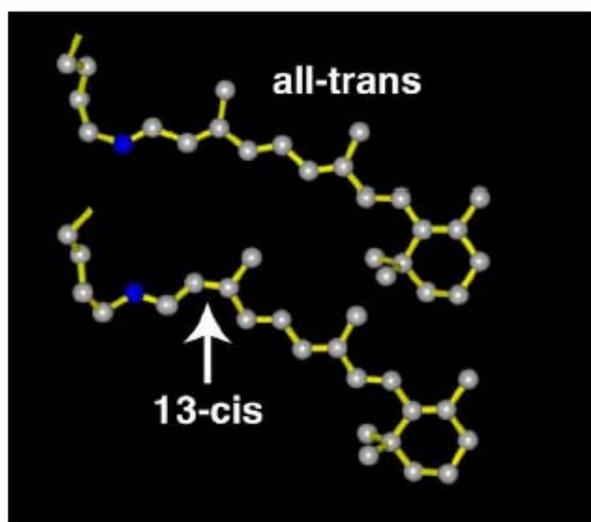


Figura 1.9. Estructura de la molécula de retinal en conformación *todo-trans* y en conformación *13-cis*, *15-syn*.

En la forma LA el retinal se encuentra casi el 100% en configuración *todo-trans* (Ohno et al., 1977). En DA sin embargo, en un principio se pensó que había una proporción 1:1 de *13-cis,15-syn* : *todo-trans*, (figura 1.9) (Ohno et al., 1977), pero estudios más detallados revelaron que en realidad la proporción es de 2:1 (Scherrer et al., 1989). El sentido de que haya esta proporción de los isómeros es un tema todavía no resuelto.

Scherrer et al. (1989) sugirieron la posibilidad de que en un trímero hubiera dos monómeros con configuración *13-cis* y uno con *todo-trans*, pero también cabe la posibilidad de que hubiera unas proporciones al azar en los trímeros y que los isómeros se fueran intercambiando.

Las proporciones de los dos isómeros puede variar dependiendo de las características de la BR, de manera que en formas monoméricas de la BR por ejemplo se ha observado que hay una mayor proporción de *13-cis* en la forma DA (72%) que en los trímeros (66%). Este hecho muestra el papel que juegan los trímeros en estabilizar la forma *todo-trans*, indicando así que la forma *13-cis* es el isómero energéticamente más estable (Scherrer et al., 1989). Este hecho sugeriría que la organización en trímeros de la

BR sería necesaria para mantener una proporción isomérica del retinal adecuada para la función de la BR. Además se ha observado que los monómeros se adaptan a la oscuridad un orden de magnitud más rápido que los trímeros indicando que la presencia de retinal en un monómero tiene influencia sobre el cromóforo vecino (Ebrey et al., 1977).

Por otra parte, Rehorek et al. (1979) determinaron que la unión de retinal en la bO se produce de forma cooperativa.

La forma LA se obtiene por iluminación de la BR DA durante unos minutos con luz blanca. Para devolver a la forma DA la BR se tiene que mantener a oscuras durante un tiempo mínimo de 20 minutos a 35° C, dependiendo del pH (Oesterhelt et al., 1973; Ohno et al., 1977). La velocidad de adaptación a la oscuridad depende de la temperatura, de manera que cuanto más elevada es la temperatura el tiempo necesario para la adaptación es menor y viceversa, por ejemplo, a 4° C el tiempo necesario es de 30 horas (Ohno et al., 1977). Scherrer et al. (1989) detectaron que al aumentar la temperatura, a partir de 40° C, además de disminuir el tiempo de adaptación a la oscuridad, se producía un incremento en el número de moléculas de retinal en conformación *todo-trans*. Así las propiedades de las formas DA y LA no son solamente dependientes de la BR sino que también de las características del medio como en este caso la temperatura. La adaptación a la oscuridad depende del pH, de manera que a valores de pH por debajo de 7 se produce una disminución del tiempo de adaptación; entre pH 7 y 8,5 hay una invariabilidad en la velocidad de adaptación, y a pH por encima de 8,5 este tiempo aumenta (Ohno et al., 1977). A pH ácido además va disminuyendo la proporción de *todo-trans* de la forma LA de manera que a pH 2 se tiene sólo un 55% de *todo-trans*, un 35% de *13-cis*, 7% de *11-cis* y 3% de *9-cis*. En la forma DA, sin embargo, al disminuir el pH por debajo de 4 se produce un ligero incremento en la proporción de *todo-trans*, teniendo a pH 2 un 58% de *todo-trans*, y 42% de *13-cis*. Cuando se incrementa el pH por encima de 10 en la forma LA se produce una disminución en la cantidad de *todo-trans* hasta un 82% con un 4% de *13-cis* y un 14% de *11-cis*. En la forma DA no se producen cambios significativos a pH básico.

Balashov et al. (1996), detectaron que la velocidad de adaptación a la oscuridad es proporcional a la cantidad de la forma azul y que es por este motivo que cuanto más bajo es el pH más rápida es la adaptación a la oscuridad. Proponen que el mecanismo de adaptación a la oscuridad se produce vía protonación transitoria del Asp 85 (figura 1.10)

a cualquier pH. Al protonarse este grupo se rompería su puente de hidrógeno con la Base de Schiff aumentando la deslocalización de los electrones del retinal y liberando la BS; de esta manera se podría producir la isomerización.

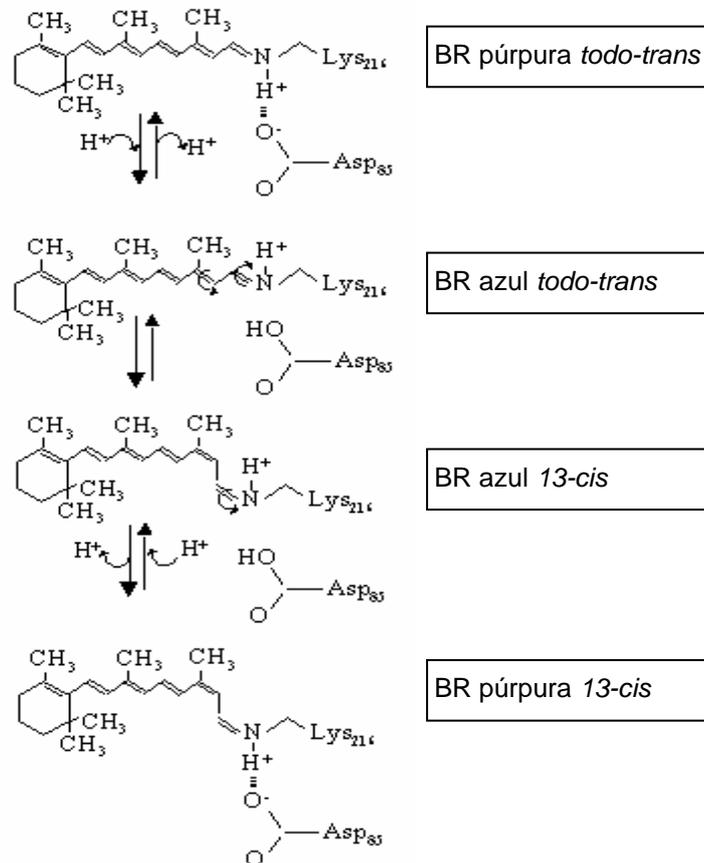


Figura 1.10. Representación esquemática del mecanismo de adaptación a la oscuridad en la BR. Las transiciones entre *todo-trans* y *13-cis* se producen via protonación transitoria del Asp 85. Esquema basado en Balashov et al. (1996).

Ohno et al. (1977) determinaron que el sentido de la existencia de estas dos formas de la BR residía en su funcionalidad. La forma DA se vio que había perdido la capacidad de bombeo de protones comparado con la forma LA, de manera que la forma DA sería una forma inactiva de la BR donde el retinal se encuentra en una conformación energéticamente más estable y menos activo comparado con la forma LA. Así pues, la forma DA sería un estado de relajación de la BR de manera que es necesario la iluminación de éste para obtener la forma LA ya plenamente activa.

1.6 Fotociclo

1.6.1 Introducción

Se llama fotociclo al encadenamiento de cambios estructurales en la BR que se producen como consecuencia de la absorción de un fotón por el retinal, dando como resultado final la expulsión de un protón desde el lado citoplasmático al lado extracelular.

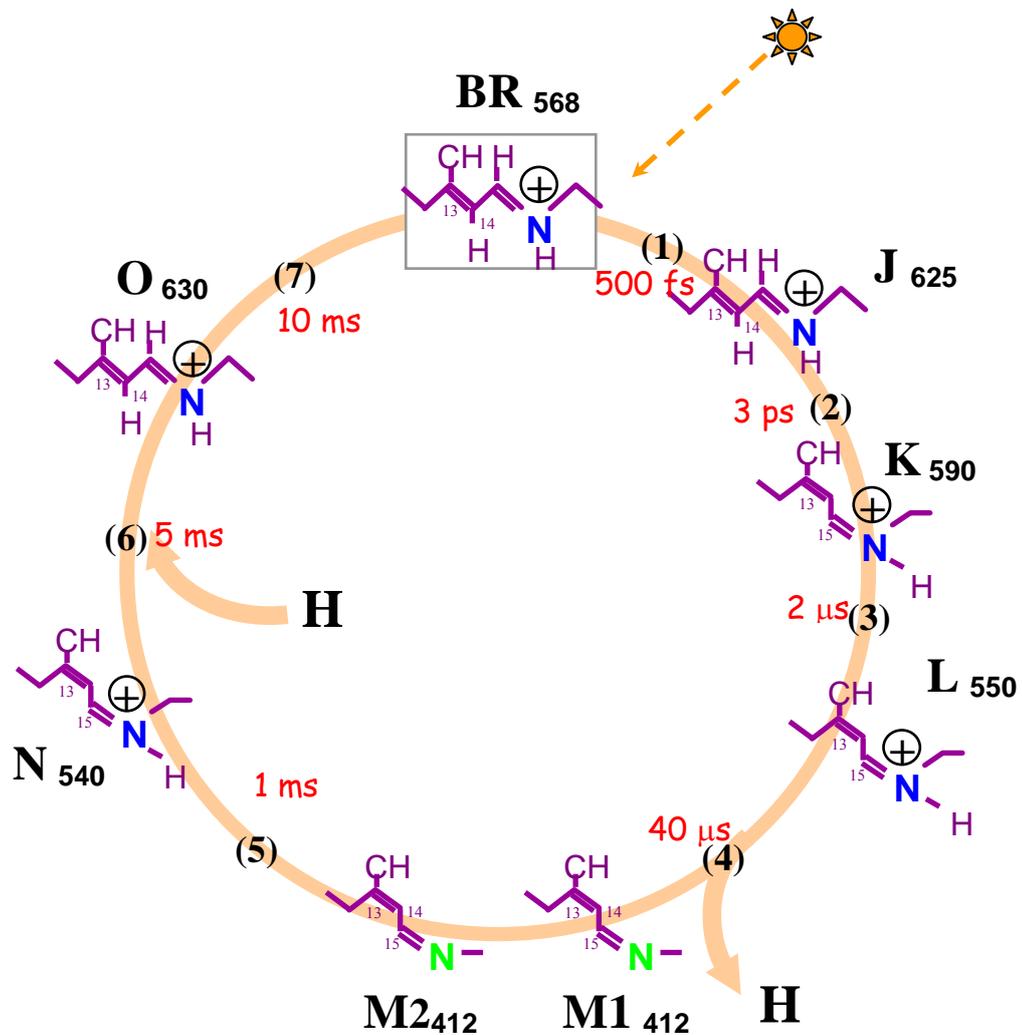


Figura 1.11. Esquema del fotociclo de la BR. Cada uno de los intermediarios se encuentra representado mediante una letra y un número correspondiente a su máximo de absorción en el visible. En rojo están indicados los tiempos de formación de cada uno de ellos. Además de los subintermediarios de M (M_1 y M_2), que son ampliamente reconocidos, se cree que el fotociclo tiene otros subintermediarios (ver apartado 1.6.2). Entre paréntesis se encuentran los pasos representados en la figura 1.12.

Para que la BR lleve a cabo el fotociclo es necesario que la proteína se encuentre primero en su forma activa, es decir, adaptada a la luz donde la totalidad de los retinales se encuentran en conformación *todo-trans* (1.5.2). A cada uno de los estados por los que pasa la BR durante el fotociclo se denomina intermediario, fácilmente identificable por tener un máximo de absorbancia característico (Lozier et al., 1975). En la figura 1.11 está representado el orden temporal de cada uno de los intermediarios del fotociclo, donde los principales movimientos de protones están reflejados en la figura 1.12.

Se llama fotociclo debido a que los cambios que se producen en la proteína al absorber un fotón el retinal son de carácter cíclico. El tiempo que tarda la BR en cumplir todo un ciclo es de unos 10 ms, que se vuelve a repetir si continúan las condiciones de iluminación.

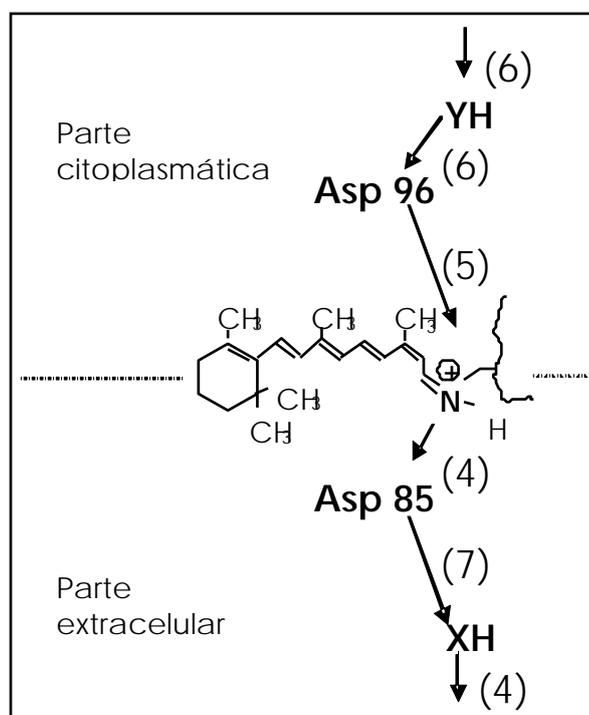


Figura 1.12. Esquema de los movimientos de los protones que tienen lugar durante el fotociclo de la BR. Los números entre paréntesis señalan el orden de los acontecimientos y se correlacionan con los indicados en la figura 1.11. Tanto en el paso 4 como en el paso 6 se cree que ambas protonaciones no son simultáneas sino que podrían dar origen a otros dos subintermediarios denominados M_2' y N' respectivamente.

1.6.2 Intermediarios

Los procesos importantes que se producen durante cada uno de los intermediarios se muestran más detallados en la figura 1.15.A

BR₅₇₀: Estado basal de la proteína antes de empezar el fotociclo. El retinal se encuentra en conformación *todo-trans* ya que primeramente la BR habrá sido activada iluminándola durante unos minutos para que se encuentre en su forma LA. En este estado la BS se encuentra protonada (Siebert et al., 1983; Earnest et al., 1986).

J: Este intermediario se obtiene a los 500 fs después de que el retinal absorba un fotón; éste es un intermediario difícilmente detectable debido a su rapidez. El retinal sigue en conformación *todo-trans* donde el entorno de la BS es similar al obtenido en BR₅₇₀, pero se produce una reorganización de la densidad electrónica del retinal entre los enlaces C=C y C-C. Parece ser que durante este intermediario habría una cierta torsión de la cadena poliénica del retinal.

K: En el paso de J a K se produce la isomerización del retinal desde *todo-trans* a *13-cis, 15-anti* (Mathies et al., 1991; Weidlich et al., 1997; Schobert et al., 2002) diferente de la forma *13-cis, 15-syn* de la forma adaptada a la oscuridad (ver apartado 1.5.2). Éste es el primer intermediario claramente detectable donde la BS continúa estando protonada. Durante este intermediario se producen cambios en la distribución de electrones en el retinal como consecuencia de su isomerización (Siebert et al., 1983; Rothschild, 1992).

L: En este intermediario se pueden ver cambios en el entorno del aspártico 96 (Maeda et al., 1992; Le Coutre et al., 1995) que en un principio se consideró como una desprotonación transitoria de este grupo (Briman et al., 1988; 1991; Ormos et al., 1992). Yamazaki et al. (1995) detectaron sin embargo, que este cambio de entorno del Asp96 es debido al movimiento de moléculas de agua en el espacio existente entre este grupo y la BS al isomerizarse el retinal. Estos movimientos consisten en la relajación de las hélices para dar cabida al nuevo estado conformacional del retinal (Hayashi et al., 2002).

M: El fenómeno más importante que tiene lugar durante este intermediario es la desprotonación de la BS (Rothschild et al., 1979; Braiman et al., 1987). Mediante estudios de fotólisis de destello, se detectó que durante el fotociclo se producía la protonación/desprotonación de dos grupos carboxílicos. Como candidatos propusieron el Asp85, Asp96, Asp212 y el Glu204. Dollinger et al. (1986) se acercaron más a los fenómenos que tenían lugar durante el intermediario M, indicando que durante este intermediario se protonaba un aspártico y que además había involucrado un glutámico. Fue más adelante cuando se determinó que el grupo que recibía el protón de la BS era el Asp85 (Braiman et al., 1988; Stern et al., 1989; Braiman et al., 1991; Metz et al., 1992) negando así la posible protonación del Asp212 que sostenían algunos grupos (Bousche et al., 1992; Ormos et al., 1992). El estudio de la evolución de este intermediario mediante la técnica de fotólisis de destello muestra que la aparición de este intermediario se describe bien como una reacción bifásica, y es por esta razón que se empieza a hablar de dos subgrupos de M llamados de diversas maneras: *M closed* o M_1 para la primera especie y *M open* o M_2 para la segunda (Varo et al., 1990), con unos máximos de absorbancia de 411 nm para el M_1 y 404 nm para el M_2 (Zimanyi et al., 1992a).

- **M_1 :** Se produce el primer movimiento de protones donde la Base de Schiff se desprotona cediendo su protón al aspártico 85, fenómeno que induce la liberación de un protón hacia la parte extracelular.
- **M_2 :** El retinal cambia su accesibilidad desde el lado extracelular al lado citoplasmático (Varo et al., 1991b; Zimanyi et al., 1992a; Subramaniam et al., 1999). Fodor et al. (1988) propusieron el modelo C-T donde una vez se desprotonaba la BS ésta cambiaba su accesibilidad hacia el lado citoplasmático con el fin de poder protonarse en el paso de M a N. Además de este cambio de orientación de la BS también se producen cambios estructurales (Dencher et al., 1989; Stern et al., 1989; Koch et al., 1991; Rothschild et al., 1993; Lazarova et al., 1996). Lazarova et al. (1996) concretaron que estos cambios se producían en las hélices, los giros reversos y aminoácidos aromáticos. Estos cambios sin embargo, consisten más concretamente en la apertura del espacio citoplasmático que permite la entrada de aguas que provocan la disminución del pK_a del Asp96 en el intermediario N (Radionov et al., 1996; Kamikubo et al., 1997; Radionov et al., 1997; Oka et al., 2000; Vonck, 2000). Los cambios estructurales se vio

que involucraban el movimiento de los bucles citoplasmáticos E-F y/o C-D (Steinhoff et al., 1994; Thorgeirsson et al., 1997). Estudios más detallados determinaron que la apertura se debía a una torsión en las hélices F y G (Luecke et al., 1999b; Oka et al., 2000; Sass et al., 2000; Oka et al., 2002). Xiao et al., (2000) además de estas torsiones postulan que también habría una rotación de la hélice F en el sentido contrario a las agujas del reloj. Lanyi et al. (2002) han establecido que efectivamente de L a M₁ se produce la desprotonación de la BS, que de M₁ a M₂ la BS se reorienta hacia el lado citoplasmático, y establece un nuevo subintermediario M₂' en el que se libera el protón al espacio extracelular y se produce una relajación del retinal exponiéndose la BS más hacia la zona citoplasmática.

N: En el paso del intermediario M₂ a N se produce la reprotonación de la BS a partir del Asp96 (Butt et al., 1989; Holz et al., 1989; Otto et al., 1989; Bousche et al., 1991; Braiman et al., 1991). La desprotonación del Asp96 se produce gracias a la disminución de su pK_a que tiene lugar cuando hay una entrada de moléculas de agua al abrirse las hélices en la parte citoplasmática durante M₂. Por otra parte la desprotonación del grupo X durante M induce una disminución del pK_a de la BS. Estos dos fenómenos originan el paso del protón desde el Asp96 hasta la BS.

La reprotonación de la BS viene dada por la formación transitoria de una red de puentes de hidrógeno entre el Asp96 y la BS (Cao et al., 1991; Bousche et al., 1992; Le Coutre et al., 1995; Luecke et al., 1999b; Sass et al., 2000).

Schobert et al. (2003) plantearon la existencia de otro subintermediario N' durante el cual se reprotonaría el Asp96.

O: En el paso de N a O el retinal se reisomeriza para obtener de nuevo la conformación *todo-trans* y es en este momento cuando el Asp96 se reprotona según se ha descrito de forma clásica (Otto et al., 1989; Ames et al., 1990; Bousche et al., 1991). Aunque esta reprotonación podría tener lugar durante el subintermediario N' descrito anteriormente. El Asp96 coge el protón de un grupo Y la identidad del cual no se conoce todavía. Este grupo se ha postulado que sería el Asp 38 localizado en el lado citoplasmático (Riesle et al., 1996), aunque otros trabajos postulan que los Asp36, 38, 102 y 104 actuarían como antena para atraer los protones y que sería el Asp36 el que daría el protón al Asp96 (Brown et al., 1999). Recientemente se ha

propuesto el extremo C-terminal como un elemento que regularía este proceso de reprotonación (Turner et al., 2009).

Durante este intermediario el Asp85 continúa protonado y en el paso del intermediario O al estado BR₅₇₀ el aspártico se desprotona cediendo su protón al grupo X (Bousche et al., 1992).

El paso de un intermediario a otro se encuentra en equilibrio como cualquier otra reacción bioquímica. En el caso del fotociclo, estudios termodinámicos y de fotólisis de destello indicarían que todos los pasos se encontrarían en equilibrio excepto los pasos M₁-M₂ y O-BR₅₇₀ donde la pérdida de 17 KJ/mol y 11,4 KJ/mol respectivamente, hace que sean unos pasos irreversibles (Varo et al., 1991b, a; Friedman et al., 1994). En este último trabajo proponen también la irreversibilidad del paso BR₅₇₀-K.

1.7 Liberación del protón

1.7.1 Acoplamiento del Asp 85 y el grupo X

Balashov et al. (1995; 1996), dedujeron la existencia de un acoplamiento entre el pK_a del Asp85 y de un grupo X' en el estado basal (figura 1.13), que podría ser el mismo grupo X liberador del protón. Según este modelo el estado de protonación del Asp85 influye en el pK_a del grupo X' y viceversa.

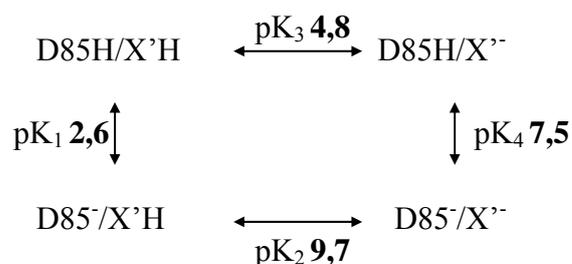


Figura 1.13. Esquema del modelo de acoplamiento entre el pK_a del Asp 85 y el grupo X'H en estado basal propuesto por Balashov et al. (1995).

El hecho de que en el paso del intermediario L a M al protonarse el Asp85 se produzca al mismo tiempo la desprotonación del grupo X hace vislumbrar que el acoplamiento de los pK_a observado al estado basal también se produciría durante el fotociclo. De manera que la protonación del Asp 85 provocaría la disminución del pK_a del grupo X desde 9 a 5,8 (Zimanyi et al., 1992b) produciéndose su desprotonación y la consecuente liberación del protón al medio externo. Al mismo tiempo, la

desprotonación del grupo X produciría un aumento en el pK_a del Asp85 asegurándose así su estado protonado hasta el final del fotociclo.

Sin embargo, ¿cómo es posible que residuos tan lejanos presenten una relación tan estrecha? Estudios de difracción de neutrones (Papadopoulos et al., 1990) y difracción de electrones (Fischer et al., 1994) detectaron la presencia de alguna molécula de agua cerca de la BS y estos autores sugirieron que éstas podían participar activamente en la translocación de protones. Con la posterior obtención de estructuras de elevada resolución se detectó que la BS se encuentra conectada con la parte extracelular de la proteína mediante una compleja red de puentes de hidrógeno donde se encuentran involucradas varias moléculas de agua (Kimura et al., 1997; Luecke et al., 1998; Luecke et al., 1999b; Mitsuoka et al., 1999; Lanyi et al., 2002) (figura 1.14.A).

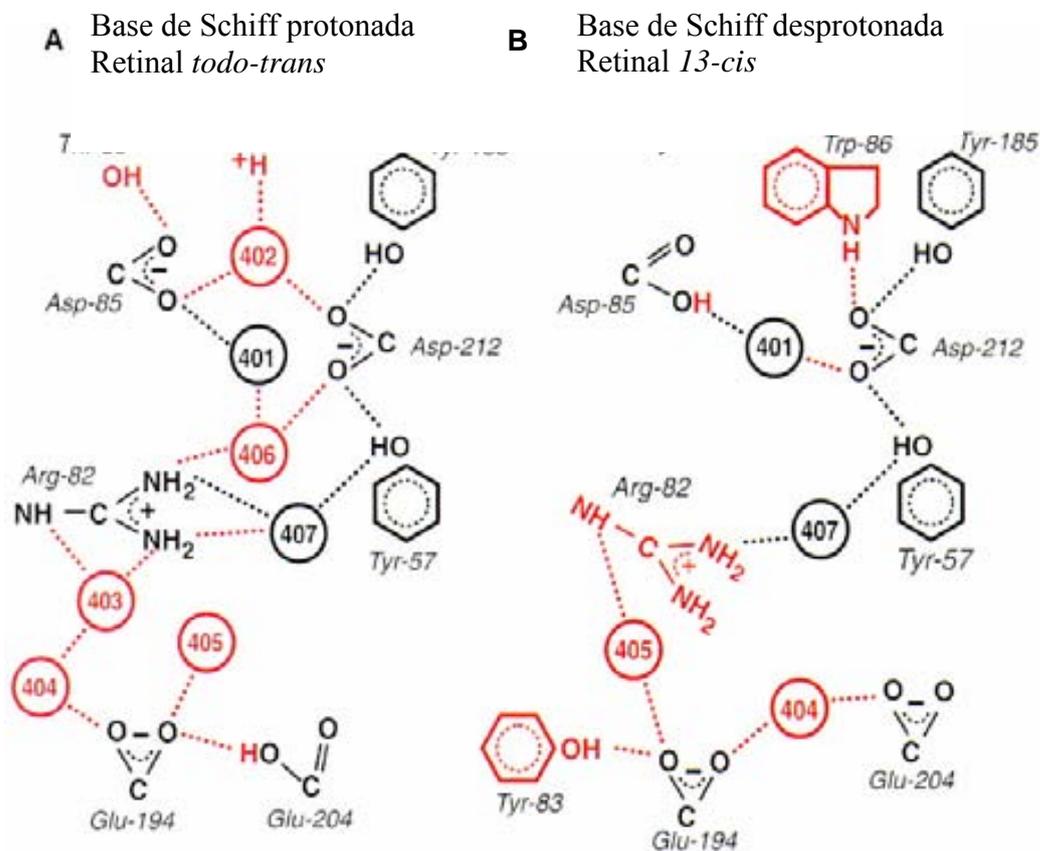


Figura 1.14. Representación esquemática de la red de puentes de hidrógeno formada por grupos y moléculas de agua, en la parte extracelular de la BR, en el estado basal BR_{570} (A) y en el intermediario M (B) (Luecke et al., 1999a). La BR utilizada ha sido el mutante D96N con el fin de poder resolver la estructura del intermediario M, que en este caso se trataría del intermediario M_2 . En rojo se encuentran marcadas aquellas estructuras que cambian en los dos intermediarios, por contra, en negro están indicadas las estructuras que se mantienen invariables.

Esta red sería vital para mantener la comunicación entre el Asp85 y el grupo X durante el fotociclo. Belrhali et al. (1999) ya determinaron que la isomerización del retinal desde *todo-trans* a *13-cis* producía un cambio en el entorno de la BS alterando la red de aguas que conectan la BS con la parte extracelular y produciendo la desprotonación de X. Un par de meses más tarde fue publicado el trabajo de Luecke et al. (1999a) dónde se obtuvo la estructura del mutante D96N, que al tener un intermediario M muy largo permitía su estudio por rayos X. De este modo estudiaron la red de puentes de hidrógeno de la parte extracelular en el estado basal de la BR (figura 1.14 A), y en el intermediario M adquirido en el mutante D96N (figura 1.14 B). En el estado basal se puede apreciar como la BS se encuentra conectada con los glutámicos 194 y 204 mediante una serie de moléculas de agua que, junto con diferentes grupos, forma una compleja red de puentes de hidrógeno.

Una vez que se desprotona la BS cediendo su protón al Asp85 en M, el agua 402 desaparece y hay una reorganización de las moléculas de agua y de los puentes de hidrógeno produciéndose un movimiento de la arginina 82 hacia el extremo extracelular (Gennis et al., 1999) que ya fue intuido por Brown et al. (1995). El acercamiento de la Arg en el extremo extracelular produciría una disminución en el pK_a del grupo X produciéndose la liberación del protón al medio externo.

Sass et al. (2000) llegan más allá indicando que el acercamiento de la arginina 82 produciría un cambio conformacional del glutámico 204 induciendo una separación entre los glutámicos y aspárticos y un cambio en el pK_a del Glu, provocando su desprotonación.

1.7.2 Identificación del grupo X

Cuando se estudia el proceso de liberación del protón a un valor de pH del medio entre 5 y 9 se ve que el proceso de bombeo es normal, es decir, primero se expulsa el protón al lado extracelular en M y se capta el protón desde el lado citoplasmático en el paso del intermediario N a O (figura 1.15.A). Cuando el pH del medio sin embargo, se encuentra entre 5 y 3, el grupo X no puede desprotonarse durante M ya que el medio se encuentra a un pH por debajo de su pK_a cuyo valor es 5,8 en M. En este caso se observa una inversión en el orden de entrada y salida del protón, produciéndose la salida del protón en el paso de O a BR, pero no liberándose desde el grupo X sino directamente desde el Asp 85 (Zimanyi et al., 1992b; Balashov et al., 1996; Govindjee et al., 1996) (figura 1.15.B). El pK_a del grupo X en el estado basal se encuentra en torno a 9, de

manera que a pH por encima de 9 el grupo X se encontraría desprotonado y tampoco podría liberar el protón durante el fotociclo y la liberación del protón también tendría lugar directamente desde el Asp 85 (Govindjee et al., 1996). A pH por debajo de 3 no se produce bombeo de protones como consecuencia de la formación de membrana azul en donde el Asp85 está protonado (Mowery et al., 1979) (ver apartado 1.8.3).

Este fenómeno de inversión en el proceso de entrada y salida del protón también se tendría que observar cuando se inhabilita el grupo X. Por ejemplo, cuando se estudió este proceso en mutantes de la BR donde se abolía la carga positiva de la Arg 82 se observó que se producía una inversión del proceso. Es por este motivo que algunos investigadores consideraron en un principio esta arginina como grupo X (Mathies et al., 1991; Balashov et al., 1993; Govindjee et al., 1996).

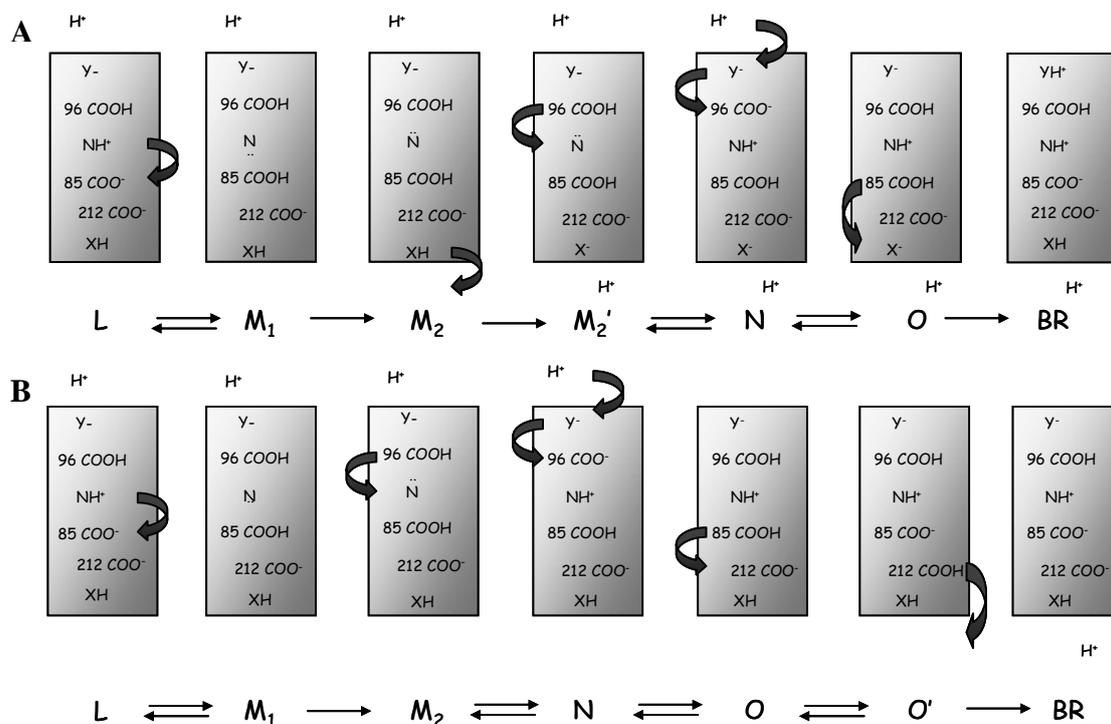


Figura 1.15. (A) Esquema del fotociclo de la BR nativa a pH neutro. (B) Esquema del fotociclo de la BR nativa a pH ácido. En estos esquemas se tiene en cuenta principalmente los estados de protonación/desprotonación del grupo Y, el Asp96, la Base de Schiff, el Asp85, el Asp212 y el grupo X, los cuales son representados en forma de Y⁻, 96 COOH, NH⁺, 85 COO⁻, 212 COO⁻ y XH respectivamente. En el esquema B también tendría cabida el fotociclo que tendría lugar en los mutantes de los Glutámicos 194 y/o 204 y de la arginina 82. Esquema basado en Zimanyi et al. (1992b).

Más adelante se observó que cuando se abolía la carga negativa del glutámico 204 también se producía una inversión en la expulsión y captación del protón, y por eso se consideró que era el glutámico 204 el responsable de liberar el protón (Brown et al., 1995; Govindjee et al., 1996; Richter et al., 1996). Posteriormente se vio que mutaciones en el glutámico 194 también producían el mismo efecto (Dioumaev et al., 1998; Luecke et al., 1998) indicando que el glutámico 194 también podía ser el grupo liberador o bien una conjugación de los dos glutámicos.

La determinación de la existencia de la red de moléculas de agua que conectan la BS con los glutámicos 194 y 204 vía arginina 82 ha sugerido que el grupo liberador del protón es una molécula de agua de esta red (Rammelsberg et al., 1998; Zscherp et al., 1999; Spassov et al., 2001). Por otra parte, el hecho de que la mutación de tantos grupos produzca el efecto de invertir el proceso ha hecho que el modelo más aceptado sea la consideración de que el grupo X no sea ningún grupo en concreto, sino un complejo compuesto por los glutámicos 194, 204 y una molécula de agua coordinada entre ambos glutámicos. Por este motivo el grupo X ha pasado a llamarse PRG (*proton release grup*), complejo liberador del protón. Estudios de FTIR resuelto en el tiempo apoyan esta teoría de que el protón se encuentra deslocalizado entre esos residuos y una red de moléculas de agua presente en la cavidad extracelular (Garczarek et al., 2005).

La mutación de la arginina 82, a pesar de producir la misma inversión que la mutación de los glutámicos 194 y 204, no se encuentra incluida en el PRG. La explicación es que al eliminar la carga positiva del Arg 82 se produce una rotura en la continuidad de la red de puentes de hidrógeno interrumpiendo así la comunicación entre el Asp85 y el PRG (Tanio et al., 1999b). Además, en el caso de que se produjeran puentes de hidrógeno alternativos manteniéndose una correcta comunicación, la ausencia de la carga positiva de la Arg82 no permitiría la disminución del pK_a del PRG, ya que es el acercamiento de esta carga hacia el PRG lo que produce la bajada de su pK_a (Luecke et al., 1999a).

Al inhabilitar el PRG no sólo se produce una inversión en la salida y captación del protón sino que Zscherp et al. (1997) observaron por FTIR que en mutantes del glutámico 204 se producía la protonación transitoria de algún glutámico o aspártico en el intermediario O como demostraba la aparición de una banda positiva a 1713 cm^{-1} . Estudios de infrarrojo muestran que esta banda que aparece tanto en el mutante E194Q como en el E204Q proviene de la protonación transitoria del Asp212 desde el el Asp85 al final del fotociclo (Dioumaev et al., 1999; Zscherp et al., 2001). En la BR nativa

también se observa este fenómeno a pH ácidos. Así pues, estos datos mostrarían que, en las muestras en que se ha inhabilitado el PRG, la liberación del protón no se daría directamente desde el Asp85 sino que desde este residuo se pasaría el protón al Asp212 y de aquí al exterior. Esta nueva especie con el Asp212 protonado y Asp85 desprotonado ha sido llamada O' (Dioumaev et al., 1999). Estudios de nuestro grupo (Lazarova et al., 2002) muestran que la formación del intermediario O' en los mutantes E194Q y E204Q depende de Cl⁻, ya que cuando hay ausencia de este ión en el medio no se produce el O', postulándose que este ión podría actuar uniéndose al contraión de la BS en estos mutantes.

1.8 Forma azul y forma roja de la BR

La forma azul de la BR se obtiene a partir de la BR púrpura, donde el aspártico 85 se encuentra desprotonado en el estado basal (Metz et al., 1992), acidificando el medio. La disminución del pH desplaza el máximo de absorbancia de la BR desde 558 nm a 603 nm, debido a la protonación del aspártico 85. El pK_a aparente de este grupo en 150 mM de KCl es de 2,7, de manera que a valores de pH por debajo de 3 se obtiene la forma azul. Esta forma presenta un fotociclo alterado con la ausencia del intermediario M ya que el Asp 85 ya se encuentra protonado. Además la BR azul pierde su capacidad de bombear protones (Mowery et al., 1979).

Cuando se incrementa el pH del medio de una suspensión de BR por encima de 11,8 y se baja rápidamente el pH, se obtiene una especie con un máximo de absorción a 440 nm (Muccio et al., 1979) que se formaría como consecuencia de la exposición de la Base de Schiff a un entorno acuoso. Cuando se sobrepasa el pH 11,3 aparece una nueva especie con un máximo de absorbancia a 480 nm (forma roja) que de acuerdo con estudios de resonancia de Raman (Druckmann et al., 1982) tendría una BS desprotonada. Esta desprotonación es reversible siempre y cuando no se incremente el pH por encima de 12, ya que es en este momento cuando se empieza a desnaturalizar irreversiblemente la BR. El pK_a de la formación de la especie roja se encuentra por encima de 12,1 en 16 mM KCl (Balashov et al., 1991).

1.9 Movimiento de las hélices y reprotonación de la Base de Schiff

Durante el fotociclo de la BR, los cambios que transcurren inicialmente en el entorno del retinal fotoisomerizado se van transmitiendo a la proteína, incrementando a lo largo del tiempo hasta culminar en movimientos a gran escala (en los intermediarios M, N y O) de algunas de las siete hélices transmembrana (Oesterhelt, 1998; Haupts et al., 1999; Lanyi, 1999).

Estudios de cristalografía electrónica y de rayos X de la proteína nativa y de varios mutantes (Subramaniam et al., 1993; Kamikubo et al., 1996; Luecke et al., 2000; Rouhani et al., 2001), junto con estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) (Steinhoff et al., 1994; Thorgeirsson et al., 1997; Steinhoff et al., 2000; Radzwill et al., 2001) han permitido determinar la existencia de estos movimientos. De este modo se ha visto que durante el intermediario M tardío (M_2 o M_N) el segmento citoplasmático de la hélice F comienza a doblarse hacia fuera, separándose del resto de las hélices. Por contraposición el segmento citoplasmático de la hélice G se dobla hacia el interior. Además de ese movimiento de alejamiento, la hélice F sufre un movimiento de rotación en el sentido contrario a las agujas del reloj (Xiao et al., 2000).

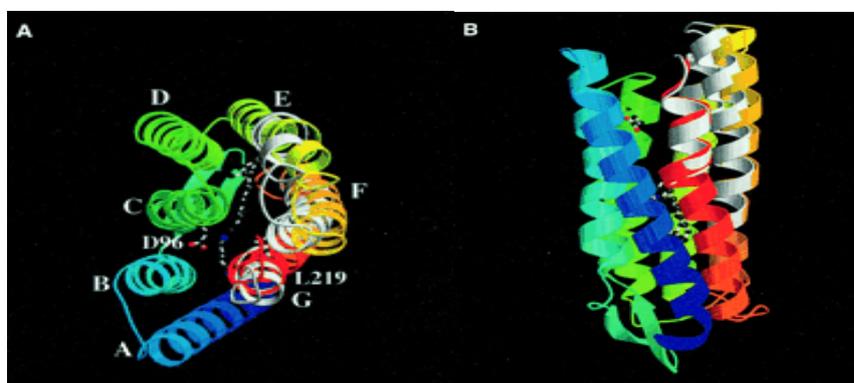


Figura 1.16. Estructura del intermediario N obtenida mediante difracción electrónica. Cada hélice se representa de un color (del azul al rojo) y en blanco se representa el estado basal o estado BR (modelo 1qhj). **(A)** Vista desde el lado citoplasmático. **(B)** Vista lateral. En la figura se puede ver como hay un desplazamiento hacia fuera de las hélices E y F, y un desplazamiento hacia dentro de la hélice G en el intermediario respecto del estado basal (Vonck, 2000).

Estos cambios que ya son patentes en M tardío se acentúan más en el intermediario N (figura 1.16), siendo tan grande el desplazamiento de la hélice F que se cree que no puede darse en todas las moléculas que forman la estructura bidimensional ordenada de la membrana a la vez (Vonck, 2000) sino que se limita a un tercio de las moléculas, es decir, a una molécula de cada trímero. Esto explicaría la

fotocooperatividad que se da en la membrana púrpura. El bucle que une las hélices E y F sufre un desplazamiento de aproximadamente 3 Å debido al movimiento de la hélice F y la hélice E también se desplaza un poco hacia fuera. Este bucle E-F, o bucle 5 de la BR, tiene un cierto grado de estructura secundaria enrollada en el estado basal que se pierde en los intermediarios M-N debido a este movimiento de alejamiento y a la rotación de la hélice F, dejando los residuos situados en el centro del bucle más expuestos al disolvente (Brown et al., 2002).

En el paso de M a N la base de Schiff se reprotona a partir del Asp96, pero estos dos residuos están muy alejados para que el intercambio sea directo y además el interior citoplasmático es mayoritariamente hidrofóbico (Cao et al., 1991; Varo et al., 1995).

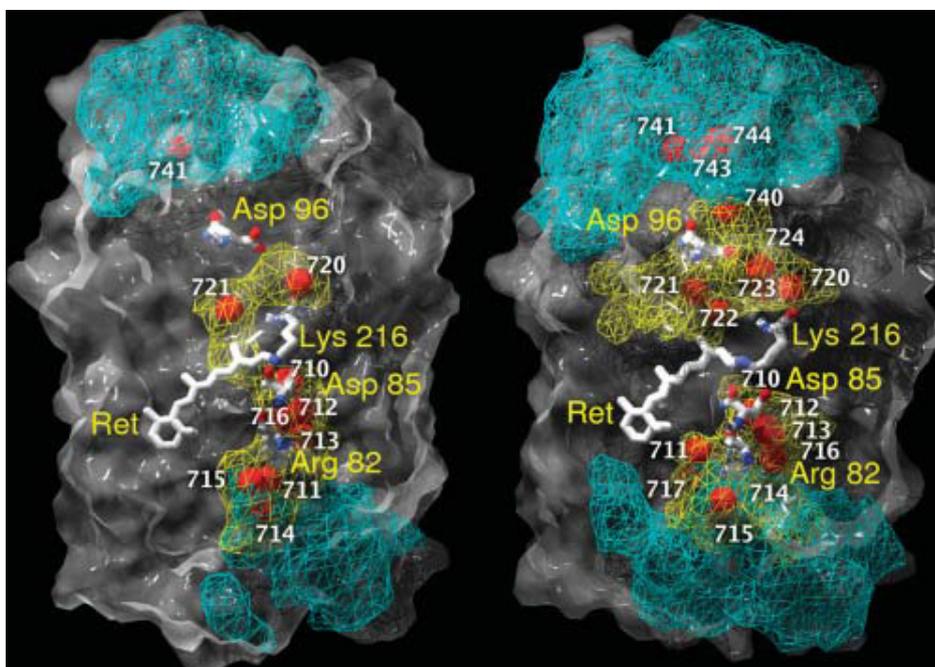


Figura 1.17. Volúmenes accesibles para las moléculas de agua internas en el estado basal (izquierda) y en el intermediario M tardío (derecha) de la BR determinados mediante estudios de dinámica molecular. Las redes amarillas representan la superficie que ocupan las aguas atrapadas, y las azules representan la superficie ocupada por las aguas que pueden difundir. Las bolas rojas representan las aguas que han podido ser determinadas mediante estructuras cristalográficas. (Grudin et al., 2005)

Todos estos movimientos descritos anteriormente permiten que entren moléculas de agua, o que se reorganicen las que se encuentran en el interior de la proteína, creando así un camino para que el protón pueda transferirse desde el Asp96 hasta la base de Schiff. La apertura del lado citoplasmático durante el paso del intermediario M al N provoca una disminución del pK_a del Asp96 y crea un camino para que el protón pueda ser cedido desde este residuo a la base de Schiff y no se pierda en el lado citoplasmático

(Balashov, 2000; Dioumaev et al., 2001). Así, la BR presentaría un incremento transitorio del número de moléculas de agua en su interior durante el proceso de reprotonación $M_2 \rightarrow N \rightarrow O$ respecto al estado basal, que se formaría en el intermediario M tardío (figura 1.17) y que se revertiría durante la recuperación del estado basal siguiendo el camino $O \rightarrow BR_{570}$.

La estructura cristalográfica de un mutante (Rouhani et al., 2001) que representa el intermediario O (O-like) muestra que en el paso de N a O estos cambios se revierten y los segmentos extracelulares de las hélices A, B, D y E se mueven hacia fuera para contrarrestar el movimiento de F y G.

Estos cambios de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático, y la recuperación del estado inicial, forman parte de un mecanismo cuyo objetivo es asegurar vectorialidad del transporte en la BR, que en la bacteria siempre se produce del interior celular al exterior (Hirai et al., 2003).

La naturaleza exacta de estos cambios conformacionales, así como el momento del fotociclo en el cual suceden y como afectan a la función de la proteína, no se conoce con claridad.

Con motivo de estudiar la influencia de la movilidad de las hélices E, F y G en la estructura y función de la BR hemos caracterizado estructural y funcionalmente un mutante con un bucle E-F más largo, y por tanto más flexible, denominado Loop5 y dos mutantes doble cisteína con el objetivo de fijar las hélices E-F (F153C/R175C) y F-G (E166C/A228C) mediante un puente disulfuro.

2 OBJETIVOS

A pesar de que el mecanismo de funcionamiento de la bacteriorodopsina es bien conocido como puede deducirse de la introducción, hay aspectos funcionales que todavía constituyen motivo de profunda discusión o simplemente se desconocen por completo.

La posible implicación del movimiento de las hélices F y G, así como del bucle E-F, en la reprotonación de la bacteriorodopsina es uno de los temas que ha causado más diversidad de opiniones.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la relevancia de la movilidad de estas hélices en la función de la proteína y aportar una visión a un nivel más fisiológico que el que proporcionan las estructuras cristalinas.

Para ello se abordó el problema desde dos puntos de vista distintos y complementarios.

Por un lado se estudió el efecto de aumentar la flexibilidad de las hélices E y F mediante el estudio de la quimera Loop5, en donde se sustituyeron nueve aminoácidos del bucle E-F de la bacteriorodopsina por 22 aminoácidos del bucle homólogo de la rodopsina. Este bucle, al tener un mayor tamaño permite un mayor movimiento de las hélices E y F durante el proceso de reprotonación en caso de que tal movimiento exista.

Por otro lado se restringió el movimiento de estas hélices y de la hélice G para comprobar el efecto de impedir o dificultar su movimiento en la función de la BR.

La estrategia empleada para fijar las hélices fue el diseño y expresión de dos mutantes doble cisteína con el propósito de formar un puente disulfuro interhélice. Además, el estudio de los mutantes con las cisteínas reducidas debería revertir los efectos observados en su forma oxidada, ya que al reducir las cisteínas las hélices podrían moverse libremente.

Estos mutantes fueron:

-F153C(hélice E)/R175C(hélice F)

-E166C(hélice F)/A228C(hélice G)

Al seleccionar los residuos se tuvo en cuenta que estuviesen próximos y bien orientados. También se revisó la bibliografía para comprobar que no estuviesen implicados en la función de la proteína ni fuesen residuos importantes para mantener la estabilidad estructural y así poder atribuir los cambios observados entre la forma reducida de los mutantes, donde las hélices pueden moverse libremente, y la forma oxidada de los mutantes, donde el movimiento de las hélices estaría restringido, al

efecto de bloquear el movimiento de las hélices y no al efecto de la mutación en sí mismo.

Como el mutante F153C/R175C presentó cambios no esperados en su forma reducida, se expresaron los mutantes simples F153C y R175C para poder determinar la influencia de cada mutación por separado. De esta manera se ha podido excluir los efectos causados al sustituir los residuos nativos por cisteínas del efecto de fijar las hélices E y F.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de Bacteriorodopsinas mutantes

El procedimiento para la obtención de BRs mutantes ha sido descrito previamente en publicaciones del grupo (Sanz et al., 1999). En este trabajo se ha utilizado el vector pEF191 en lugar del vector pXL que permite la integración genómica del gen *bop* mutado y, por tanto, la obtención de cepas de mutantes estables y con una producción de proteína similar a la de la proteína nativa (Ferrando et al., 1993).

La obtención de un mutante de Bacteriorodopsina mediante técnicas de biología molecular es un proceso laborioso debido a los numerosos pasos intermedios que requiere y, sobre todo, al lento crecimiento de *H. salinarum*, organismo utilizado para la expresión homóloga de la membrana púrpura (MP). Esta arqueobacteria posee un tiempo de duplicación de 8-10 horas comparado con los 20 minutos de *E. coli*. Esta es la razón por la que se usan cepas de *E. coli* para la obtención de las construcciones de DNA con el gen *bop* mutado. Una vez se obtienen esas construcciones se transforman en *H. salinarum* y se siembran en placa. Las primeras colonias tardan de 20-30 días en aparecer. Asimismo, el cultivo de la Arqueobacteria para la extracción de MP desde una colonia o un glicerinado es un proceso que requiere al menos 3 semanas.

En la figura 3.1 se representa un esquema del proceso de obtención de un mutante.

Las mutaciones se realizan mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como DNA molde un plásmido que contiene el gen *bop* como inserto BamHI/HindIII. Este plásmido, denominado pUCBM20 (Vector 1 en la figura 3.1), es capaz de replicarse en *E. coli* y posee en su secuencia el gen de la β -lactamasa que confiere al plásmido resistencia al antibiótico Ampicilina, permitiendo así la selección de las colonias portadoras del plásmido.

Después de obtener el gen mutado en pUCBM20 se corta con las enzimas BamHI y HindIII y se liga el inserto en el vector lanzadera pEF191 (Vector 2). Este vector posee resistencia a Ampicilina y a Mevilonina lo que permite la selección de colonias transformantes en *E. coli* y *H. salinarum* respectivamente. Así podemos obtener muchas copias de los plásmidos en *E. coli*, que es mucho más rápido y efectivo, para su transformación y expresión en *H. salinarum*. Antes de transformar en *H. salinarum* se secuencian el DNA para confirmar la mutación o mutaciones.

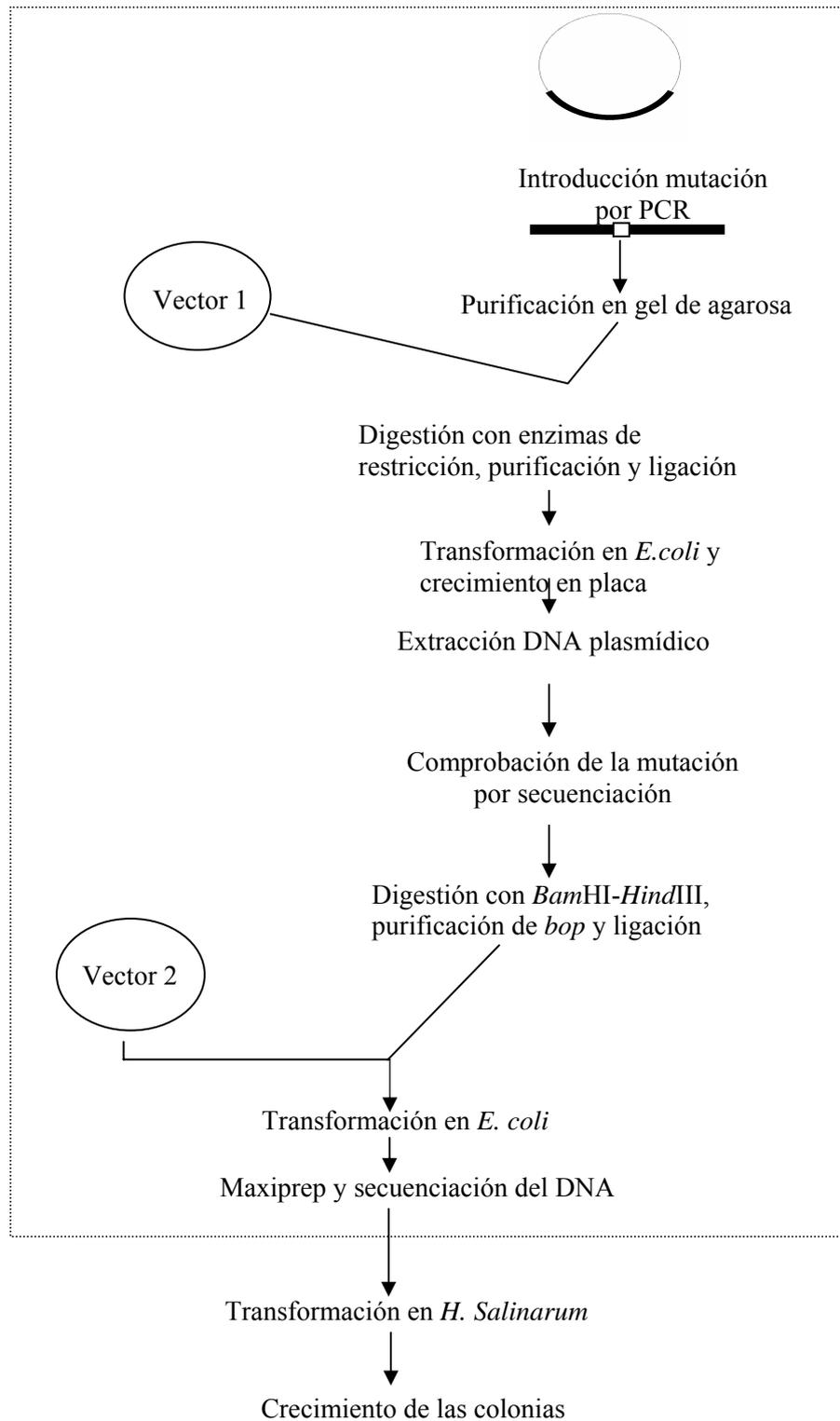


Figura 3.1. Esquema de obtención de mutantes de bacteriorodopsina. Dentro del recuadro se encuentran aquellos procesos que se llevan a cabo en *E. coli*.

En cada transformación se usa el plásmido con el gen silvestre como control positivo y se hace también un control negativo sin DNA para comprobar que no crecen colonias inespecíficas.

El vector pEF191 posee unas secuencias flanqueantes cortas que permiten la integración del plásmido en el sitio homólogo del gen *bop* en el genoma bacteriano.

Una vez se han obtenido las colonias transformadas se crecen en ausencia del antibiótico Mevilonina porque estas colonias ya no son resistentes al antibiótico. Después de la integración genómica del fragmento que codifica para la proteína mutada el resto del plásmido se pierde y, por tanto, se pierde la resistencia a la Mevilonina. Sin embargo, en los cultivos se añade Ampicilina para evitar contaminación por otras especies bacterianas resistentes a medios hipersalinos.

3.2 Material biológico empleado

3.2.1 Cepas bacterianas

Para la obtención de las BR mutantes se han empleado dos especies bacterianas distintas: *Escherichia coli* y *Halobacterium salinarum*.

La primera se ha usado como una herramienta para llevar a cabo todos los procesos de tecnología del DNA recombinante necesarios para obtener los mutantes de BR, ya que en esta bacteria la metodología es más conocida y el crecimiento mucho más rápido, con un tiempo de duplicación de 20 minutos comparado con las 8-10 horas necesarias para *H. salinarum* (Oesterhelt et al., 1974). La segunda especie se utiliza para la expresión de BR en su entorno natural.

Las cepas que se han utilizado son:

De *E.coli*:

DH5 α : Su genotipo es: F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ -. Esta especie permite la transformación de plásmidos de gran tamaño y la selección mediante el sistema β -galactosidasa.

De *H.salinarum*:

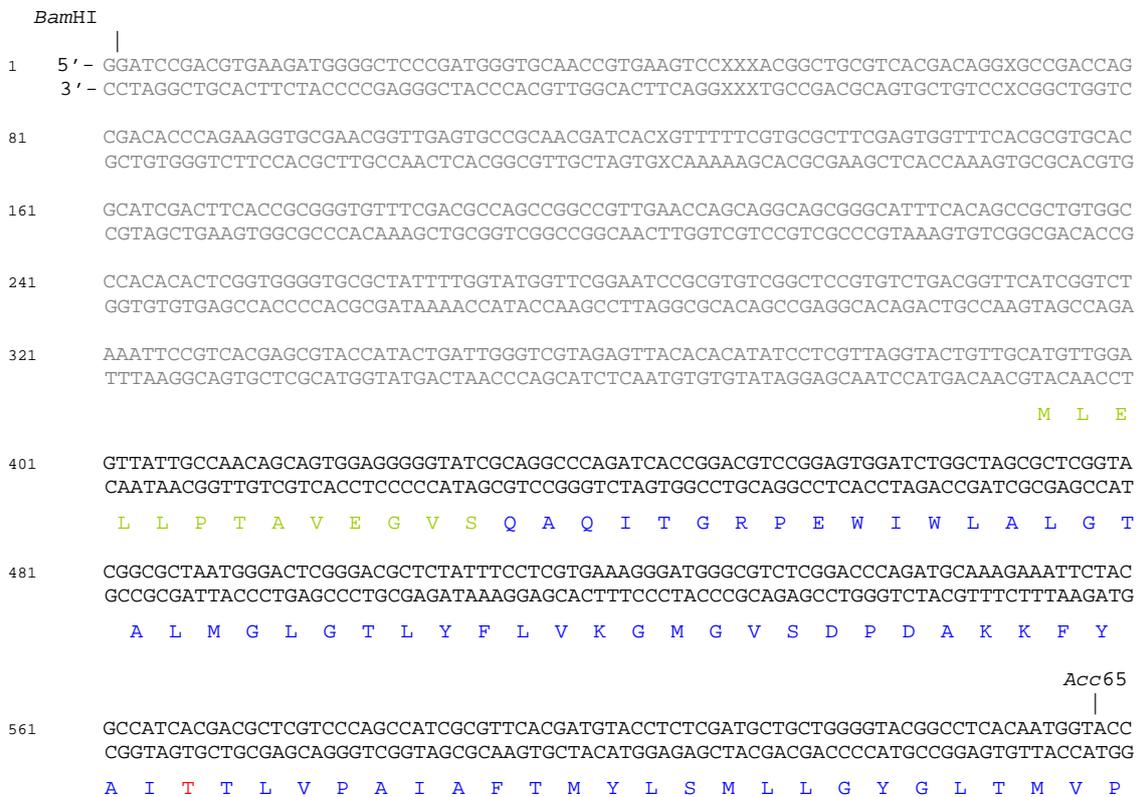
L33: Esta cepa tiene insertado en el gen de la bacteriorodopsina, gen *bop*, el elemento móvil ISH2 que impide su expresión (Pfeifer et al., 1984). Por tanto es una cepa BR⁻, no produce membrana púrpura, lo cual permite expresar BR mutantes mediante el uso de plásmidos.

S-9: A partir de esta cepa se extrae la bR nativa utilizada como control en todos los estudios hechos en BR mutantes. Es una cepa modificada donde se ha eliminado la capacidad de la Halobacteria de producir vacuolas gasíferas y otros pigmentos diferentes de bR que dificulten la extracción de la proteína. Además esta cepa posee un alto rendimiento de producción de membrana púrpura favoreciendo la obtención de grandes cantidades de bR en cada extracción.

3.2.2 Gen bop

El gen de la bacterioopsina, gen *bop*, ha sido proporcionado por el Dr. Needleman (Wayne State University School of Medicine) clonado en el plásmido pSELECTTM-1q (Promega). El gen está situado en un fragmento de 1,2 Kbases entre las dianas *Bam*HI y *Hind*III. El fragmento se ha extraído de este plásmido y clonado en los plásmidos especificados en la apartado 3.2.3.

La secuencia nucleotídica de este gen está descrita en Genebank y corresponde a Dunn et al. (1981) En la figura 3.2 se representa tanto la secuencia nucleotídica del gen *bop* como la aminoacídica de la proteína.



```

641  GTTCGGTGGGGAGCAAACCCCATCTACTGGGCGGGTACGCTGACTGGCTGTTCAACCACCCGCTGTTGTGTTAGACC
    CAAGCCACCCTCGTTTTGGGGTAGATGACCCGCGCCATGCGACTGACCGACAAGTGGTGCGGGGACAACAACAATCTGG
    F G G E Q N P I Y W A R Y A D W L F T T P L L L L D L
721  TCGCGTTGCTCGTTGACGCGGATCAGGGAACGATCCTTGCCTCGTTCGGTGCCGACGGCATCATGATCGGGACCGGCTG
    AGCGCAACGAGCAACTGCGCCTAGTCCCTTGTCTAGGAACGCGAGCAGCCACGGCTGCCGTAGTACTAGCCCTGGCCGGAC
    A L L V D A D Q G T I L A L V G A D G I M I G T G L
          AccI
          |
800  GTCGGCGCACTGACGAAGGTCTACTCGTACCGCTTCGTGTGGTGGGGGATCAGCACCGCAGCGATGCTGTACATCCTGTA
    CAGCCGCGTGACTGCTTCCAGATGAGCATGGCGAAGCACACCACCGCTAGTTCGTGGCGTGCCTACGACATGTAGGACAT
    V G A L T K V Y S Y R F V W W A I S T A A M L Y I L Y
881  CGTGTGTTCTTCGGGTTACCTCGAAGGCCGAAAGCATGCGCCCCGAGGTGCGATCCACGTTCAAAGTACTGCGTAACG
    GCACGACAAGAAGCCCAAGTGGAGCTTCCGGCTTTCGTACGCGGGGCTCCAGCGTAGGTGCAAGTTTCATGACGCATTGC
    V L F F G F T S K A E S M R P E V A S T F K V L R N V
          Loop 5
961  TTACCGTTGTTGTTGTTGGTCCGCGTATCCCGTTCGTGTGGCTGATCGGCAGCGAAGGTGCGGGAATCGTGCCGCTGAACATC
    AATGGCAACAACAACCAGGCGCATAGGGCAGCACACCGACTAGCCGTCGCTTCCACGCCCTTAGCACGGCGACTTGTAG
    T V V L W S A Y P V V W L I G S E G A G I V P L N I
1041 GAGACGCTGCTGTTTCATGGTGCTTGACGTGAGCGCGAAGGTGCGGCTTCGGGCTCATCCTCCTGCGCAGTCGTGCGATCCTT
    CTCTGCGACGACAAGTACCACGAACTGCACTCGCGCTTCCAGCCGAAGCCCGAGTAGGAGGACGCGTCAGCACGCTAGAA
    E T L L F M V L D V S A K V G F G L I L L R S R A I F
          HindIII
          |
1121 CGGCGAAGCCGAAGCGCGGAGCCGTCGCGCGGCGACGGCGCGGCGCGACCGAGCGACTGATCTAGAAGCTT - 3'
    GCCGCTTCGGCTTCGCGGCTCGGCAGGCGGCGCGTCCGCGCGGCGGCTGGTTCGCTGACTAGATCTTCGAA - 5'
    G E A E A P E P S A G D G A A A T S D STOP

```

Figura 3.2. Secuencia del fragmento de 1,2 Kb que contiene el gen de la bacteriorodopsina. La secuencia nucleotídica en negro corresponde a la secuencia conocida. Las letras en azul corresponden a la secuencia aminoacídica de la BR, las verdes son los aminoácidos escindidos durante el procesamiento del precursor de la BR (Dunn et al., 1981). En rojo se encuentran indicados los aminoácidos que han sido mutados en este trabajo.

3.2.3 Vectores

pUCBM20: Es un plásmido derivado del pUC18 al que se le ha añadido una secuencia de múltiple inserción (figura 3.3). Este plásmido confiere al portador resistencia al antibiótico ampicilina y contiene un fragmento del gen *lacZ* de *E.coli*, permitiendo así una selección de las colonias transformantes para el gen mediante el sistema β -galactosidasa. El gen de la β -lactamasa es el responsable de la resistencia a ampicilina, clonado en el plásmido, es responsable de la expresión de esta enzima que degrada el antibiótico.

pEF191: Plásmido lanzadera cedido por el Dr. Mathias Lubben (Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr Universität, Bochum). Es otro plásmido de expresión en *H.salinarum* que también es capaz de replicarse en *E.coli*. Este plásmido tiene la peculiaridad de que es capaz de integrar el gen de la bOp en el genoma de *H.*

salinarum, permitiendo así obtener unos niveles de expresión similares a los que se obtienen para la proteína silvestre (Ferrando et al., 1993).

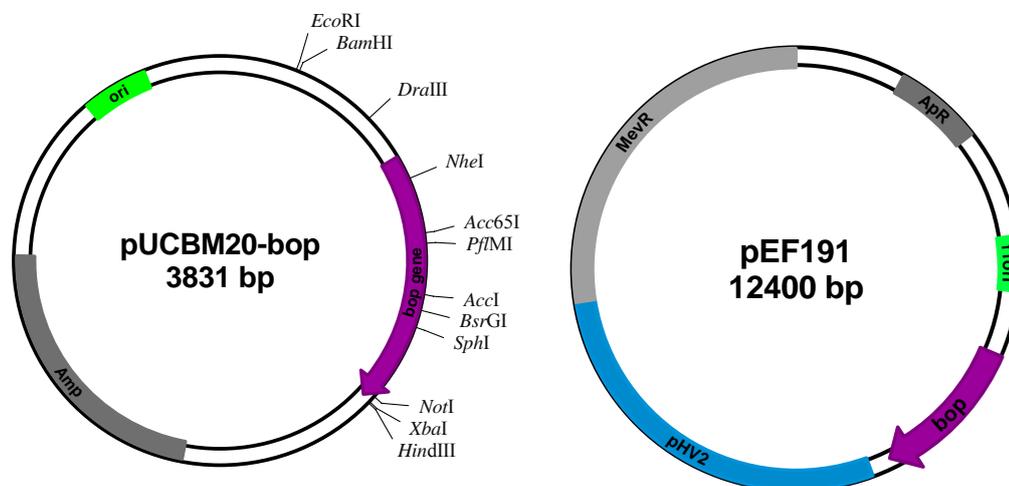


Figura 3.3. Esquema de los plásmidos pUCBM20 y pEF191. En el primero están representados algunos sitios de corte único que son de gran utilidad para la manipulación del gen bop.

3.2.4 Medios de cultivo y antibióticos utilizados

a) Medio de cultivo de *E.coli*

Medio líquido LB:	Bactotripton	10 g
	Extracto de levadura	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O destilada	q.s.p 1 l
	Ajustar el pH a 7,5 con NaOH 2 M.	

Medio agar LB: A un litro de medio líquido LB se le añaden 15 g de Bactoagar. Las placas se suplementan con 50 µg/ml de ampicilina.

b) Medio de cultivo de *H.salinarum*

Medio C:	NaCl	250 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20 g
	Citrato sódico	3 g
	KCl	2 g

CaCl ₂	0,2 g
Tris 2M (pH 7,2)	25 ml
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
H ₂ O	q.s.p 1 l

Para hacer placas se añaden 15 g de bactoagarosa y se suplementa con 150 g de sacarosa y Mevilonina (12,5 µg/ml). El pH se ajusta a 7,2.

Para hacer un cultivo de proteína a gran escala se sustituye la triptona y el extracto de levadura por peptona (10 g por litro de medio), ya que la peptona favorece la expresión de la proteína.

c) Antibióticos.

*Ampicilina: este antibiótico se utiliza para seleccionar aquellas células de la cepa de *E.coli* TG1 que contienen el plásmido pUCBM20. La concentración de trabajo es de 50 µg/ml. Es un antibiótico bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de peptidoglicano bacteriana.

*Mevilonina: empleado para la selección de bacterias de *E.coli* y *H.salinarum* transformantes para el plásmido pEF191. La concentración de trabajo es de 12,5 µg/ml. Es un antibiótico bactericida, inhibidor de la HMG-CoA reductasa, que es responsable de la biosíntesis de esterol en el citosol.

3.2.5 Cultivo y conservación bacteriana

a) Cultivo bacteriano:

El cultivo tanto de *E.coli* como de *H.salinarum* se realiza bajo condiciones de esterilidad para evitar posibles contaminaciones.

***E.coli*:** Las células se inoculan en medio LB y se incuban a 37° C con una agitación de 300 r.p.m. durante unas 12 horas. Cuando se siembran en placa, éstas se mantienen también en la estufa a 37° C. Se usa Ampicilina para seleccionar las colonias que han incorporado el plásmido pUCBM20 o pEF191.

***H.salinarum*:**

*Escalado del crecimiento: Las células procedentes de una colonia o un glicerinado son inoculadas en 2 ml de medio hipersalino C y se incuban a 42° C y con una agitación de 300 r.p.m.. Una vez que han crecido las células (5-6 días) se inoculan los 2 ml en 250 ml de medio C. Cuando este precultivo alcanza una OD₅₅₀ de 0,8, es inoculado en 10 l de medio C para producir masivamente membrana púrpura.

*Producción de membrana púrpura: El cultivo se realiza en un erlenmeyer de 20 l con 10 l de medio C y en presencia de Ampicilina para evitar contaminaciones ya que este antibiótico no afecta a la Arqueobacteria. La temperatura se mantiene sobre los 40° C mediante un foco Philips Spotone de 120 W, con agitación magnética y aireación mediante una bomba (Modelo 7530-50, Cole-Parmer Instrument Company) de aproximadamente 228 l/min. El cultivo se realiza en presencia de iluminación para inducir la síntesis de MP. Cuando el cultivo llega a la fase estacionaria (OD₆₀₀ 0.8-1) se retira el suministro de aire y se mantiene la iluminación durante cinco días, tiempo establecido como óptimo para la máxima producción de membrana púrpura. Pasados estos días se procede a la extracción de la MP (ver apartado 3.4.1).

b) Conservación de los cultivos

*En placa o líquido: *E.coli* se conserva bajo estas condiciones a 4° C durante un máximo de diez días, mientras que *H.salinarum* se puede conservar hasta un mes.

*Glicerinado: ambas especies bacterianas se pueden guardar a -80° C en un 15% de glicerol durante años.

3.3 Técnicas de DNA recombinante

3.3.1 Mutagénesis dirigida por PCR

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han introducido mutaciones puntuales en el gen *bop*. Este método está basado en el de Landt et al. (1990), y se ha seguido el procedimiento descrito por Juncosa et al. (1994).

Partiendo del dsDNA molde, se necesitan dos cebadores, oligonucleótidos, que se encuentren en sentido inverso y confluyan en la región a mutar. Dependiendo del lugar de mutación dentro del gen *bop* se utilizan diferentes cebadores, y dependiendo de la posición relativa se hará una o dos rondas de PCR.

Molde:

pUCBM20-*bop*: Plásmido en el cual está subclonado el gen *bop* entero entre las dianas *Bam*HI y *Hind*III.

Cebadores:

Oligonucleótidos mutagénicos: para el diseño de los oligonucleótidos se han tenido en cuenta el uso de codones de al *H.salinarum* y que la mutación estuviese flanqueada por 13-15 nucleótidos en cada uno de sus extremos para asegurar la correcta hibridación del oligonucleótido al DNA molde.

Oligonucleótidos que contienen un sitio de reconocimiento para una endonucleasa: son cebadores que llevan algunos de los sitios de restricción que están dentro o en los extremos del gen y que facilitarán la digestión posterior del gen silvestre y la introducción del fragmento mutado previamente digerido. Se eligen por cercanía a la zona que se quiere mutar y por ser únicos en el plásmido.

PCR:

Para introducir las dobles mutaciones en el gen se han realizado dos rondas de PCR. En la primera ronda se hacen dos muestras, una para cada mutación, utilizando en cada caso un cebador mutagénico y un cebador próximo a la mutación y que contenga un sitio de restricción único. En la segunda PCR se usan los productos de la primera ronda como cebadores y así se obtiene el gen completo mutado.

Los productos de PCR han sido comprobados mediante gel de agarosa comparando su tamaño con un marcador de pesos moleculares como referencia y purificados mediante un kit de Quiagen.

Los mutantes simples han sido obtenidos a partir de los mutantes dobles mediante digestión enzimática y clonación en el vector pUCBM20-*bop*.

La DNA polimerasa utilizada ha sido la Deep Vent (New England Biolabs) y el termociclador el PCR-Minicycler.

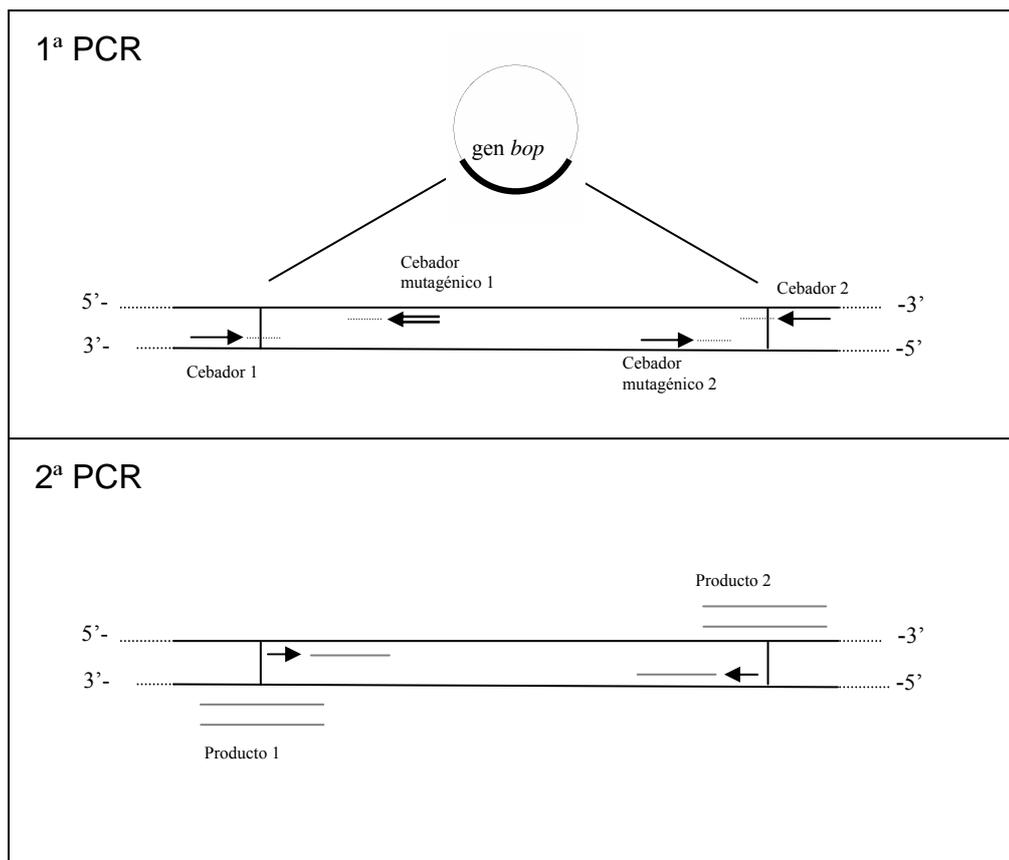


Figura 3.4. Esquema de obtención de un doble mutante mediante PCR utilizando el vector PUCBM20-*bop* como DNA molde.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades utilizadas para llevar a cabo la PCR.

Tabla 3 -1. Componentes añadidos a cada PCR.

	Primera PCR	Segona PCR
Tampón 10 X Deep Vent	5 µl	5 µl
DNA molde (10 ng/µl)	2 µl	2 µl
Cebador mutagénico (5 pmol/µl)	4 µl	--
Cebador flanqueante (5pmol/µl)	4 µl	--
Producto 1 de la 1ª PCR	--	16 µl
Producto 2 de la 1ª PCR	--	16 µl
Nucleótidos (10 mM)	1 µl	1 µl
Polimerasa Deep Vent	0,5 µl	0,5 µl
Sulfato de Magnesio (100 mM)	2 µl	2 µl
H ₂ O estéril	q.s.p 50 µl	q.s.p 50 µl

La programación del termociclador ha sido la siguiente, a pesar de que estas condiciones han sufrido pequeños cambios debido a las diversas T_m de hibridación de los diferentes oligonucleótidos utilizados.

1ª PCR: 94°C, 5' + 30 x (94° C, 1',15" + 55° C, 1' + 72° C, 1') + 72° C, 10' + 4° C

2ª PCR: 94°C, 5' + 30 x (94° C, 1'15" + 45° C, 1'15" + 72° C, 1'45") + 72° C 10' + 4° C

3.3.2 Manipulaciones enzimáticas.

3.3.2.1 Digestiones con enzimas de restricción.

El volumen total de digestión es de unos 20 µl en los cuales la cantidad de DNA a digerir es de 0,5 - 10 µg. Se añade el tampón adecuado dependiendo de la enzima de restricción utilizada, y la enzima a razón de una unidad por µg de DNA. Se digiere durante una hora a 37°C.

Cuando se ha de hacer una digestión con dos o más enzimas de restricción a la vez, pueden utilizarse simultáneamente si comparten el mismo tampón de digestión, en caso contrario, se ha de digerir con cada enzima separadamente purificando el DNA entre cada una de las digestiones.

3.3.2.2 Ligación del DNA

La ligación de diferentes fragmentos de DNA se lleva a cabo utilizando la ligasa del bacteriofago T4. Se ponen las proporciones adecuadas de los diferentes fragmentos de DNA y se añade el tampón de ligación y 1 µl de ligasa en una proporción de una unidad de ligasa por µg de DNA. La mezcla se incuba durante toda la noche a 16°C. El DNA obtenido se transforma directamente en *E.coli* (ver apartado 3.3.6).

3.3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis de DNA en geles de agarosa es una técnica rutinaria para separar y extraer fragmentos de DNA, así como para estimar su concentración y pureza. Dependiendo del tamaño molecular de los fragmentos de DNA a separar la concentración de agarosa será diferente, entre 0,8-2%.

1: Se pesa la cantidad de agarosa adecuada para el tamaño del DNA y se disuelve calentando en tampón TAE 1X.

TAE 50X	Tris-base	242 g
	EDTA 0,5 M (pH 8)	100 ml
	Ácido acético glacial	57,1 ml
	H ₂ O destilada	q.s.p 1 l

2: Se vierte sobre el soporte de electroforesis previamente sellado con cinta adhesiva y se coloca un peine para crear los pozos.

3: Una vez gelificado se retira el peine y la cinta adhesiva y se coloca el soporte en la cubeta de electroforesis llenándola con tampón TAE 1X.

4: En cada uno de los pozos se cargan las diferentes muestras de DNA a las que previamente se ha añadido 2 µl de tampón de carga.

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

Las muestras se cargan junto con un marcador de peso molecular para poder determinar el tamaño de las bandas del DNA de estudio. Los marcadores utilizados en este trabajo han sido el marcador VI de Boehringer Mannheim y 1 Kb ladder de New England Biolabs.

5: Las muestras de DNA se resuelven a 50-100V, dependiendo de las características del DNA y del gel.

6: El gel se tiñe con EtBr (0,5 µg/ml) en tampón TAE 1X durante 20 minutos. Pasado este tiempo las bandas se visualizan mediante radiación UV.

3.3.4 Purificación de DNA

En ocasiones es necesario recuperar el DNA que ha sido resuelto en una electroforesis de agarosa ya sea porque es el resultado de una digestión que se quiere subclonar en un plásmido, o bien porque es el resultado de una PCR y se quiere purificar del resto de aditivos del proceso.

En este trabajo se ha utilizado el kit de extracción de DNA por columna de Quiagen. El protocolo utilizado es el descrito por el fabricante.

3.3.5 Competencia de células de *E.coli*

El método utilizado para la obtención de células competentes es una adaptación de Sambrook et al., (1989) aplicado a la cepa TG1 de *E.coli*. Este paso es necesario para que las células se puedan transformar con DNA (ver apartado 3.3.6).

1: Se inocula en 30 ml de medio LB 100 µl de TG1 glicerinado y se incuba a 37° C y con agitación hasta que la OD₅₅₀ sea 0,6 (10⁷-10⁸ células/ml).

2: Se mantiene en hielo durante 10 minutos para frenar el crecimiento celular.

- 3: Se centrifuga a 1000 g, 4° C durante 10 minutos.
- 4: Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 15 ml de CaCl₂ 50mM.
- 5: Se mantiene en hielo durante 20 minutos.
- 6: Se vuelve a centrifugar.
- 7: Se elimina el sobrenadante y esta vez el sedimento se resuspende con 3ml de CaCl₂ 50 mM.
- 8: Se mantiene en hielo durante una hora.
- 9: Se añade glicerol hasta una concentración final de 15 % (v/v). Se alicuota en 100 µl y se guarda a -80° C.

3.3.6 Transformación de células competentes de *E.coli*

El método empleado es el descrito por Sambrook et al. (1989), con alguna pequeña variación, y consiste en la introducción de DNA dentro de la célula mediante choque térmico. Para que se pueda llevar a cabo las células han de ser competentes (ver apartado 3.3.5).

- 1: Se descongela una alícuota de células competentes de *E.coli*, manteniéndolas en hielo.
- 2: Se añaden unos 50 ng de DNA y se incuba en hielo durante 30 minutos.
- 3: Se incuba durante 2 minutos en un baño a 42° C para producir un choque térmico.
- 4: Se añaden 800 µl de medio LB y se incuba a 37° C durante media hora para que se exprese la resistencia a ampicilina.
- 5: Se siembran 200 µl en placas con ampicilina.
- 6: Se incuban las placas a 37° C durante toda la noche.

3.3.7 Extracción del DNA plasmídico en *E.coli* y secuenciación

Para extraer el DNA de *E.coli* se han utilizado kits de extracción de DNA por columna de Quiagen, tanto para minipreps como para maxipreps, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para hacer una miniprep se ha partido de cultivos bacterianos de 5 ml y para una maxiprep se han utilizado cultivos de 250 ml.

Mediante la secuenciación por PCR del DNA se comprueban tanto la correcta introducción de las mutaciones en el gen *bop* como la posible existencia de otras mutaciones no deseadas que se hayan podido producir durante el proceso de mutación. Para secuenciar todo el gen se hacen dos secuenciaciones utilizando dos cebadores que hibridan en extremos opuestos del gen y unos nucleótidos antes de la secuencia del

mismo, uno en sentido 5' y otro en sentido 3'. Estos nucleótidos se denominan bRseq5 y bRseq3.

La secuenciación se ha llevado a cabo en el Servei de Genòmica de la UAB. La cantidad de DNA necesaria para una reacción de secuenciación es de 1.000 ng y la muestra ha de tener una concentración mínima de 100 ng/μl. La concentración de los cebadores ha de ser de 5 pmol/μl y se necesita 1 μl para cada reacción.

3.3.8 Competencia y transformación de células de *H.salinarum*

El método utilizado es el descrito por Yan et al. (1992), y adaptado por Ni et al. (1990).

1: Se inocula la cepa L33 de *H.salinarum* en unos 30 ml de medio C y se incuba a 42° C hasta que la OD₅₅₀ es de 1,0-1,5; al cabo de 5 días aproximadamente.

2: Se centrifugan 1,5 ml del cultivo a 700 g durante 12 minutos.

3: El sedimento se resuspende en 200 μl de tampón de esferoplastos.

Tampón de esferoplastos:	NaCl	2 M
	KCl	27 mM
	Tris (pH 8,75)	50 mM
	Sacarosa	15 %
	H ₂ O miliQ	

4: Se añaden 20 μl de EDTA 0,5 M (pH 8) en tampón de esferoplastos y 10 μg de DNA en un volumen de 15 μl y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.

5: Se añaden 230 μl de PEG600 - tampón de esferoplastos (6 vol/4 vol), se homogeniza suavemente y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.

6: Se añade 1 ml de sales de regeneración y se centrifuga a 700 g durante 15 minutos.

Sales de regeneración:	NaCl	4,3 M
	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	80 mM
	KCl	27 mM
	CaCl ₂	1,4 mM
	Citrato Sódico	10 mM
	Tris (pH 7,2)	50 mM
	Sacarosa	15 %
	H ₂ O MilliQ	

7: Si el proceso ha sido correcto, después de la centrifugación se observa un pequeño sedimento, en caso contrario se habrá producido lisis celular. Se retira el sobrenadante y se añade 1 ml de medio C con sacarosa.

8: Se incuba a 42° C durante toda la noche en tubos de cultivo de 15 ml.

9: Se siembra en placas de medio C-sacarosa que contengan mevilonina (12,5 µg/ml). Se incuba a 42° C y en oscuridad.

Pasado un tiempo de incubación de unos 10 días se comienzan a observar colonias de dos clases:

Blanquecinas: colonias formadas a partir de células que no se han transformado con el DNA, y que por tanto no sintetizan membrana púrpura, y que han crecido en lugares de la placa donde la concentración de antibiótico no era suficiente como para inhibir su crecimiento.

Púrpuras: estas son las colonias que han sido transformadas con el DNA, ya que al expresar la BR han adquirido esta coloración. Al principio la coloración es muy débil debido a que la expresión de proteína se inhibe por la presencia del antibiótico y por la ausencia de luz. Para que las colonias puedan tener más color y distinguirse mejor de las que no se han transformado se iluminan durante unos días.

3.4 Manipulación de la membrana púrpura

3.4.1 Extracción de la membrana púrpura de *H.salinarum*

Una vez que el cultivo celular ha llegado a la fase estacionaria, se retira el suministro de aire durante cinco días para favorecer la síntesis de membrana púrpura (ver apartado 3.2.5). Una vez pasado este tiempo se procede a la extracción de la membrana. El método empleado es una adaptación del descrito por Oesterhelt y Stoeckenius (1974).

1: Se centrifuga el cultivo a 12.000 g, 10° C, 15 min.

2: Se resuspenden los sedimentos en un volumen total de 120 ml de NaCl 4 M.

3: Se añade 5 mg de DNasa para reducir la viscosidad de la muestra.

4: Se dializa durante toda la noche contra 0,1 M NaCl para que se produzca la lisis celular.

5: Se centrifuga a 4° C máx 20° C, 30 min, 65.000 g.

6: El sedimento está constituido por una parte blanquecina correspondiente a restos celulares, una parte púrpura constituida mayoritariamente por la MP, y una capa más superficial del sedimento que junto con el sobrenadante rojizo componen los restos de

otros pigmentos como la bacterioruberina. Se recupera la parte púrpura y se hacen tres lavados más con NaCl 0,1 M para eliminar los restos celulares y pigmentos. Entre lavado y lavado la muestra es homogeneizada para asegurar la completa eliminación de los pigmentos.

7: Se hacen tres o cuatro lavados con agua destilada hasta que se observa que el sobrenadante es transparente.

8: Se resuspende el sedimento en el volumen mínimo de agua destilada (10-20 ml) para poder obtener una suspensión concentrada de proteína.

9: Se realiza un espectro de absorción entre 250 y 800 nm tanto para comprobar la ausencia de otros pigmentos diferentes de la MP como para estimar la concentración de BR obtenida (ver apartado 3.5.1).

10: La extracción se divide en fracciones de 1 ml y se guarda a -20°C.

3.4.2 Tratamiento de los mutantes con cisteína

Los mutantes con una o dos cisteínas se han purificado en presencia de un agente reductor para evitar la oxidación de las cisteínas. Para ello se lavan con DTT 1 mM los fragmentos de MP a partir del paso 7 de la purificación (ver apartado 3.4.1) y se mantiene esa concentración de DTT durante los distintos experimentos de caracterización del mutante.

Para promover la formación de un puente disulfuro en los mutantes en los que se han introducido dos cisteínas, se expone la proteína a una oxidación con glutatión en su forma oxidada (GSSG), denominado glutatión disulfuro. El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por γ -L-glutámico-L-cisteína-L-glicina que al oxidarse forma un puente disulfuro con otra molécula de GSH dando lugar a la forma oxidada GSSG. Este compuesto tiene poder oxidante y puede reaccionar con los grupos tioles libres (-SH) para revertir a su forma reducida GSH.

Durante el proceso de purificación y después de lavar los extractos proteicos con NaCl 0.1 M (ver apartado 3.4.1) se añade una disolución de GSSG 1 mM y se deja toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hacen tres o cuatro lavados con agua destilada para eliminar el GSSG y las impurezas que puedan quedar con los fragmentos de MP.

3.4.3 Determinación de la concentración y pureza de la proteína

3.4.3.1 Determinación de la concentración de bacteriorodopsina

A la muestra de bacteriorodopsina se le realiza un espectro de absorción entre 250 y 800 nm para determinar el valor de la absorbancia a 568 nm, punto en el que se encuentra el máximo de absorbancia de la bacteriorodopsina adaptada a la luz (ver apartado 3.5.1). Este barrido permite restar la absorbancia debida a la dispersión de la muestra mediante el trazado de una línea base, determinación del valor de esta línea a 568 nm y resta de este valor al valor de la absorbancia de la muestra en ese punto.

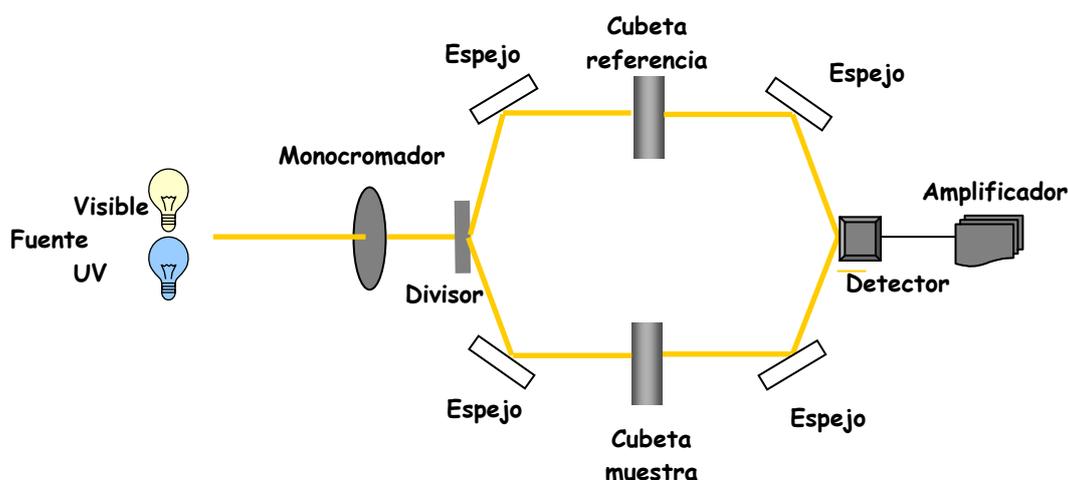


Figura 3.5. Esquema de funcionamiento del espectrofotómetro.

Mediante la fórmula de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon \cdot cm \cdot c$) se calcula la concentración de la proteína, teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar (ϵ) para la BR adaptada a la luz es de $63.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y de $58.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la adaptada a la oscuridad. Es por eso que antes de realizar el espectro de absorbancia se debe iluminar la muestra durante un minuto.

Los espectros de absorbancia se han realizado en un espectrofotómetro Varian Cary 3 de doble cubeta esquematizado en la figura 3.5.

Esfera integradora

La esfera integradora se puede colocar en el espectrofotómetro de UV-visible en lugar de las celdas tradicionales. Es una esfera con un interior completamente blanco donde se colocan la cubeta de la muestra y la de referencia. Una vez que el haz de luz incide sobre la cubeta de la muestra todos los rayos que son dispersados por la muestra

se reflejan en las paredes de la esfera y van a parar al detector. De esta manera queda anulado cualquier efecto de dispersión de la luz y se evita la pérdida de señal.

3.4.3.2 *Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida*

La electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida con SDS permite el análisis de mezclas de proteínas (Laemmli, 1970). Los geles están constituidos por polímeros de acrilamida entrecruzados con bisacrilamida. El SDS permite deshacer el plegamiento de las proteínas y además las carga negativamente para que puedan migrar hacia el polo positivo en función de su peso molecular.

Esta técnica nos permite determinar la pureza de la BR así como la posible pérdida del extremo C-terminal que a veces sucede con el tiempo cuando la proteína no está congelada, sobre todo en algunos mutantes con una estructura más relajada.

Cuando la proteína tiene un elevado grado de pureza en el gel aparece una única banda a una altura ligeramente inferior a 26kDa, peso molecular de la BR. La BR tiene un peso molecular aparente inferior a su peso real en los geles de poliacrilamida.

Para una correcta separación de las proteínas se preparan dos tipos de geles: gel separador y gel apilador.

Gel separador o inferior: El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida de este gel depende del peso molecular de las proteínas a separar. En este caso se ha utilizado un porcentaje del 15 %.

Acrilamida/bisacrilamida 30 % / 0,8 %	2,25 ml
Tampón 4X (pH 8, 8) (1,5 M Tris + 0,4 % SDS)	1,5 ml
H ₂ O	q.s.p 6 ml
PSA 15 %	24 µl
TEMED	3 µl

Gel apilador o superior: Mediante este gel se concentra la muestra en un pequeño frente sobre el gel separador, de esta manera todas las muestras entran en el segundo gel simultáneamente. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida en este caso es del 4 %.

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

Una vez polimerizado el gel se introduce dentro de la cubeta de electroforesis y se añade el tampón de electroforesis.

Tampón de electroforesis 10 X:

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

A las muestras de proteína se les añade un tampón de carga y se hierven durante cinco minutos para desnaturalizarlas y solubilizarlas.

Tampón de carga 4 X:

Tris-HCl	200 mM (pH 6,8)
SDS	8 %
Azul de bromofenol	0,4 %
Glicerol	40 %

Se cargan las muestras en el gel y el marcador de peso molecular PPPS Dual Color de Bio-Rad. Se resuelven a 50 mV durante unos 45 minutos.

Para visualizar y fijar las bandas de proteína se tiñe el gel con tinción de Coomassie R-250 durante 30 minutos.

Coomassie R-250	0,1 %
Metanol	40 %
Ácido acético	10 %
H ₂ O	50 %

Para eliminar el exceso de tinción se usa la siguiente solución desteñidora:

Metanol	40 %
Ácido acético	10 %
H ₂ O	50 %

3.4.4 Determinación fluorimétrica del estado de oxidación de las cisteínas

Para determinar la posible formación de un puente disulfuro en los mutantes con dos cisteínas se ha utilizado una sonda fluorescente, el Mians, que reacciona específicamente con los grupos –SH libres. El Mians, 2-(4'-maleimidilnilino)naftalen-6-ácido sulfónico (Molecular Probes), presenta muy poca intensidad de fluorescencia cuando reacciona con una molécula pequeña, o con el bucle o un extremo de una

proteína expuesto al disolvente. Sin embargo en ambientes hidrofóbicos la intensidad de fluorescencia es elevada y proporcional al número de cisteínas con las que reacciona, lo que hace que sea adecuada para marcar residuos que se encuentran localizados en las hélices transmembrana.

Las muestras se han preparado a concentración 2 μM aproximadamente en tampón fosfato 50 mM pH 7 y el Mians se ha añadido a una concentración final 24 μM . Los stocks de proteína con DTT 1mM han sido lavados con agua destilada, ya que el DTT reacciona con la sonda, y utilizados inmediatamente para evitar su oxidación. Para hacer los lavados de proteína se ha usado una microultracentrífuga modelo Sorvall Discovery M150 (80000 rpm, 5 min) Las medidas de fluorescencia se han hecho con un espectrofluorímetro PTI QuantaMaster (Photon Technology International, Inc.), a 20° C, utilizando dos rendijas de 1 y 5 nm para la excitación de las muestra y otras dos rendijas de 4 nm cada una para la emisión. Las mediciones se han hecho en cubetas de 1,5 ml de 1 cm de paso de luz en las que se ha trabajado con volúmenes de 1 ml con agitación constante.

Los espectros han sido adquiridos y analizados con el programa Felix 32TM. Para los Trp se ha usado una longitud de onda de excitación 290 nm y su emisión se ha medido en el intervalo 300-500 nm; y en el caso del Mians se ha excitado la muestra a 325 nm y registrado su emisión en el intervalo 350-600 nm, siendo 430 nm aproximadamente el máximo de emisión del Mians en el entorno de la BR. Para seguir la cinética de reacción del Mians con las cisteínas intramoleculares se han usado 325 y 430 nm para la excitación y emisión respectivamente.

3.5 Estudios estructurales

3.5.1 Adaptación luz-oscuridad

La adaptación a la oscuridad de la BR se lleva a cabo guardando las muestras a 4°C durante una noche en condiciones de oscuridad total. Dependiendo del mutante, este tiempo se incrementa. La adaptación a la luz se lleva a cabo iluminando las muestras con una fuente de luz Seom durante 2 minutos a máxima potencia y colocando la cubeta a 3 cm de la fuente.

Se toma un espectro de absorbancia de la muestra en los dos estados de 250 a 800 nm. Después se resta el espectro de la muestra iluminada del espectro de la muestra adaptada a la oscuridad. La BR posee un espectro de absorbancia en el rango del UV-visible con dos bandas características. La más amplia, entre 500 y 700 nm

aproximadamente, se corresponde con la absorbancia del retinal en su entorno natural en la bacteriorodopsina (figura 3.6), y la más estrecha, de 250 a 300 nm, se corresponde con la absorbancia de los triptófanos y las tirosinas de la proteína.

El máximo de absorbancia de la BR depende del estado en que se encuentre, adaptada a la luz (LA) o adaptada a la oscuridad (DA). La forma DA se caracteriza por tener un máximo de absorbancia a 558 nm y un coeficiente de extinción molar, ϵ , de $58000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La iluminación de esta forma da lugar a la forma LA que presenta un máximo de absorbancia 10 nm desplazado hacia el rojo, 568 nm, y un aumento aproximado del 10% de la ϵ , $63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (figura 3.6).

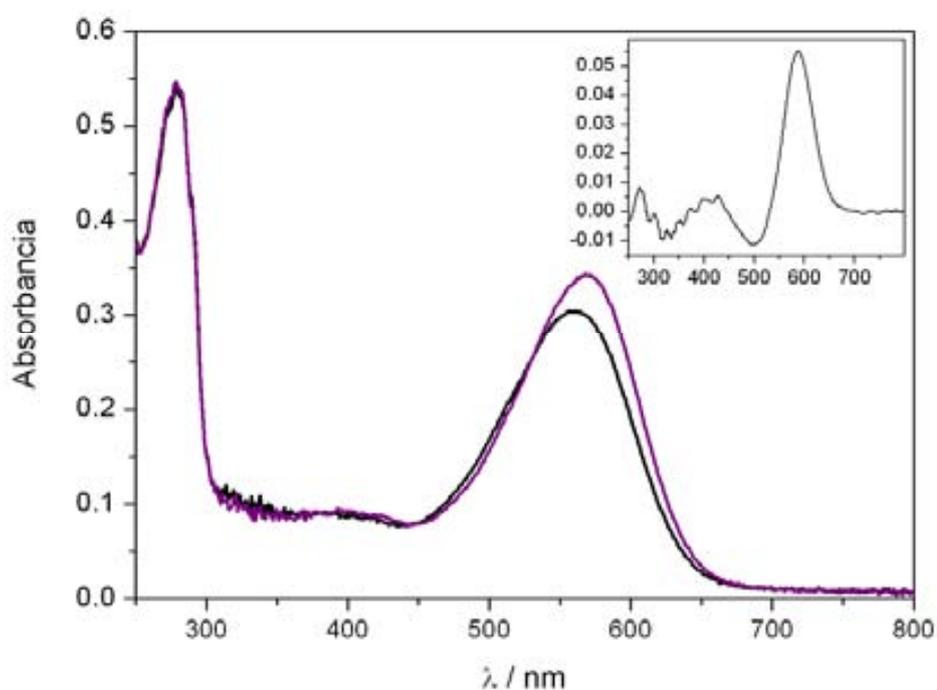


Figura 3.6. Espectro de absorción UV-visible de una suspensión $5 \mu\text{M}$ de BR en H_2O adaptada a la oscuridad (—) y adaptada a la luz (—). En la gráfica situada en el extremo superior derecho se puede observar el espectro de diferencia entre la forma LA y DA.

En la zona del UV del espectro de diferencia se pueden observar varios máximos entre 300 y 450 nm denominados bandas β y que han sido asignadas a la isomerización del retinal durante el proceso de adaptación a la luz (Govindjee et al., 1997).

3.5.2 Titración de la BR frente al pH

Esta técnica consiste en tomar espectros de absorbancia a una muestra de concentración 15 μM de membrana púrpura adaptada a la oscuridad (ver apartado 3.5.1) a la cual se le va ajustando el pH desde 1 hasta 13 mediante microadiciones de HCl o NaOH. Se ha utilizado un pH-metro Metrohm 713 serie 01 con un electrodo Crison.

El experimento se lleva a cabo con muestras de MP en diferentes condiciones de fuerza iónica del medio:

-H₂O

-150 mM KCl

-1M KCl

Dependiendo del rango de pH en el cual se hagan el experimento hablamos de titración ácida o básica.

a) Titración ácida

Mediante la titración entre pH 7 y 1 se puede determinar el pK_a aparente del aspártico 85 responsable de la transición membrana púrpura-azul.

Paralelamente a la acidificación de la muestra de MP se van tomando espectros de absorbancia entre 250 y 800 nm. La representación del cambio de absorbancia a 630 nm, máximo de absorbancia de la forma azul en el espectro de diferencia, en función del pH de la muestra da una gráfica de tipo sigmoideal en la que el punto de inflexión, X₀, es el pK_a aparente de la transición (figura 3.7). El ajuste de la curva a la ecuación de Boltzman permite obtener los parámetros de interés:

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

y Absorbancia a una longitud de onda determinada, en este caso 630 nm, en función del pH.

A₁ Valor final de la absorbancia.

A₂ Valor inicial de la absorbancia.

X₀ punto medio de la curva.

dx amplitud de la curva.

X pH

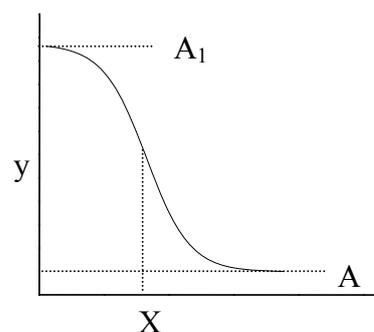


Figura 3.7. Representación esquemática de una curva sigmoideal.

b) Titración básica

La muestra se titra entre los pH 7 y 14 y se toman también espectros de absorbancia para observar posteriormente la aparición de diferentes especies con membrana roja (470 nm) y retinal libre (365 nm). El ajuste a una curva sigmoideal de los cambios de absorbancia a cada una de estas longitudes de onda en función del pH da lugar al pK_a aparente para cada una de estas especies.

3.5.3 Estabilidad térmica

3.5.3.1 Espectroscopía UV-Vis

Se determina la estabilidad térmica de muestras de BR adaptadas a la oscuridad a una concentración de 15 μM en agua a pH 4,0 y 7,0. El experimento se realiza incubando durante ocho minutos la muestra a temperaturas comprendidas entre 20 y 100° C a intervalos de 5° C, y adquiriendo espectros de absorbancia en el UV-visible a cada temperatura. El incremento de temperatura se produce en la misma celda del espectrofotómetro mediante un circuito cerrado conectado a un baño.

La representación de la absorbancia a 570 nm en función de la temperatura da lugar a una curva sigmoideal (figura 3.7), con un punto de inflexión que indica la T_m de desnaturalización de la BR.

3.5.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Mediante el DSC es posible medir la capacidad calorífica aparente de un sistema en función de la temperatura (Mateo, 1984). El incremento de temperatura induce cambios conformacionales de las proteínas que van asociados a la absorción o liberación de calor. En el caso de la bacteriorodopsina, su desnaturalización térmica da lugar a la absorción de calor, apareciendo un pico positivo en el termograma si el proceso es suficientemente cooperativo.

Un termograma es la curva que resulta de la representación de la capacidad calorífica en función de la temperatura. Se habla de capacidad calorífica aparente, C_p^{ap} ($\text{cal}/^\circ\text{C}$), ya que no se obtienen valores absolutos sino la diferencia entre dos estados diferentes, siendo la BR a temperatura ambiente el estado de referencia.

Los experimentos se han llevado a cabo en un calorímetro Micro-Cal MC2 (MicroCal Inc, USA) que contiene dos celdas, una para la muestra y otra para la referencia, siendo la capacidad de cada una de las celdas de 1,23 ml. El sistema de calefacción calienta tanto las celdas como la cámara.

El sistema de refrigeración consiste en un circuito cerrado conectado a un baño, que refrigera la cámara (figura 3.8). Los experimentos se realizan a 1,7 atmósferas de presión de nitrógeno para evitar la ebullición de la muestra a elevadas temperaturas, y a una velocidad de barrido de 1,5 K/min.

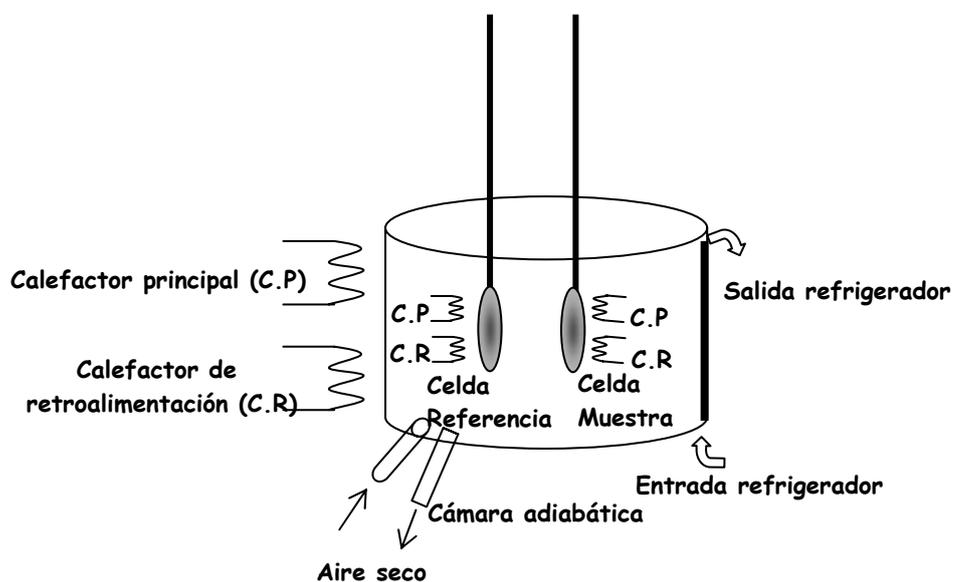


Figura 3.8. Esquema del sistema de calefacción-enfriamiento de la muestra en el aparato de DSC. C.P es el calentador principal y C.R el de referencia.

Las muestras se preparan a una concentración de 1,5-2 mg/ml y se dializan durante toda la noche contra H₂O con un pH final de ~ 6,5. El aparato consta de dos celdas, una para la referencia en donde se introduce el agua de diálisis y otra para la muestra. Sobre las dos celdas se incrementa la temperatura desde 25 a 110° C registrándose simultáneamente la capacidad calorífica del sistema.

Primero se obtiene el termograma del agua introduciendo agua en las dos celdas para así poder restar la capacidad calorífica del agua al termograma de la muestra. Una vez se ha obtenido el termograma del agua se realiza el mismo proceso para la muestra de BR, la cual una vez se ha incrementado la temperatura hasta 110° C se enfría y se vuelve a incrementar la temperatura tanto para comprobar la irreversibilidad del proceso como para tener un termograma de la capacidad calorífica de la proteína desnaturalizada.

Como este último termograma consta tanto de la capacidad calorífica del agua como de la BR desnaturalizada es este último termograma el que se utiliza para restarlo del termograma de la BR. Por tanto el termograma del agua se utiliza únicamente cuando la calidad del último termograma no es suficientemente bueno.

Una vez obtenida la resta se realiza la corrección de la línea base (figura 3.9), en la cual se igualan las líneas base pre y post-máximo de desnaturalización. Este desfase de la línea base se debe a la diferente capacidad calorífica de la proteína nativa y desnaturalizada. Esta corrección se realiza mediante el programa Origin™.

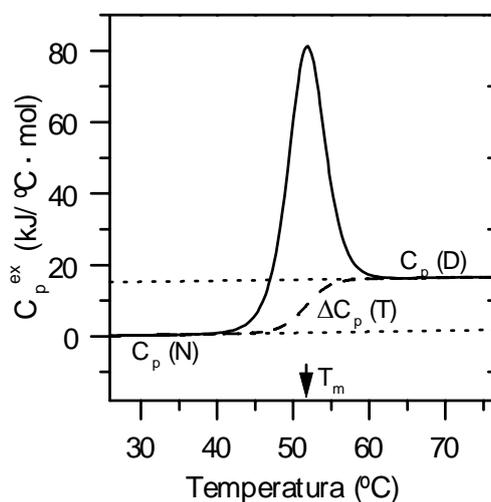


Figura 3.9. Trazado de la línea base según el método de (Takahashi et al., 1981). $C_p(N)$ es la capacidad calorífica en el estado nativo, y $C_p(D)$ en el estado desnaturalizado. La línea base $\Delta C_p(T)$ une sigmoidalmente los dos niveles de manera proporcional al área por debajo de la transición.

3.6 Estudios funcionales

3.6.1 Determinación del bombeo de protones de la bacteriorodopsina incorporada en liposomas

a) Inclusión de la BR en liposomas de fosfatidilcolina (PC) de huevo

El volumen total de la mezcla de BR y PC es de 15 ml con una concentración final de PC de 6,0 mg/ml, 0,12 mg/ml de BR y 150 mM KCl.

1: En un balón de vidrio se adicionan 1,88 ml de PC disuelto en cloroformo (concentración 48 mg/ml) y se rotavapora a 20-30° C durante unos 15 minutos, momento en el que se observa el fosfolípido precipitado en las paredes.

2: El balón se envuelve en papel de aluminio y se coloca en una campana de vacío durante 30 minutos para eliminar todos los restos de cloroformo.

3: Se añade al balón una mezcla de 15 ml de BR a concentración 0,12 mg/ml en 150 mM KCl pH 7,0.

4: Se tapa la boca del balón con parafilm y se agita con la ayuda de un vórtex a máxima potencia hasta que la totalidad de la PC se ha disuelto, unos 10 minutos.

5: La mezcla se pasa por un microfluidizador para conseguir una población de liposomas homogénea de un diámetro de unos 60 nm. Este método consiste en hacer pasar la disolución de liposomas a alta presión (4 bars) a través de filtros.

El aparato empleado es un Microfluidizer 110S. Previo lavado con etanol, agua y tampón 150 mM KCl se procede a la re-circulación de la solución de liposomas por los filtros durante 4 minutos.

6: Se mide el diámetro mayoritario de los liposomas mediante un Microtrack UPA 150 (Honeywell, USA). Cuando se hace incidir un láser (780 nm en este caso) sobre una solución de liposomas se produce una dispersión que depende de la medida de los liposomas. Con la técnica de análisis del espectro de frecuencias lo que se hace es comparar la luz dispersada a 0° respecto al haz incidente con el propio haz dispersado.

La luz dispersada sufre un desplazamiento de la frecuencia original (efecto Doppler) el cual depende de la velocidad de las partículas (figura 3.10). La diferencia de frecuencia es detectada mediante el cambio producido sobre el haz original al interaccionar con la luz dispersada. Del tratamiento matemático de los datos intensidad-tiempo se obtiene la intensidad-frecuencia. La representación de este par de datos da como resultado una curva de carácter Lorentziano cuando todas las moléculas son del mismo tamaño. Cuando hay una suma de poblaciones de diferentes medidas se obtiene una curva compleja multilorentziana. La deconvolución de estos datos da como resultado la distribución de las poblaciones de medidas de liposomas de la solución.

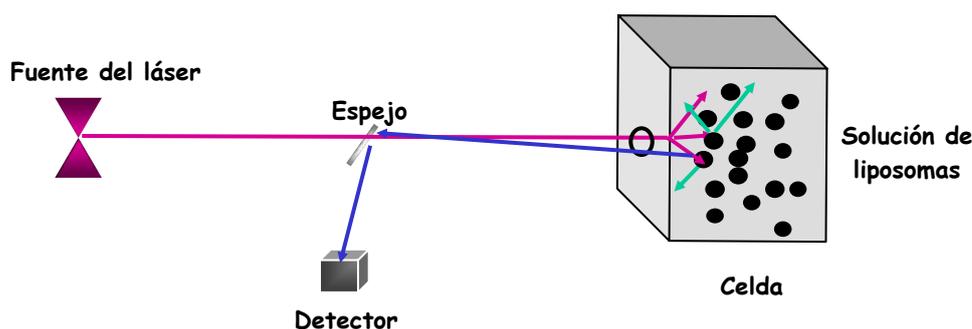


Figura 3.10. Esquema de funcionamiento del espectrómetro de análisis de espectro de frecuencias. En violeta el haz incidente, en verde los rayos dispersados en un ángulo diferente de 0° y por tanto perdidos y en azul los rayos con un ángulo de dispersión de 0° que llegan al detector.

Las muestras se diluyen en medio acuoso de manera que el índice de carga de la solución se encuentre entre 0,1 y 0,2 asegurándonos de que llegue suficiente señal al detector. Hay una serie de parámetros que se tienen que introducir al programa ya que dependiendo de la solución, muestra, etc estos cambian, como son la viscosidad o el índice de refracción. Los datos introducidos son: viscosidad (25° C) de 1,002 cP, índice de refracción de 1,332, tiempo de lectura 10 minutos, índice de refracción del fosfolípido 1,49, densidad de los liposomas 1,01 g/cm³, tipo de partículas esféricas.

b) Medida del bombeo de protones

Se introducen 2,5 ml de BR incorporada en liposomas en una cubeta de plástico con una pequeña mosca magnética de agitación. La cubeta con la muestra se introduce dentro de un vaso de precipitados con agua para absorber el calor de la luz incidente sobre la muestra. La luz proviene de un transiluminador a máxima potencia, colocado a 6,5 cm del centro de la cubeta con filtraje previo de la luz ultravioleta mediante un filtro amarillo (figura 3.11) situado a 3 cm de la fuente. El electrodo está conectado a un ordenador con un programa informático que permite registrar los valores del pH a distintos intervalos de tiempo.

El experimento se inicia iluminando primero la muestra durante unos 2 minutos para adaptarla a la luz y después manteniéndola a oscuras durante unos 10 minutos para que los protones que hayan podido ser bombeados dentro del liposoma salgan por difusión.

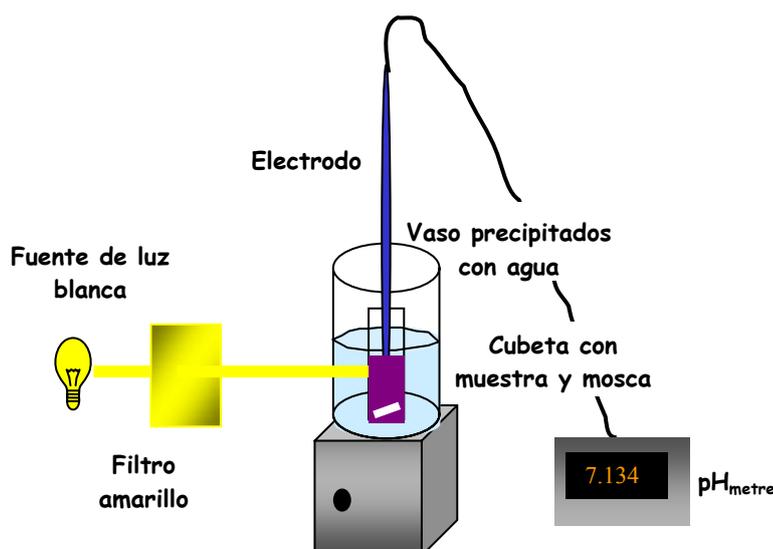


Figura 3.11. Esquema de la técnica de medida de bombeo de protones en liposomas.

Pasado este tiempo se comienza el experimento en el cual se anota el pH inicial de la muestra antes de iluminar y una vez iniciada la iluminación se registra el pH a diferentes intervalos de tiempo hasta que el pH se estabiliza, momento en el cual se deja de iluminar la muestra y también se registra el tiempo de retorno al pH inicial.

Una vez realizado el experimento se mide la eficacia de bombeo representando el cambio de pH en función del tiempo. El ajuste de los 15 primeros segundos a una ecuación lineal da una pendiente, el valor de la cual es la velocidad de bombeo de la muestra (figura 3.12).

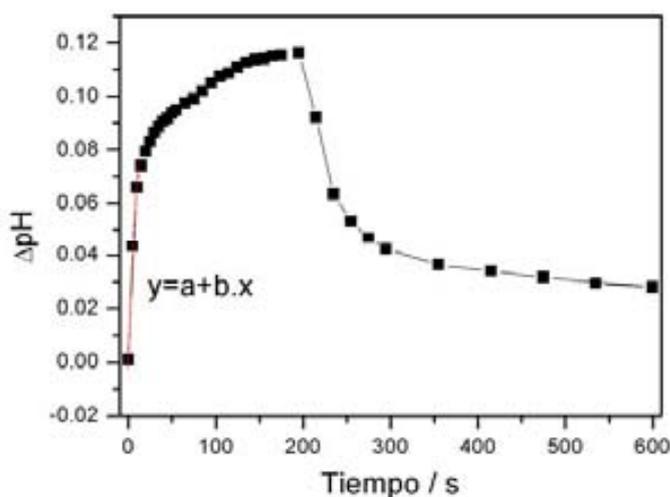


Figura 3.12. Gráfica de representación de los datos de bombeo de protones en liposomas. En rojo se muestra una recta ajustada a los tres primeros puntos para determinar la velocidad de bombeo.

3.6.2 Fotólisis de destello

Con esta técnica es posible observar espectrofotométricamente cambios de absorbancia de una muestra a lo largo del tiempo una vez es irradiada por un láser.

El aparato utilizado es un LKS50 de Applied Photophysics con un láser Nd:YAG (Neodymium: Yttrium Aluminium Garnet; Spectron Laser Systems). En todos los casos la energía del láser es de 5 mJ/pulso.cm^2 con una duración del pulso de 9 ns, una longitud de onda de 532 nm y una frecuencia de repetición de 0,5 Hz. El procesamiento de los datos se lleva a cabo con el programa LASER Applied Photophysics.

Como se puede observar en la figura 3.13.A el láser incide en la cubeta donde está la muestra y excita algunas moléculas de BR. Al mismo tiempo se hace incidir un haz de luz, de forma perpendicular, que mide la absorbancia a una longitud de onda determinada según el intermediario que se pretende estudiar. Para seleccionar esta

longitud de onda se usan dos filtros denominados A y B, solos o combinados dependiendo de la longitud de onda de trabajo. En la figura 3.13.B se pueden observar los espectros de transmitancia de ambos filtros y las zonas del espectro visible que filtran cada uno de ellos y la combinación de los dos. Estos filtros se colocan en la posición del filtro 1.

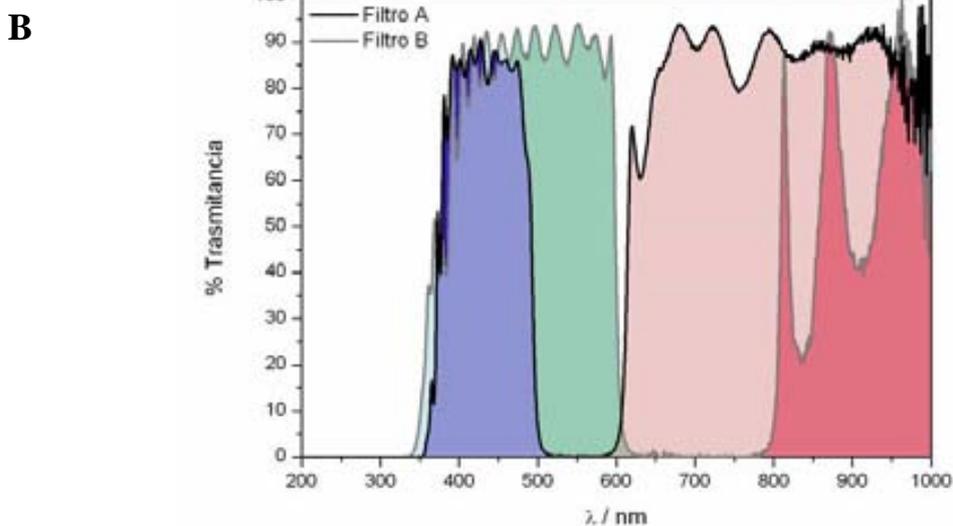
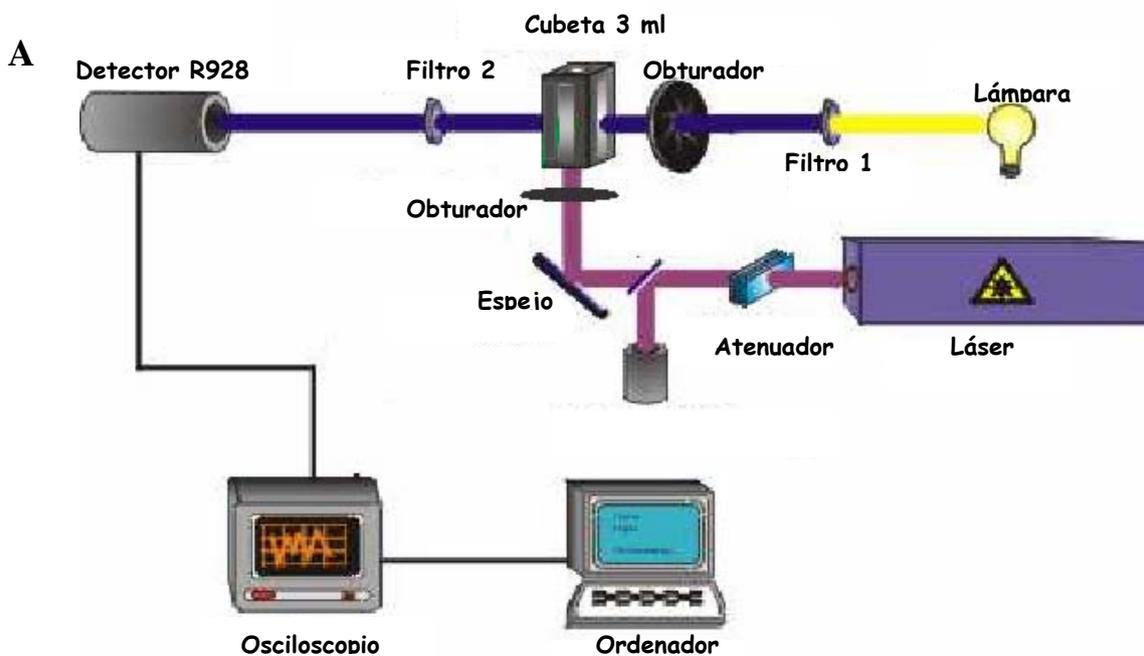


Figura 3.13. A. Esquema de funcionamiento del aparato de fotólisis de destello. B. Espectro de transmitancia de los filtros que se usan para trabajar a distintas longitudes de onda (410, 460, 570 y 660 nm).

Esta técnica permite el estudio de distintos intermediarios del fotociclo, así como la determinación indirecta del transporte de protones mediante un indicador de pH cuya absorbancia cambia al protonarse y desprotonarse.

3.6.2.1 Cinéticas de intermediarios del fotociclo

El experimento se realiza con muestras de BR adaptadas a la luz a una concentración de 15 μM , 150 mM KCl, temperatura ambiente y pH 7 o 10 según el experimento.

Los datos obtenidos consisten en la diferencia de absorbancia entre la muestra sin excitar y después de hacer incidir el láser. Una vez que se ha hecho incidir el láser el programa adquiere los cambios de absorbancia que se producen en la muestra a lo largo del tiempo en una escala temporal que va de microsegundos hasta segundos, dependiendo de lo que tarde cada mutante en completar el fotociclo.

En la figura 3.14 se representa la cinética del intermediario M, cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 410 nm. Para cada valor de longitud de onda se hace una media de tres medidas haciendo incidir el láser sobre la muestra tres veces con un intervalo de 3 segundos entre cada medida y se promedia.

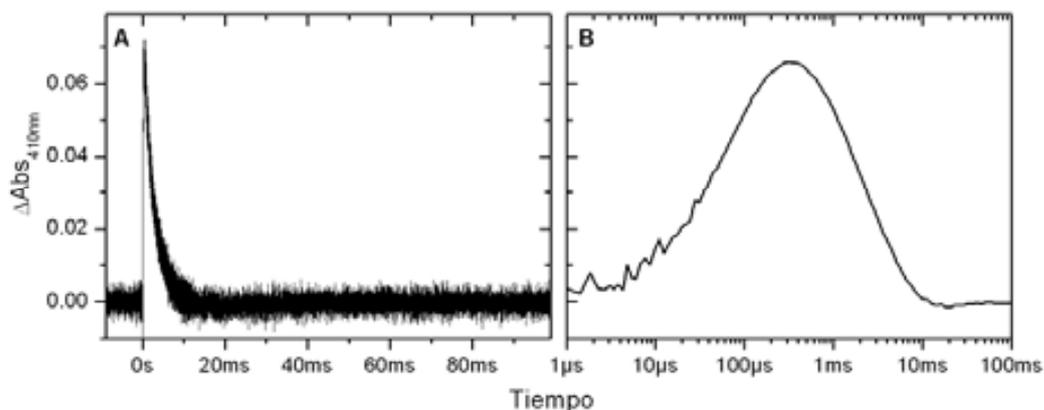


Figura 3.14.A. Adquisición de la cinética de absorbancia a 410 nm en función del tiempo de una suspensión de BR 15 μM a pH neutro y 150 mM de KCl. **B.** Representación de la misma cinética en escala logarítmica y tras promediar la curva para reducir los puntos de adquisición a veinte puntos por década.

La estancia donde está localizado el equipo está termostata a 20° C pero el dispositivo donde se coloca la cubeta no tiene ningún sistema de control de temperatura. A veces las medidas presentan una variación en la cinética debido al cambio de temperatura, que consiste en una aceleración proporcional al incremento de ésta. Para

ello se usa siempre una muestra de proteína nativa como referente en cada conjunto de medidas, y se hace una corrección en la escala de tiempo en base a esta muestra.

3.6.2.2 Determinación de cambios de pH del medio

El colorante piranina (ácido-8-hidroxi-1,3,6-pirenetrisulfonato trisódico) es capaz de detectar cambios del pH del medio donde se encuentra disuelto (Kano et al., 1978). Ya que el pK_a de la piranina a 150 mM de KCl es de 7,2 es solamente alrededor de este pH donde se pueden detectar cambios de pH.

El espectro de absorbancia del colorante presenta un máximo de absorbancia a 460 nm la intensidad del cual depende del estado de ionización de su grupo hidróxido (figura 3.15). Esta capacidad del colorante de cambiar su absorbancia en función del pH permite estudiar cambios de pH de un medio donde se encuentre en suspensión la BR. Para obtener los cambios de absorbancia a 460 nm de la piranina a lo largo del tiempo, primero se hace incidir el láser sobre la muestra sin piranina y después con piranina y se resta la absorbancia de la segunda medición de la absorbancia de la primera. De esta manera se elimina la contribución de los intermediarios que absorben a esta misma longitud de onda. En este caso se hace incidir el láser 5 veces sobre la muestra con un intervalo de 3 segundos entre cada medida y se promedia el resultado.

Los datos se promedian logarítmicamente para tener al final un número homogéneo de puntos por cada magnitud o década.

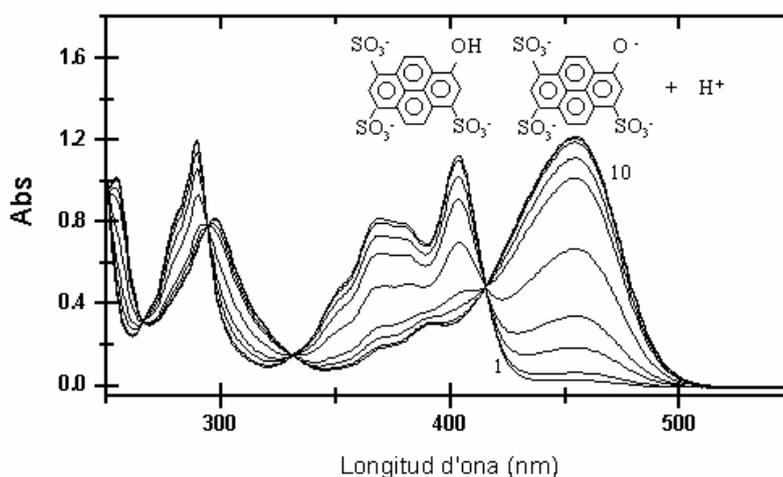


Figura 3.15. Espectro de absorbancia en el UV-visible de la piranina a una concentración de 20 μ M en 150 M de KCl a diferentes valores de pH (del 1 al 10: 5,1; 5,5; 6,0; 6,4; 6,9; 7,2; 7,6; 8,5; 8,8 i 9,2). En cada pico se muestra el estado de ionización de la piranina.

3.6.3 Caracterización de intermediarios del fotociclo mediante FTIR

3.6.3.1 FTIR estático a baja temperatura

La espectroscopia de infrarrojo es una de las técnicas clásicas para el estudio de pequeñas moléculas debido a su gran sensibilidad para determinar la composición química y la arquitectura de las mismas. El hecho de que un espectro de infrarrojo pueda proporcionar tanta información sobre determinados grupos químicos y sobre parámetros estructurales permite que sea de gran utilidad para estudiar también sistemas biológicos. Por tanto, mediante esta técnica es posible investigar la estructura de una proteína y el mecanismo molecular mediante el cual una proteína realiza su función.

En el caso de la bacteriorodopsina es posible determinar distintos intermediarios del fotociclo ya que cada uno de ellos tiene un espectro característico.

La radiación de infrarrojo está comprendida entre $14000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$, aunque es la zona del infrarrojo medio, $4000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, la que tiene mayor interés biológico. La frecuencia de vibración de un enlace depende de la masa de los átomos y de la fuerza del enlace. Por tanto, cuando se representa la intensidad de absorción en función de la frecuencia de la radiación infrarroja se observa que cada grupo de enlaces absorbe en una zona característica.

Los modos de vibración de los enlaces se pueden clasificar en dos grupos, los de tensión donde los átomos vibran en la dirección del enlace, y los de flexión donde los átomos se mueven principalmente de manera perpendicular a la dirección del enlace. Se pueden dar combinaciones de los diferentes modos de vibración en un mismo enlace.

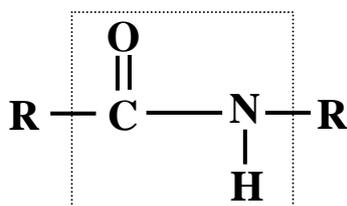


Figura 3.16. Representación del enlace amida.

En el caso de las proteínas el grupo más abundante es el grupo amida (figura 3.16). Este grupo posee diferentes formas de vibración, pero los que son importantes para este estudio son la amida I y II (figura 3.17). La amida I que se corresponde en un 80 % con la vibración de tensión del enlace $\text{C} = \text{O}$ y un 20 % del enlace N-H , se

encuentra representada en el espectro de infrarrojo en una banda localizada a 1700-1600 cm^{-1} . La amida II se corresponde en un 60 % al plegamiento del enlace N-H y en un 40 % al estiramiento del enlace C-N y esta banda está localizada a 1600-1500 cm^{-1} .

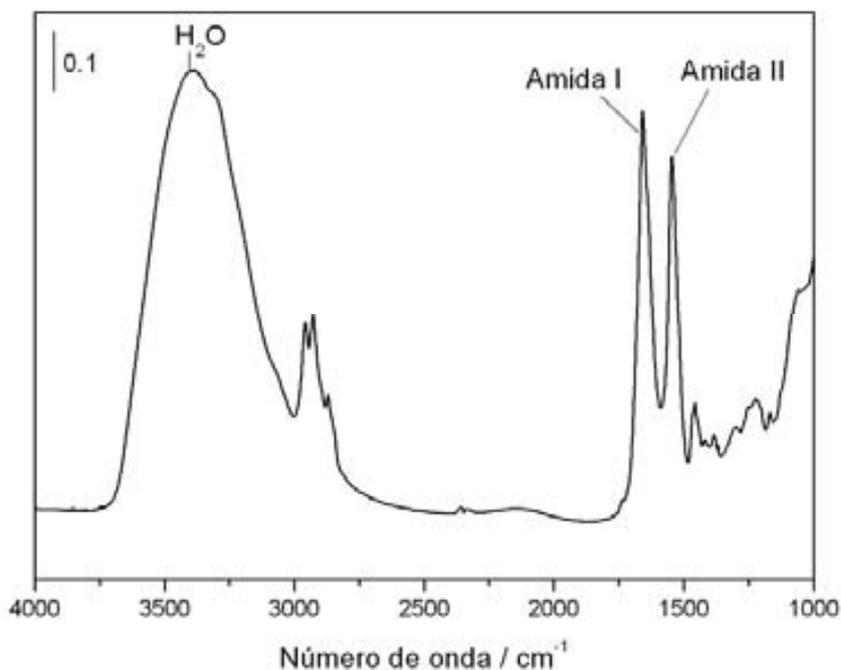


Figura 3.17. Espectro de absorción de un film hidratado de bacteriorodopsina a pH 7 y 243 K.

Las bandas originadas por las vibraciones de los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de los aminoácidos como el aspártico o glutámico dan bandas en las zonas 1750-1700 cm^{-1} para COOH y 1450-1500 para COO⁻.

La interpretación de las bandas de infrarrojo en la BR tiene el problema adicional, respecto a otras proteínas, de la presencia de una molécula de retinal que da múltiples modos de vibración que se solapan con las bandas de vibración de la proteína.

a) Preparación de la muestra:

Según al pH al cual se trabaje y la temperatura se pueden atrapar distintos intermediarios del fotociclo. Normalmente las mediciones se hacen a pH 7 o pH 10, lo que nos permite el estudio de los intermediario M y N (Lazarova et al., 2000).

A 0,4 mg de MP se le añade 1 ml de tampón 3 mM fosfato/bifosfato o carbonato/bicarbonato dependiendo de si se quiere trabajar a pH 7 o pH 10 respectivamente. Ambos tampones tienen una concentración 150 mM de KCl. Esta suspensión se centrifuga en una centrífuga de mesa a máxima velocidad durante 10

minutos. Se lava una vez la muestra para asegurarnos que la proteína tiene el pH y la concentración de sal descritas y el sobrenadante se resuspende en 50 μl del mismo tampón. Una vez resuspendida se deja unos 20 segundos en un baño de ultrasonidos para eliminar posibles burbujas de aire y asegurarse que la proteína no está agregada. A continuación se deposita sobre una ventana de CaF_2 extendiendo la proteína de forma homogénea en el centro de la ventana y se seca en una campana de vacío.

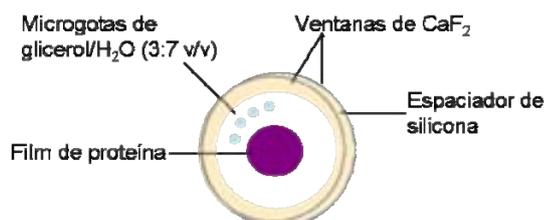


Figura 3.18. Representación de una muestra para estudio mediante FTIR consistente en un film de bacteriorodopsina entre dos ventanas de Fluoruro de Calcio.

Una vez se forma el film de proteína, se coloca un espaciador de silicona de 1,5 mm de grosor, se añaden cuatro gotas con micropipeta de una disolución de glicerol en agua al 30% en un lado de la ventana y se hace un sándwich poniendo encima otra ventana de CaF_2 (figura 3.18). Se presiona con fuerza para que la muestra quede cerrada herméticamente. El vapor de agua comienza a difundir hasta alcanzar un equilibrio entre las gotas de glicerol y el espacio que queda entre las ventanas. De esta manera la muestra se hidrata en un 92% aproximadamente (humedad relativa) y permanece constante durante todo el experimento (Lórenz-Fonfría 2008).

El agua tiene una gran absorción en el infrarrojo y algunas de sus bandas se solapan con las bandas de proteína, por eso es importante que la muestra no esté saturada de agua pero esté suficientemente hidratada para ser funcional.

Antes de colocar la muestra en el espectrómetro se adapta a la luz (ver apartado 3.5.1).

b) Adquisición de espectros:

Una vez adaptada a la luz se coloca la muestra en un portamuestras alojado en una cámara dentro del infrarrojo. En esta cámara hay una corriente de aire seco para disminuir al máximo la presencia de vapor. Mediante un baño Julabo FP 50, se mantiene la muestra a la temperatura adecuada según el experimento.

Se deja la muestra unos 30 minutos aproximadamente para que se estabilicen las condiciones de temperatura y de vapor de agua y después se adquieren los espectros.

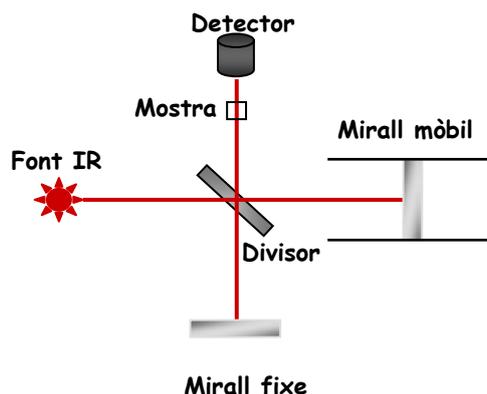


Figura 3.19. Esquema del funcionamiento del espectrómetro de infrarrojo.

Las medidas consisten en adquirir una serie de espectros de la muestra sin iluminar y mientras se ilumina continuamente. Posteriormente se restan los espectros adquiridos durante la iluminación de los espectros adquiridos en ausencia de luz, obteniendo así el espectro de diferencia entre los intermediarios del fotociclo y la BR en estado basal.

La iluminación de la muestra se lleva a cabo mediante un iluminador donde la luz se filtra mediante un filtro amarillo y el calor es filtrado a través de un recipiente con agua.

Los espectros se han adquirido en un espectrómetro Varian 7000-e con transformada de Fourier, esquematizado en la figura 3.19. Para una misma muestra se adquieren un mínimo de dos tandas de espectros con 250 barridos cada una y se promedian. Los espectros han sido adquiridos con una resolución de 2 cm^{-1} .

3.6.3.2 Estudios dinámicos del fotociclo: *ss-FTIR*

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier nos permite hacer también estudios dinámicos del fotociclo (step-scan FTIR), al igual que la espectroscopía Visible mediante la técnica de fotólisis de destello. La espectroscopía de IR tiene varias ventajas respecto a la espectroscopía de absorbancia en el visible, como son la posibilidad de separar mejor los intermediarios del fotociclo, excepto los que tienen un tiempo de vida media muy corto como el intermediario K, y la posibilidad de identificar aminoácidos y estructuras secundarias que están afectadas en un mutante durante la función de la proteína.

Los estudios de step-scan FTIR (ss-FTIR) han sido realizados en la Universidad de Bochum (Alemania) bajo la supervisión del Dr. Klaus Gerwert, siguiendo el protocolo descrito por el grupo en sus publicaciones (Rammelsberg et al. 1997).

El equipo en el que se han realizado las mediciones es un Bruker IFS66v al que se ha acoplado un detector fotovoltaico de HgMnTe (cutoff 850 cm^{-1}). La señal es amplificada en un preamplificador de dos fases de fabricación casera.

La muestra se excita con un láser de pigmento (Lambda Physik, FL105), con emisión a 546 nm , 3 mJ de energía y con un pulso de 20 ns de duración. Se termostatiza a 20° C .

Mediante un filtro de interferencia se limita el rango espectral a números de onda por debajo de 1975 cm^{-1} para reducir el número de puntos de muestreo del interferograma.

El intervalo de adquisición de los espectros ha sido de $1900\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} .

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aumento de la flexibilidad de las hélices E y F. Obtención del mutante Loop5

La quimera Loop5 fue obtenida mediante la técnica de inserción de mutaciones en cassette combinada con la técnica de mutación por PCR para crear dianas de restricción únicas en la secuencia genómica¹. Para introducir el bucle de la rodopsina se partió del vector pMT4-rho que contiene el gen completo de la rodopsina bovina (Rho) y se aisló la secuencia del bucle 5 mediante digestión con las enzimas StyI y MluI. Al mismo tiempo se introdujo esas dianas por PCR en el vector pUCBM20-bop, flanqueando el bucle 5 de la bacteriorodopsina. Finalmente se digirió el gen mutado y se ligó con el fragmento StyI-MluI procedente del gen de la Rho.

El resultado ha sido la sustitución de 9 aminoácidos del bucle 5 de la BR, o tercer bucle citoplasmático, por 22 aminoácidos del bucle equivalente de la Rodopsina (Rho) con el doble objetivo de estudiar por un lado su posible interacción con la transducina (proteína G que se une a la Rho cuando esta se activa), y por otro lado determinar la influencia del aumento de tamaño del bucle, y el aumento de flexibilidad que conlleva, en la función de la bacteriorodopsina.

El presente trabajo se centra en el segundo objetivo, es decir, en el estudio de los cambios estructurales y funcionales que produce el aumento de tamaño del bucle que une las hélices E y F en la bacteriorodopsina, siendo éste un posible elemento móvil de la proteína durante el fotociclo (ver introducción, apartado 1.9).

Además del aumento de tamaño que se produce en este bucle en el mutante Loop5 hay también un cambio de polaridad debido a la sustitución de la cadena polipeptídica nativa por la secuencia de la Rho.

Bucle 5 de la BR: S K A E S M R P E

Bucle 5 de la Rho: K E A A A Q Q Q E S A T T Q K A E K E V T R

El grado de hidrofiliidad de la cadena polipeptídica es menor en el mutante pasando de 1,2 a 0,9. La hidrofiliidad es la tendencia de una molécula de ser solvatada por agua, por tanto, el bucle 5 de la proteína quimérica tiene menos tendencia a estar expuesto al medio acuoso. De hecho, parte de este bucle forma estructura de hélice α en la Rho como puede verse en la figura 4.1.

Heymann et al. (2000) construyeron una quimera muy similar (IIN) con la única diferencia de que en la hélice E eliminaron un aminoácido menos y en la hélice F

¹ Este mutante fue obtenido por Carolina Sanz Monte que se dedicó al estudio de la interacción de la quimera con la transducina.

añadieron dos aminoácidos más de la Rho, es decir la quimera IIN tiene tres residuos más en el bucle E-F que la quimera Loop5. El estudio de la quimera IIN mediante microscopía de fuerza atómica reveló que el bucle insertado tiene estructura α , siendo una extensión de las hélices E y F en el lado citoplasmático de la proteína, como sucede también en la Rho. Esta técnica reveló también la mayor flexibilidad del bucle E-F en la quimera IIN respecto a la BR nativa.

Este cambio de polaridad y, presumiblemente, de estructura secundaria y flexibilidad pueden ser los responsables de algunas diferencias estructurales así como en el comportamiento cinético del mutante respecto de la proteína nativa.

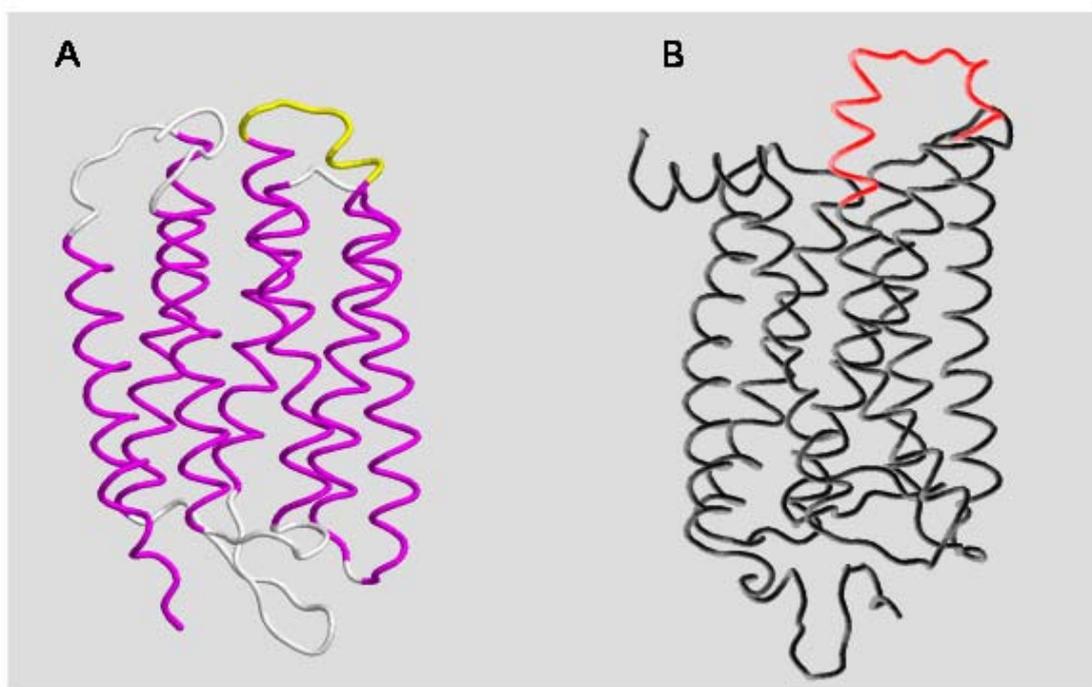


Figura 4.1.A. Estructura de la Bacteriorodopsina (código 1BRR en el PDB). El bucle 5 se representa en color amarillo y el resto de los bucles en color blanco. **B.** Estructura de la rodopsina (código 1gzm en el PDB). El bucle 5 se representa en color rojo.

Debido a que en este mutante se ha aumentado el tamaño de la proteína en 13 aminoácidos es posible caracterizarlo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes ya que el desplazamiento electroforético es significativo (figura 4.2).

Además también es posible determinar la pureza de la proteína después de la extracción a partir de un cultivo de *H.salinarum* ya que las proteínas que pueden extraerse con la BR también pueden verse con la tinción de Coomasie.

La BR silvestre tiene un peso molecular aparente de 20 kDa, es decir 6 kDa menos que su peso real (26 kDa), cuando se resuelve en un gel de poliacrilamida (Kushwaha et al., 1975).

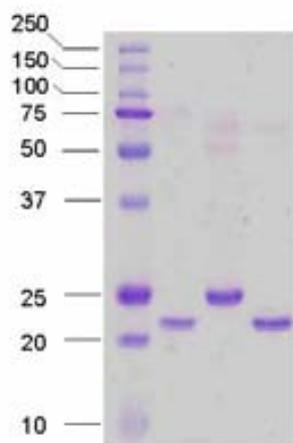


Figura 4.2. Electroforesis en gel SDS-PAGE al 16% de la bacteriorodopsina y del mutante Loop5. En el gel se han cargado las muestras en el siguiente orden: 1-marcador de peso molecular, 2-wt BR, 3-mutante Loop5, 4-wt BR. El mutante se encuentra a la altura de la banda de 25 kDa del marcador de peso molecular mientras que la proteína nativa está situada entre las bandas de 20 y 25 kDa.

4.1.1 Caracterización estructural del mutante Loop5

Para caracterizar el efecto de una mutación en la estabilidad estructural de la BR se aplican diversas técnicas físico-químicas.

Debido a que el fotociclo comienza con la isomerización del retinal y algunos cambios en su entorno dentro de la proteína (Brown et al., 1998; Lanyi, 2004), la determinación del pK_a del Asp85, y el estudio del espectro UV-visible del mutante es una primera aproximación al estudio estructural.

En general, una modificación significativa del máximo de absorbancia y una adaptación luz-oscuridad alterada respecto a la proteína silvestre son indicativos de que la mutación o mutaciones afectan significativamente al entorno del retinal, y probablemente tienen un importante efecto en el fotociclo.

La estabilidad térmica es una medida de la compactación de la proteína y de su accesibilidad al RBP (bolsillo de unión del retinal).

En la tabla 4-1 se recogen los valores obtenidos para los diferentes estudios estructurales del mutante y de la proteína nativa, así como la tasa de transporte del mutante respecto a la proteína silvestre como un indicador de cómo está afectada la función de la proteína debido al cambio estructural introducido en el mutante Loop5.

Tabla 4-1. Datos obtenidos del estudio estructural y del transporte de protones para el mutante Loop5 en comparación con los valores obtenidos para la proteína nativa BR:

	Loop5	wt BR
^a λ_{max} luz-oscuridad	563→570	558→568
^b pK _a H ₂ O	3,6	3,2
^c pK _a KCl 150mM	2,4	2,7
^d Estabilidad térmica (°C) pH 4	56,5	68,1±0,3
UV-Vis pH 7	75,3	90,5±0,2
^e T _m DSC pH 7 (°C)	87±1,0	98,8±1,5 (82,3±2,6)
^f Liposomas EPC/BR V _i	57±3,1%	100%±2,8
Tasa total	56±0,02%	100%±2,0
^g Transporte de H ⁺ con piranina	46±3,05%	100%±2,3

a-longitud de onda en la que se sitúa el máximo de absorción en el visible del pigmento adaptado a la oscuridad y adaptado a la luz,

b-pK_a de protonación del Asp85 de una suspensión de proteína en agua,

c-pK_a de protonación del Asp85 de una suspensión de proteína en KCl 150 mM,

d-estabilidad térmica de la proteína determinada mediante espectroscopia UV-visible como la liberación del retinal por desnaturalización de la proteína a pH 4 y pH 7,

e-temperatura de desnaturalización de la proteína determinada mediante DSC a pH7. Entre paréntesis se representa el máximo de la pre-transición en la proteína silvestre, que no se observa en el mutante (ver figura 4.7),

f-determinación del transporte de protones de una suspensión de proteoliposomas de BR en EPC. Este experimento nos permite calcular la velocidad inicial de transporte (v_i) y la tasa total de transporte, que corresponde al gradiente de pH máximo que se alcanza al iluminar la muestra,

g-transporte de protones detectado mediante el cambio de absorbancia a 460 nm del indicador de pH piranina en una muestra de proteína fotoexcitada por un pulso de luz láser.

4.1.1.1 Adaptación luz-oscuridad

El mutante Loop5 presenta una adaptación luz oscuridad ligeramente alterada respecto a la proteína nativa (figura 4.3) debido a que el desplazamiento del máximo de absorción es de aproximadamente 8 nm comparado con los 10 nm de la BR. Sin embargo, el aumento del coeficiente de absorción molar en aproximadamente un 13% es muy similar al de la proteína nativa y el máximo de absorción de ambas formas de la proteína no depende tampoco de la fuerza iónica, manteniendo su valor en un amplio rango de concentración de sal y pH. El máximo de absorción de la forma adaptada a la oscuridad en el mutante es 561 nm y cuando se ilumina este máximo se desplaza a 569 nm. En la proteína nativa estos valores son 558 nm y 568 nm respectivamente (ver apartado 3.5.1). En principio, el entorno del retinal no parece muy afectado por la mutación.

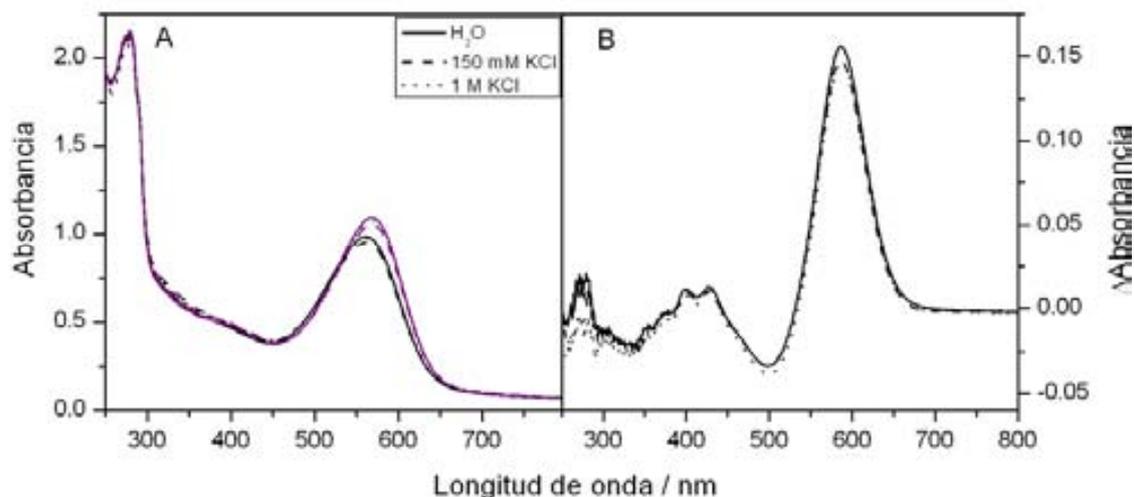


Figura 4.3.A. Espectros de absorción UV-visible de tres suspensiones 15 μM del mutante Loop5 en diferentes condiciones de fuerza iónica (ver leyenda) y a pH neutro de la forma adaptada a la oscuridad (líneas negras) y adaptada a la luz (líneas púrpuras). **B.** Espectros de diferencia de la forma adaptada a la luz menos la forma adaptada a la oscuridad.

4.1.1.2 Titración ácida

En la proteína nativa, la acidificación de la MP da lugar a la llamada forma azul de la BR, con un máximo a aproximadamente 630 nm. La aparición de esta forma es debida a la protonación del Asp85 en el estado no activado de la proteína o estado fundamental. La representación de los cambios de absorción a esta longitud de onda como función del pH permite conocer el pK_a aparente del Asp85 (tabla 4-1). Lo mismo sucede con el mutante Loop5. En la proteína silvestre esta transición muestra un pK_a aparente cuyo valor es de 2.7 en condiciones de baja fuerza iónica (150 mM KCl), frente a 3,2 en agua. En el mutante los valores de pK_a están alterados en 0,4 unidades para ambas condiciones (ver tabla 4-1) lo que supone un pequeño cambio respecto de la proteína nativa. Este cambio es indicativo de que el entorno del Asp85 no está drásticamente afectado por la mutación aunque difiere un poco del entorno nativo.

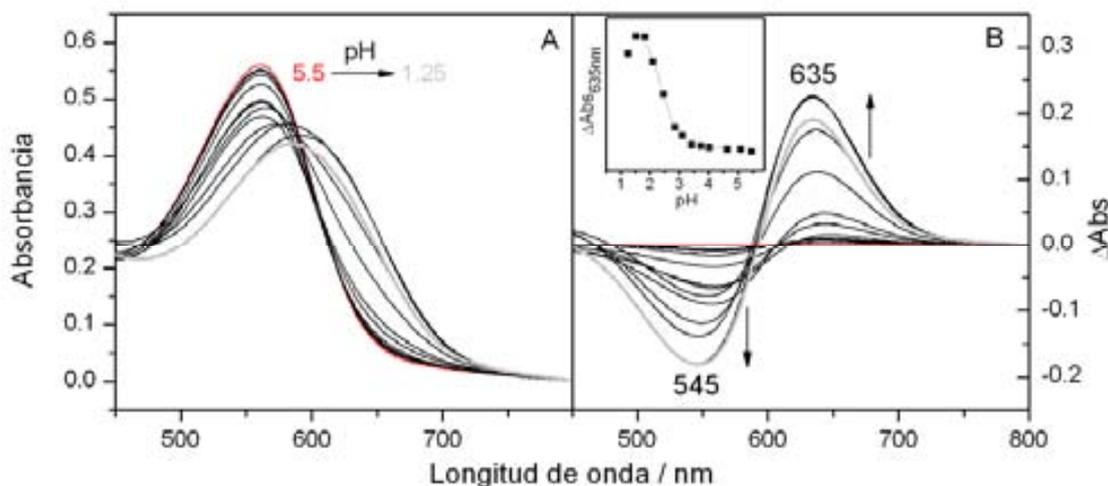


Figura 4.4.A. Espectros de absorción UV-visible de la titración ácida de una suspensión del mutante Loop5 en 150 mM KCl adaptada a la oscuridad. La línea roja corresponde a la absorción de la muestra a pH inicial (pH 5.5) y la línea gris corresponde a la absorción a pH final (pH 1.25). **B.** Espectros de diferencia entre la absorción a cada valor de pH menos la absorción de la muestra al pH inicial. La gráfica insertada muestra la variación de absorbancia de la forma azul, que tiene su λ_{max} de absorción a 635 nm, respecto del pH. Esta variación se ajusta a una curva sigmoidal cuyo punto de inflexión corresponde al valor del pK_a del Asp85.

4.1.1.3 Titración alcalina

La titración alcalina de la proteína da lugar primero a lo que se conoce como la forma roja, cuyo máximo de absorción se encuentra cerca de los 470 nm. Posteriormente se libera el retinal por desnaturalización de la proteína desplazando el máximo de absorción a 365 nm, que es el máximo de absorción del retinal en disolución. El ajuste del cambio de absorbancia de las distintas especies nos da el pK_a de esta reacción.

El grupo al que pertenece este pK_a no ha sido claramente identificado, pero se cree que puede ser algún residuo implicado en la reprotonación de la proteína desde el lado citoplasmático (Zimanyi et al., 1993).

En la figura 4.5.A se puede ver los espectros de absorbancia UV-Vis adquiridos durante la titración alcalina del mutante Loop5 y los espectros de diferencia obtenidos a partir de estos. En la figura 4.5.B se puede ver la cinética de las distintas especies que aparecen y desaparecen durante la titración y su ajuste a una función sigmoidal.

En el mutante Loop5 el pK alcalino disminuye en dos décimas de pH, siendo de 12,5 en comparación con el pK_a de la proteína nativa que es de 12,7. Además el pK_a de desaparición de la forma roja (12,80) está desplazado aproximadamente 0,3 unidades del pK_a de liberación del retinal, en comparación con las 0,2 unidades de la BR nativa (12,94).

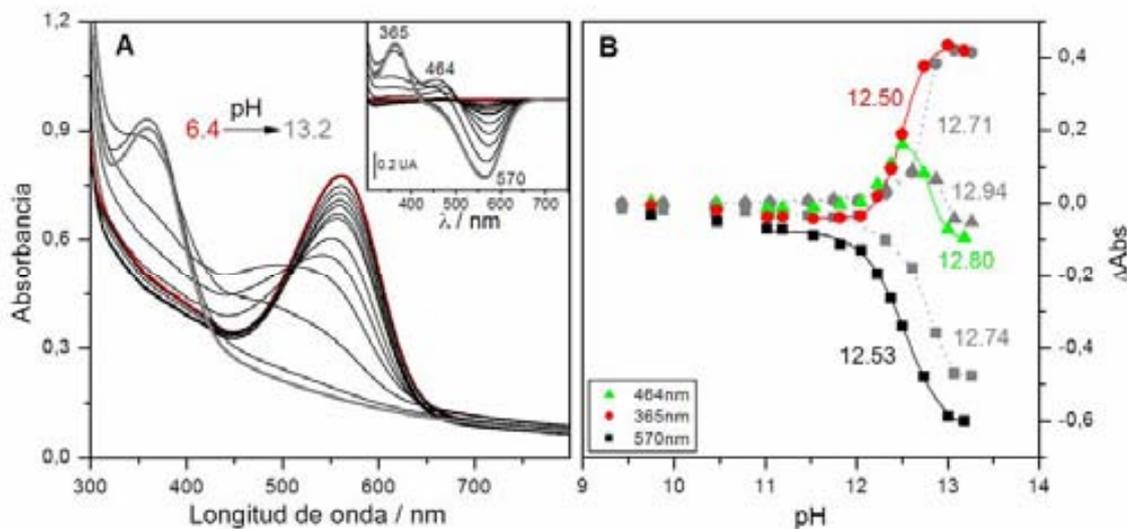


Figura 4.5.A. Espectros de absorbancia UV-Vis y de diferencia (gráfica insertada) adquiridos durante la titración alcalina de una muestra del mutante Loop5 en 150 mM KCl. **B.** Cinéticas de las distintas especies que aparecen y desaparecen durante la titración alcalina del mutante (ver leyenda) y de la proteína nativa (en gris).

Esta pequeña disminución del pK_a en el mutante podría ser debida a que el grupo responsable de la reprotonación está más expuesto al solvente que en la proteína nativa. El aumento de tamaño del bucle 5 en el mutante Loop5 podría cambiar el entorno de los residuos que captan el protón en el lado citoplasmático a un entorno menos hidrofóbico, por pérdida de algunas interacciones hidrofóbicas o incluso por contacto de esos residuos con alguna molécula de agua presente en el espacio citoplasmático o incluso en el medio acuoso externo.

4.1.1.4 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica se determina mediante dos técnicas: espectroscopía UV-visible y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Mediante la espectroscopía podemos determinar la temperatura a la cual se libera el retinal de la proteína como consecuencia de la desnaturalización de la BR. Esto es posible debido al cambio de absorción del retinal cuando se libera del entorno proteico para pasar al medio acuoso. Adquiriendo espectros a temperaturas crecientes se puede determinar la T_m de este proceso.

La calorimetría diferencial de barrido es una medida del cambio en la capacidad calorífica de un sistema debido a la absorción o liberación de calor al ir variando la temperatura. La desnaturalización de la MP da lugar a dos picos positivos en el termograma: el primero, denominado también pre-transición, se debe básicamente a la

disrupción de la estructura paracristalina de la MP (Jackson et al., 1978); y el segundo pico o transición principal, que es debido a la pérdida de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas en la proteína y liberación del retinal (Cladera et al., 1992). Por tanto, las dos técnicas se complementan y permiten un estudio detallado del proceso de desnaturalización de la proteína y de los cambios que pueden producirse en este proceso en los mutantes de BR.

a) Espectroscopía UV-Vis

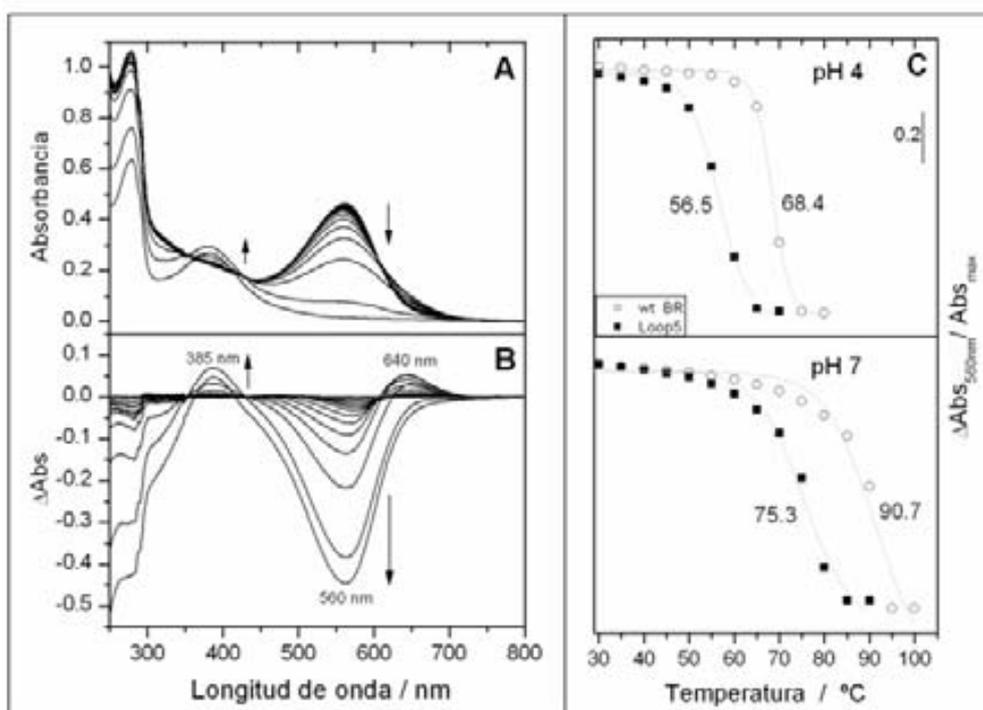


Figura 4.6. Espectros de absorción de una muestra del mutante Loop5 de concentración aproximadamente $8 \mu\text{M}$ a pH 7 en función de la temperatura (A) y espectros de diferencia del cambio de absorción en función de la temperatura (B). Representación de la variación de absorbancia en el máximo de absorción del pigmento respecto de la temperatura a pH 4 y pH 7 para un experimento independiente de cada muestra en agua (C). A partir de las curvas sigmoidales se ha calculado el valor de la T_m para la proteína nativa y para el mutante Loop5. Las muestras se adaptan a la oscuridad antes de realizar las medidas.

En la figura 4.6.A y B se puede observar la evolución de las distintas especies que aparecen y desaparecen durante el proceso de desnaturalización en una muestra de mutante Loop5 en agua y a pH 7. La primera especie que aparece es la denominada forma azul, que absorbe a 630 nm y que aparece como consecuencia de la liberación de cationes y la subsiguiente protonación parcial del Asp85 debido a que su pK_a se incrementa en la forma desionizada de la proteína. Después, en la proteína nativa, se forma una especie transitoria cuyo máximo de absorción se encuentra a 450 nm que no

aparece en el mutante Loop5. La aparición de esta banda podría deberse a la protonación directa de la Base de Schiff o a una reorganización de la estructura paracristalina (Brouillette et al., 1987).

A pH 4 la forma azul aparece desde el primer espectro debido a que a ese pH el Asp85 ya se encuentra parcialmente protonado. En la proteína nativa no se aprecia la aparición de la forma roja (450 nm) y la liberación del retinal comienza ya sobre los 60° C, siendo la T_m de desnaturalización de 68° C respecto de los aproximadamente 90° C que tiene a pH 7.

En el mutante estos valores disminuyen significativamente como puede verse en la figura 4.6 y en la tabla 4-1, siendo la diferencia de aproximadamente 12 y 15° C a pH 4 y pH 7 respectivamente.

Además de esta diferencia de T_m , a pH 7 no se detecta la formación de la especie a 450 nm indicando un posible cambio en la estructura paracristalina de este mutante. Este cambio podría consistir en una menor compactación de la MP debido al mayor tamaño del bucle que se ha introducido en el mutante y que podría ser causante de una distorsión en la ordenación de los trímeros de proteína.

b) Calorimetría diferencial de barrido

El termograma del mutante Loop5 muestra una variación muy grande respecto de la proteína nativa (figura 4.7) debido a que no hay pre-transición, o no está suficientemente separada de la transición principal para que pueda resolverse, y la transición principal tiene su máximo a 87° C respecto a los casi 99° C de la proteína nativa (ver tabla 4-1).

La ausencia del primer pico o pre-transición puede deberse a una estructura paracristalina alterada, ya que este pico se asocia a la ordenación de la MP.

Este resultado estaría en consonancia con la ausencia de la forma roja a 450 nm en el espectro UV-vis, que también se relaciona con la estructura bidimensional de la MP.

El aumento de tamaño del bucle 5 de la BR en 13 aminoácidos, que tiene lugar en el mutante Loop5, parece afectar a la ordenación de la proteína en la membrana púrpura. Este bucle más voluminoso podría dificultar la compactación de los trímeros de proteína y hacer que la membrana presente una disposición más relajada respecto de la proteína nativa.

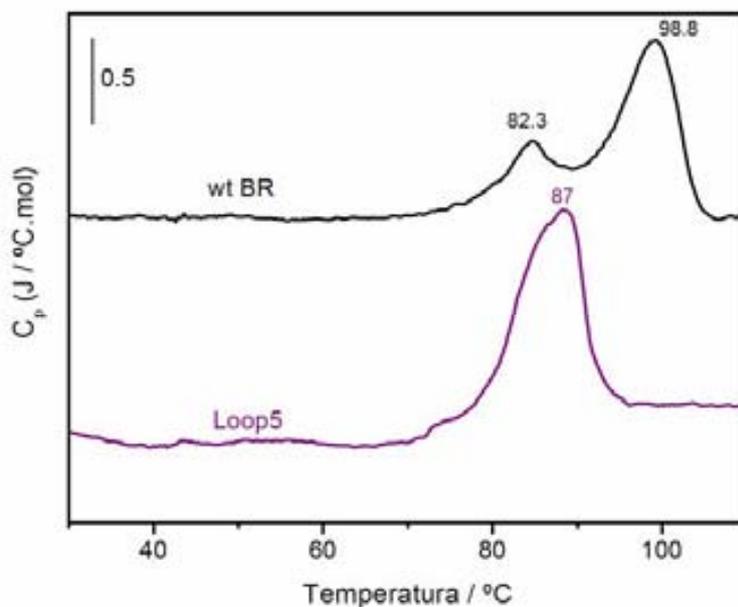


Figura 4.7. Termograma de desnaturalización de la BR y del mutante Loop5 obtenidos al hacer un barrido de una muestra de proteína de concentración 2 mg/ml desde 25° C hasta 110° C a una velocidad de 1,5° C / min. Las muestras han sido dializadas previamente en agua a pH 6,5-7.

4.1.2 Caracterización funcional del mutante Loop5

4.1.2.1 Estudio del fotociclo mediante fotólisis de destello

Esta técnica nos permite estudiar algunos intermediarios del fotociclo y es por tanto una primera aproximación a los cambios funcionales de la proteína como consecuencia de una mutación.

En la figura 4.8 puede verse el cambio de absorbancia con el tiempo de una muestra del mutante Loop 5 a tres longitudes de onda diferentes, y otra de la proteína nativa a efectos comparativos, excitadas mediante un láser.

El intermediario M se puede estudiar a 410 nm y es el que mejor se puede aislar debido a que absorbe a una longitud de onda muy distinta al resto de los intermediarios.

En cambio el intermediario O, que tiene su máximo de absorción a 640 nm, se encuentra en la misma zona del visible que el intermediario K, cuyo máximo de absorción es 625 nm. Por este motivo O se estudia a 660 nm donde el solapamiento con K es menor. Por otro lado son dos intermediarios que están bien separados temporalmente y su estudio mediante espectroscopia en el visible no presenta un problema.

El estado BR₅₇₀ es el estado inicial y final del fotociclo, por tanto nos da una idea de cómo se desarrolla y, sobre todo, cuanto tarda la proteína en completar un ciclo y volver a relajarse a su estado fundamental. Se estudia a 570 nm, máximo de absorbancia

de la BR adaptada a la luz. Engloba todos los intermediarios y está influenciado principalmente por M y N. La influencia de M viene dada porque su formación hace más negativa la absorbancia del estado BR₅₇₀, es decir cuantas más moléculas entran a realizar el fotociclo menos moléculas hay en el estado fundamental, y su desaparición es del mismo modo responsable de la recuperación del estado BR₅₇₀. En la etapa final esta recuperación está influenciada por el intermediario N principalmente por ser el siguiente intermediario a M y por absorber a una λ muy próxima (520 nm) y solaparse por tanto con la absorbancia de BR₅₇₀.

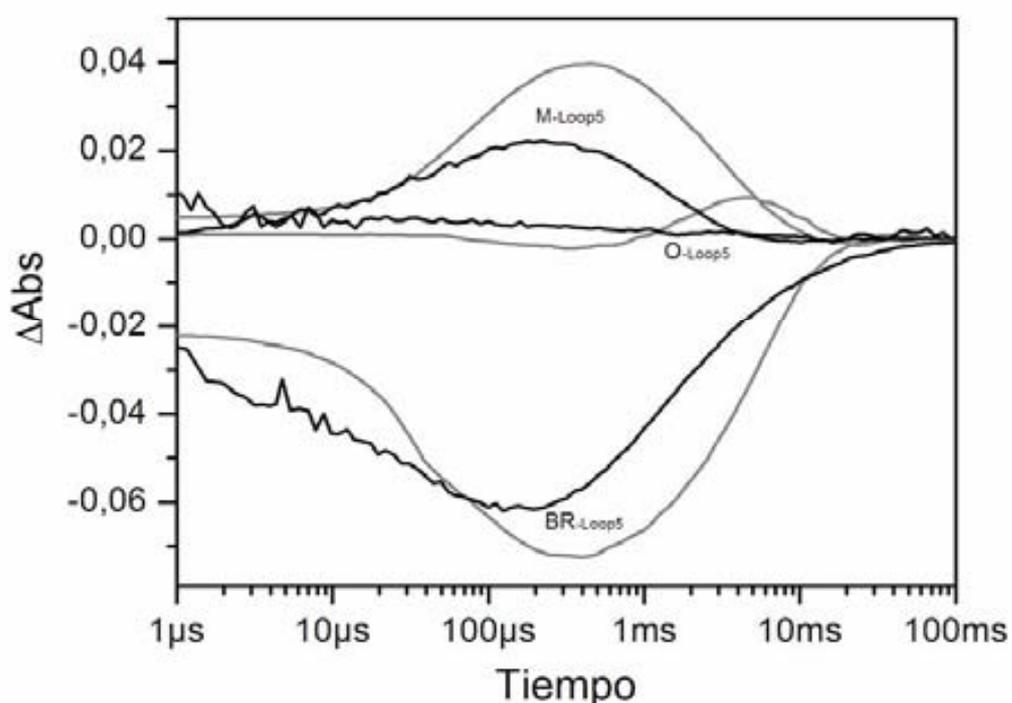


Figura 4.8. Cambios de absorbancia en el visible inducidos por el disparo de un pulso láser en una muestra 15 μ M del mutante Loop5 y de la proteína silvestre (líneas grises), en tampón fosfato 3 mM a pH 7 y 150 mM KCl, y a tres longitudes de onda diferentes (M-410 nm, BR-570 nm y O-660 nm).

La aparición del intermediario M (desprotonación de la BS) y su desaparición (reprotonación de la BS) en el mutante Loop5 son más rápidas, alrededor de 1,6 y 2,4 veces respectivamente, que en la proteína nativa. Sin embargo su acumulación es aproximadamente el 50% comparado con la acumulación de M en la proteína nativa.

La caída del estado BR₅₇₀ es más rápida también como corresponde a un intermediario M acelerado pero su recuperación, aunque es más rápida al principio se vuelve más lenta al final del fotociclo como puede observarse en la figura 4.8 y en la figura 4.9.A. Mientras que en la proteína nativa la recuperación total del estado BR se

alcanza a los 30-40 ms, en el mutante tarda más de 500 ms. Este enlentecimiento es indicativo de que en el mutante el fotociclo está desfavorecido o incluso alterado en el transcurso de los distintos intermediarios.

La acumulación del intermediario O tiene un rendimiento todavía inferior a la acumulación de M como puede observarse en la figura 4.8 y 4.9.B siendo prácticamente inexistente.

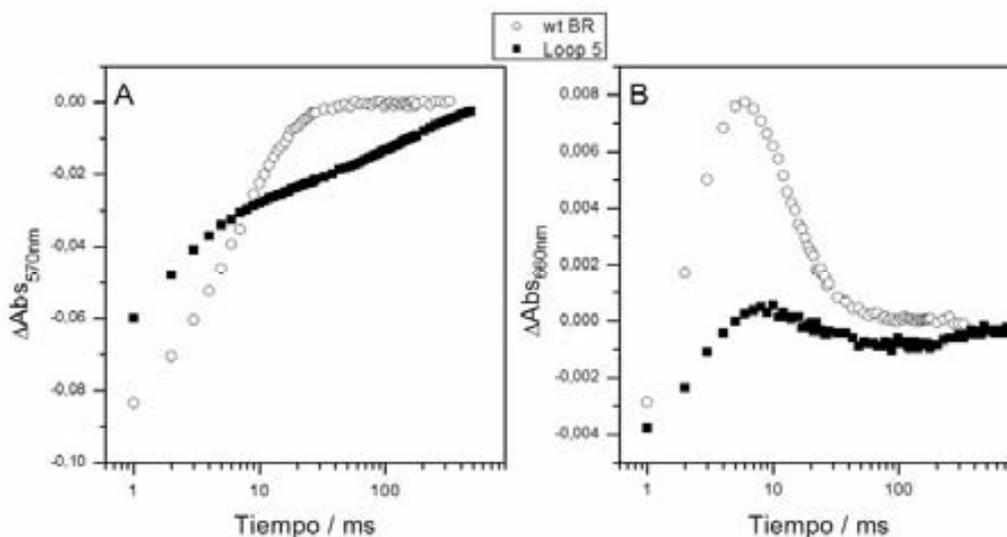


Figura 4.9. Determinación del cambio de absorbancia a 570 nm (A) y a 660 nm (B) de una muestra del mutante Loop5 y de la proteína nativa, excitadas mediante una lámpara de halógeno utilizando filtros de interferencia, en una escala de tiempo de 1 a 478 ms. Las muestras han sido preparadas a una concentración 15 μ M en tampón Tris.HCl 100 mM a pH 7 y 1 M KCl.

Al contrario que la proteína nativa, el mutante Loop5 no muestra apenas dependencia cinética respecto a la fuerza iónica para M y BR₅₇₀ como puede observarse en la figura 4.10. Esta aparente pérdida de sensibilidad de la proteína respecto a los cambios de fuerza iónica del medio en el transcurso del fotociclo podría deberse a esa disminución de la hidrofiliidad que tiene el bucle sustituido en la quimera Loop5 respecto a la proteína nativa. El hecho de que el bucle sea más hidrofóbico lo haría menos sensible a interacciones moleculares en el lado citoplasmático.

El intermediario M se compone de otros dos subintermediarios: M₁ durante el cual se produce la transferencia del protón de la BS al Asp85 y la liberación del protón al lado extracelular; y M₂ donde se produce el cambio de accesibilidad de la proteína.

También hay algún trabajo que apoya la hipótesis de que la liberación del protón al lado extracelular se produce en el intermediario M tardío (Lanyi et al., 2002), donde podría participar otro subintermediario denominado M₂' durante el cual se expulsaría el protón desde el PRG al medio acuoso (ver introducción, apartado 1.6.2).

El hecho de que en el mutante M sea tan rápido podría ser debido a la pérdida de alguno de estos subintermediarios y por tanto cabe esperar que el aumento de flexibilidad del bucle E-F afecte al transporte de protones, bien interfiriendo en la expulsión del protón al lado extracelular o bien interfiriendo en la reprotonación desde el lado citoplasmático, para lo cual se necesita ese cambio de accesibilidad de la proteína que se produce en el M tardío, o en ambos procesos.

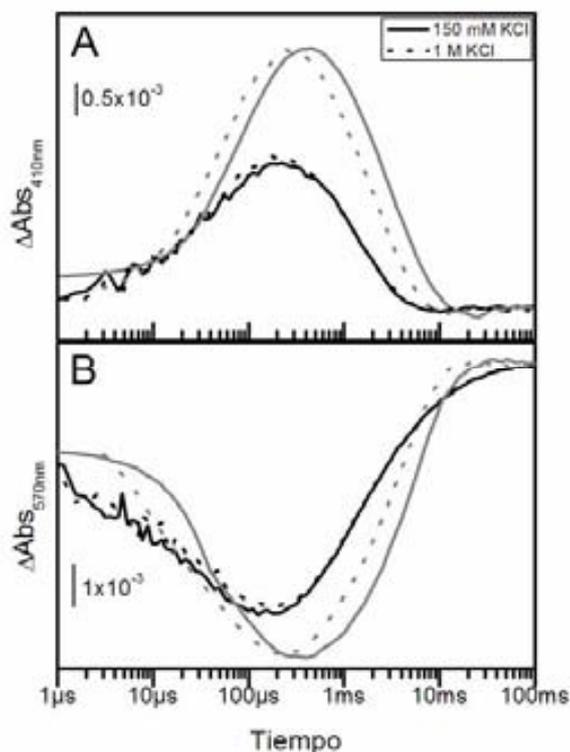


Figura 4.10. Cambio transitorio de absorbancia del intermediario M (410 nm) y del estado BR (570 nm) a pH 7 inducido por un destello láser en dos condiciones de fuerza iónica (150 mM y 1 M KCl) del mutante Loop5 (líneas negras) y de la proteína silvestre (líneas grises). Las muestras fueron preparadas a una concentración 15 μ M en tampón fosfato 3 mM pH 7 y a las concentraciones de KCl indicadas.

En la figura 4.11 se puede ver la comparación de la cinética del intermediario M con la cinética de liberación del protón al medio extracelular, determinado como el cambio de absorbancia del indicador de pH piranina.

Para poder comparar mejor las cinéticas todas las curvas han sido normalizadas dividiendo el valor del cambio de absorbancia en cada punto por el valor máximo del cambio de absorbancia en cada caso.

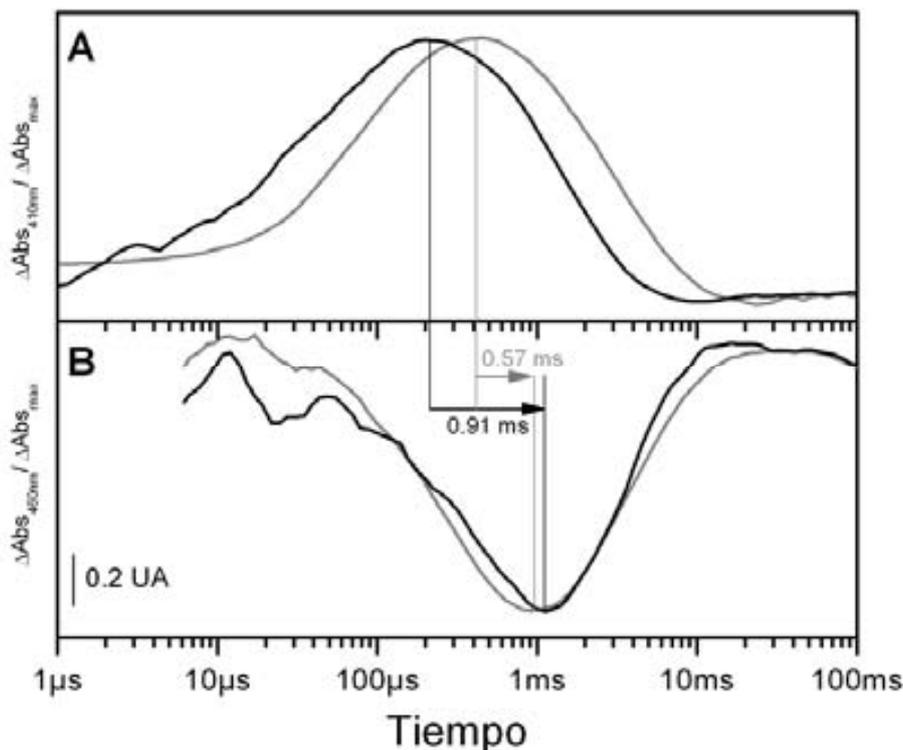


Figura 4.11. Comparación de la evolución temporal del intermediario M (A) y del transporte de protones determinado mediante el cambio de absorción de piranina a 460 nm (B) en una muestra 15 μM del mutante Loop 5 (—) y para la proteína nativa (---) en 150 mM KCl y pH 7. La concentración de piranina en las muestras es 50 μM .

En el caso de la proteína nativa el máximo de ambas cinéticas muestra un retardo de tan sólo 0,57 ms en la concentración máxima de protones en el medio respecto del máximo de formación de M. En cambio, en el mutante Loop5 este retardo es de casi 1 ms y la recuperación de la absorbancia de la piranina (reprotonación de la BR) no coincide con la desaparición de M como en el caso de la proteína nativa.

Estos resultados muestran una alteración del fotociclo tanto en el rendimiento (número de moléculas de BR que entran al fotociclo) como en su transcurso, sobre todo en lo que se refiere a la parte final del fotociclo que comprende la reprotonación de la BR desde el lado citoplasmático (M-N-O) y la relajación del retinal a su conformación todo-trans (O-BR₅₇₀). El aumento de tamaño del bucle 5 parece dificultar este proceso y hacerlo menos efectivo, sugiriendo un papel crucial de la apertura y posterior cierre de las hélices no sólo para facilitar la entrada de agua que permitiría la reprotonación de la BS desde el Asp96 y su posterior reprotonación desde el medio acuoso, sino también para permitir la reisomerización del retinal de su forma *13-cis,15-anti* a su isómero *todo-trans*.

4.1.2.2 Bombeo de protones

a) En presencia de piranina

El indicador de pH piranina permite determinar el movimiento de protones en el medio en donde se encuentra disuelta gracias al cambio de absorbancia de su forma protonada respecto a su forma desprotonada. Esto nos permite el estudio de la cinética de expulsión del protón por parte de la BR y una cuantificación de la efectividad del proceso.

El inconveniente de esta técnica es que no permite discernir la dirección del movimiento de protones ya que la proteína se encuentra incorporada en los fragmentos de membrana como una suspensión de MP. Por tanto si un protón es expulsado por el lado extracelular de la proteína y vuelve a entrar por el mismo lado podría verse igualmente un cambio de absorbancia sin que ello conlleve el transporte neto de un protón desde el lado citoplasmático al lado extracelular. Es por este motivo que la caracterización del transporte de protones en la BR se complementa con la medida del cambio de pH de la proteína incorporada en liposomas.

Sin embargo esta técnica permite el estudio de la cinética del bombeo de protones durante el fotociclo como se vio anteriormente en la figura 4.11.

La comparación de la cinética de transporte del mutante respecto de la proteína nativa muestra un desplazamiento en el cambio máximo de absorbancia de la piranina hacia la derecha, es decir, la liberación del protón está ligeramente desfavorecida en el mutante. En cambio, en la cinética de reprotonación no hay un cambio significativo aparentando ser un poco más rápida para el mutante.

La figura 4.12 muestra la cinética de transporte para una muestra 15 μM del mutante y de la proteína nativa en presencia de piranina. En la gráfica se observa la disminución del cambio de absorción máximo de la piranina en un 46% para el mutante, que se aproxima al rendimiento del intermediario M respecto de la proteína nativa. Es decir, el transporte de protones parece estar muy afectado en el mutante reduciéndose aproximadamente a la mitad de la eficiencia del transporte en la proteína nativa.

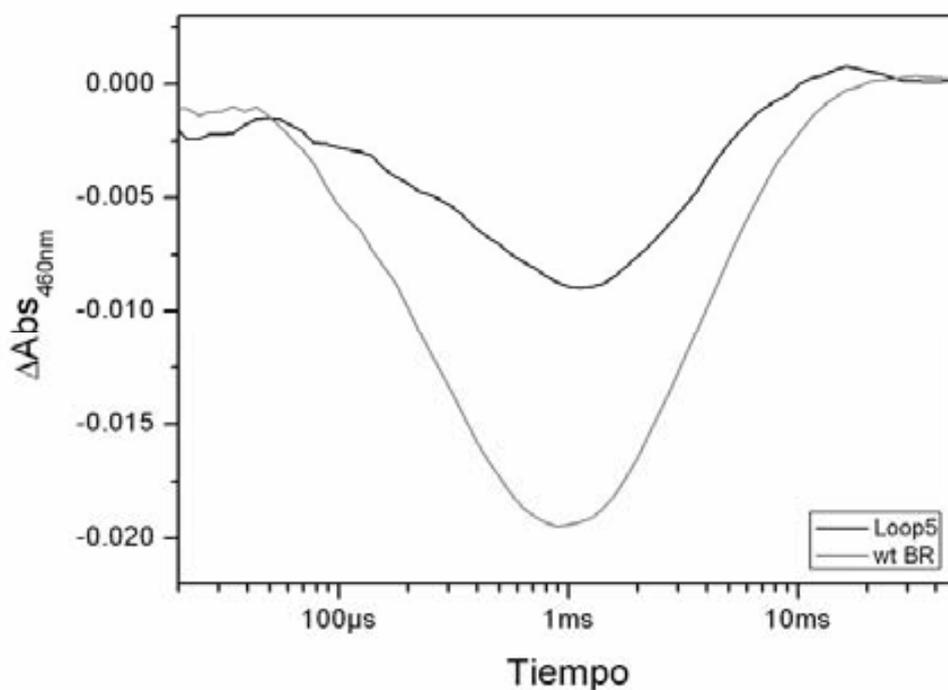


Figura 4.12. Transporte de protones medido de forma indirecta como el cambio de absorbancia a 460 nm del indicador de pH piranina al hacer incidir un disparo de luz láser. Las muestras de proteína tienen una concentración 15 μM y han sido preparadas en 150 mM KCl a pH 7,2. La piranina se ha añadido a una concentración final de 50 μM .

b) Proteína incorporada en liposomas

Los fragmentos de membrana púrpura se incorporan en liposomas de EPC con una orientación neta invertida, es decir la parte citoplasmática queda preferentemente en el lado exterior del liposoma. Cuando se ilumina una suspensión acuosa de proteoliposomas la proteína bombea protones del exterior al interior produciéndose la alcalinización del medio acuoso externo. Este cambio de pH puede registrarse con la ayuda de un pH-metro y un programa que permite registrar los cambios a lo largo del tiempo.

Mediante esta técnica es posible determinar de manera directa la presencia o no de actividad bombeadora así como comparar la eficiencia del bombeo en diferentes muestras.

En la figura 4.13 se representan los cambios de pH en el medio cuando se iluminan suspensiones de proteoliposomas de BR nativa y del mutante Loop5.

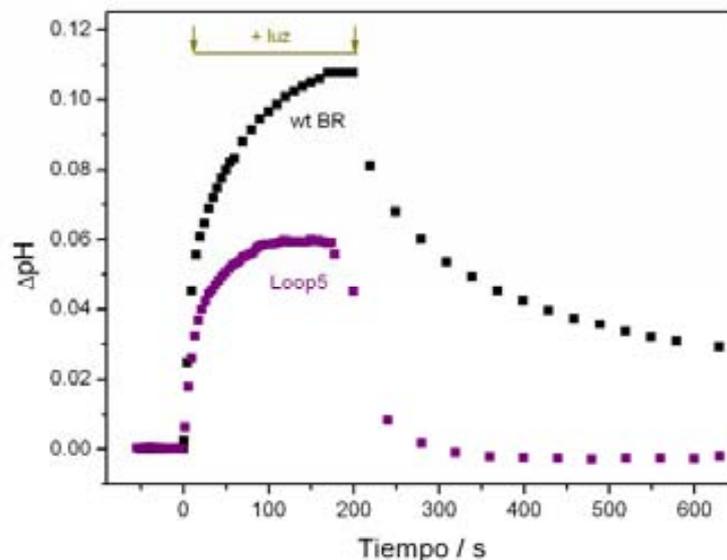


Figura 4.13. Representación del cambio de pH en función del tiempo de una suspensión acuosa de liposomas del mutante Loop5 y de la proteína nativa (0,12 mg/ml proteína : 6 mg/ml EPC) en 150 mM KCl a pH ~6,5. Las muestras se adaptan a la oscuridad y se deja que se estabilicen hasta tener un pH constante, se iluminan durante 3 minutos, momento en el cual se estabiliza de nuevo el pH, y después se para la iluminación y se registra la caída del pH.

Nada más comenzar la iluminación de las muestras se puede observar un incremento rápido del pH del medio como consecuencia del bombeo de protones del exterior al interior de las vesículas. La velocidad de incremento del pH va disminuyendo hasta que llega un momento en que se estabiliza el pH del medio como consecuencia del establecimiento de un equilibrio entre la entrada de protones por parte de la BR y la salida de protones de los liposomas por difusión. Una vez establecido este equilibrio y si se deja de iluminar la muestra el pH vuelve a su valor inicial.

El estudio de las cinéticas de bombeo en liposomas da lugar a dos conceptos, la velocidad inicial de bombeo y la cantidad de bombeo total, lo que nos permite hacer una estimación de cómo está afectada la función en un mutante respecto de la BR nativa.

En el mutante tanto la velocidad de bombeo como la tasa de bombeo total es aproximadamente un 56% respecto de los valores de la proteína nativa (ver tabla 4-1). Por tanto, la función de la proteína está afectada de manera significativa por la mutación reduciendo su eficiencia a casi la mitad de la capacidad bombeadora de la BR nativa.

4.1.2.3 Estudio del mutante Loop5 mediante FTIR

a) FTIR estático a baja temperatura

La radiación de infrarrojo tiene la capacidad de excitar diferentes grupos de enlaces dependiendo de su frecuencia (ver apartado 3.6.3.1). En la región comprendida entre 1700 y 1800 cm^{-1} se obtienen las bandas correspondientes a la vibración de tensión del enlace C=O pertenecientes a los grupos carboxílicos, tanto de los aspárticos como de los glutámicos. En la región de 1500-1700 cm^{-1} aparecen las bandas correspondientes a las frecuencias de los enlaces peptídicos proporcionando por tanto información de la estructura secundaria de la proteína. En estas regiones se puede obtener información de diversas estructuras secundarias como son las hélices α , láminas β , giros reversos y estructuras no ordenadas. En la región comprendida entre 1580 y 850 cm^{-1} se obtiene información sobre el cromóforo junto con algunos residuos de la proteína (Terpugov et al., 2001; Kotting et al., 2005).

Los espectros de diferencia estáticos consisten en restar al espectro de la muestra iluminada el espectro de la muestra sin iluminar. De esta manera se pueden determinar los cambios en las bandas de infrarrojo correspondientes a la BR en uno de los intermediarios del fotociclo respecto de la proteína en su estado basal (BR₅₇₀). El sistema de obtención de espectros consiste en la iluminación continua de una película de proteína a un pH, humedad y temperatura determinados. Dependiendo del valor de estas tres condiciones se alarga la vida media de uno u otro intermediario que es el que mayoritariamente contribuye al espectro de diferencia. Con este sistema solamente podemos atrapar los intermediarios M y N, aunque en algunos mutantes es posible encontrar mezclas con otros intermediarios como resultado de la alteración del fotociclo.

En los espectros de diferencia las bandas positivas en la zona 1700-17800 cm^{-1} , por ejemplo, son consecuencia de la protonación de grupos carboxílicos que se encontraban desprotonados en el estado basal, y por el contrario, la aparición de bandas negativas en esta misma región se debe a la desprotonación de grupos carboxílicos que en el estado basal estaban desprotonados. Son muchas las bandas de diferencia obtenidas en todo el rango de infrarrojo. La determinación de los grupos involucrados en cada una de estas bandas ha sido facilitada por la obtención de BR mutantes. Por ejemplo, la comparación de los espectros de IR del mutante D85N y la BR nativa ha permitido asignar la banda positiva a 1762 cm^{-1} , obtenida en los espectros de diferencia del intermediario M de la BR nativa, a la protonación del Asp85 (Briman et al., 1988).

Por tanto, la asignación de las bandas de aminoácidos se ha podido establecer por medio del marcaje y la mutagénesis dirigida (Rothschild, 1992). Sin embargo, todavía en la actualidad hay algunas bandas por determinar. El hecho de que se solapen entre ellas y de que las bandas del retinal y los lípidos se solapen con las de la proteína dificulta su asignación. Además, mutaciones en un aminoácido pueden dar lugar a cambios estructurales que afecten a otros grupos de la proteína, afectando por tanto a otras bandas. Para poder discriminar las bandas debidas a la proteína y al retinal se han comparado los espectros de infrarrojo con los espectros de Raman, donde sólo absorbe el retinal, y se ha marcado el retinal isotópicamente (Smith et al., 1985). La interpretación de las diferentes bandas se ve dificultada además por el hecho de que en los espectros de diferencia no se ve solamente las bandas positivas y negativas debidas a cambios de protonación, sino que también se producen cambios de entorno de los grupos o cambios estructurales, dando lugar a un desplazamiento en su banda de absorbancia y traduciéndose en un máximo y un mínimo en los espectros de diferencia.

Las bandas más importantes, características de los intermediarios M y N de la BR nativa que han sido asignadas hasta el momento se encuentran descritas en la tabla 4-2.

Como puede observarse en la tabla, el desplazamiento de la banda correspondiente al Asp85 protonado junto con la banda a 1186 cm^{-1} , que ha sido asignada a la protonación de la BS, y algunos cambios en la zona de la amida I son las diferencias más importantes entre el espectro del intermediario M y el de N en la proteína nativa.

Tabla 4-2. Bandas características de los espectros de diferencia de los intermediarios M y N en la BR nativa (Braiman et al., 1988; Rothschild, 1992). Los signos (+) y (-) indican si la banda es positiva o negativa respectivamente.

Zona del espectro	Partes que absorben	M	N	Bandas principales	Asignación de las bandas
1800-1700 cm ⁻¹	Grupos COOH de las cadenas laterales de los grupos carboxílicos	(+)	(+)	1762 cm ⁻¹	Asp 85 protonado, entorno M
			(-)	1755 cm ⁻¹	Asp 85 protonado, entorno N
		(-)		1742 cm ⁻¹	Asp 96 desprotonado
		(+)	(+)	1742 cm ⁻¹	Asp 96 perturbado
		(+)		1738 cm ⁻¹	Asp 115 perturbado
		(+)		1736 cm ⁻¹	Asp 96 perturbado
		(-)	(-)	1734 cm ⁻¹	Asp 115 perturbado
1700-1600 cm ⁻¹	Amida I	(-)	(-)	1692 cm ⁻¹	Cambios en giros reversos
			(-)	1670 cm ⁻¹	Cambios en las hélices
		(-)		1657 cm ⁻¹	Cambios en las hélices
			(+)	1650 cm ⁻¹	Cambios en las hélices
1600-1500 cm ⁻¹	Amida II	(+)		1564 cm ⁻¹	C=C del cromóforo
			(+)	1555 cm ⁻¹	N-H de la proteína y C=C del cromóforo
			(+)	1535 cm ⁻¹	Vibración C=C del cromóforo
		(-)	(-)	1527 cm ⁻¹	Vibración C=C del cromóforo
1500-1000 cm ⁻¹	Otros grupos de la proteína		(+)	1402 cm ⁻¹	Grupos COO ⁻
	Retinal	(+)	(+)	1393 cm ⁻¹	Vibración C ₁₅ -H cromóforo.
		(+)		1302 cm ⁻¹	Vibración cromóforo.
		(-)	(-)	1201 cm ⁻¹	Vibración C ₁₄ -C ₁₅ de <i>todo-trans</i>
			(+)	1186 cm ⁻¹	Pico por debajo de la línea base: retinal <i>13-cis</i> + BS desprotonada. Pico por encima de la línea base: retinal <i>13-cis</i> + BS protonada.

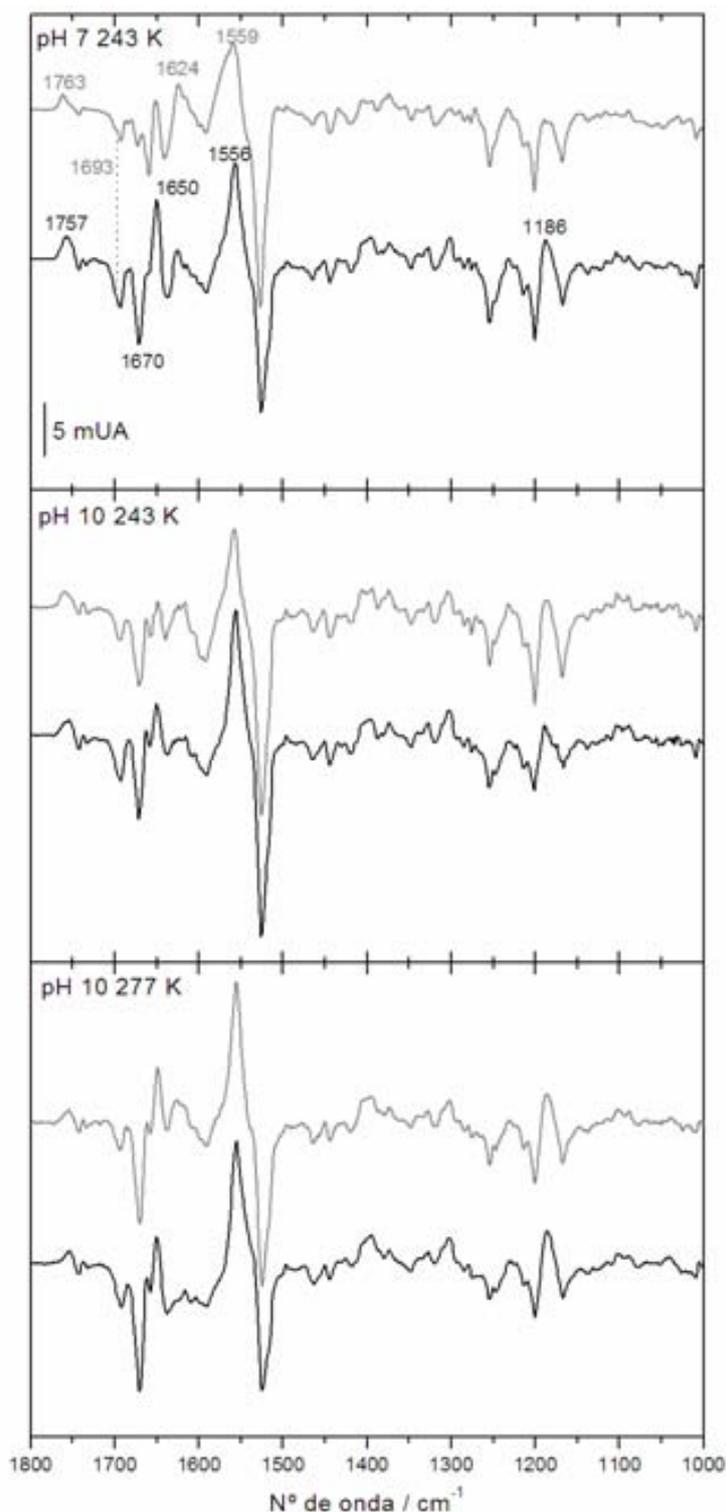


Figura 4.14. Espectros de diferencia de FTIR obtenidos a partir de muestras hidratadas del mutante Loop5 (—) y de la BR nativa (---) en tampón 3 mM fosfato sódico pH 7 o 3 mM carbonato sódico pH 10, en 150 mM KCl y a diversas temperaturas. A pH 7 y a una temperatura de 243 K (-30°C) se puede atrapar mayoritariamente el intermediario M en la proteína nativa. A pH 10 y 277 K (4°C) se favorece la acumulación del intermediario N. Disminuyendo la temperatura a 243 K a pH 10 se ve una mezcla de los dos intermediarios. En todos los casos las muestras del mutante Loop5 acumulan el intermediario N mayoritariamente, siendo imposible favorecer la acumulación de M en estas condiciones.

El espectro de FTIR del mutante Loop5 a 243 K y pH 7 presenta varias diferencias notables respecto al espectro de la proteína nativa en las mismas condiciones (figura 4.14). Una de las más prominentes es el desplazamiento de la banda positiva que se asigna a la vibración del grupo C=O del Asp85 protonado de 1763 cm^{-1} a 1757 cm^{-1} . La banda negativa a 1693 cm^{-1} (cambios en giros β) que es más intensa en el mutante, junto con una relación de intensidad de las bandas a 1650 y 1670 cm^{-1} (estructuras α) cercana a 1, la disminución de la intensidad de la banda a 1624 cm^{-1} (posiblemente enlace C=NH de la BS en estado de reposo (Terpugov et al., 2001), el desplazamiento de la banda correspondiente a la amida II y la vibración de tensión de C=C del retinal de 1559 a 1556 cm^{-1} y la banda positiva a 1186 cm^{-1} (protonación de la BS) son características del intermediario N. Por tanto, mientras que en la proteína nativa se puede atrapar el intermediario M en estas condiciones, en el mutante se acumula mayoritariamente el intermediario N debido probablemente a que el intermediario M es más rápido y no tiene un buen rendimiento como demuestran los experimentos de fotólisis de destello.

A pH 10 y 243 K donde puede verse la transición de M a N para la proteína nativa, siendo el intermediario M el que más contribuye, en el caso del mutante el intermediario predominante es N (figura 4.14). Sin embargo en estas condiciones hay una mayor contribución de M para el mutante que en el espectro anterior, como puede verse por el aumento de la intensidad de las bandas en la región de la amida II (1600 - 1500 cm^{-1}) respecto de las bandas del cromóforo (1300 - 1100 cm^{-1}), una disminución de la banda a 1186 cm^{-1} y una menor relación de intensidad de las banda a 1650 cm^{-1} respecto de la banda a 1670 cm^{-1} .

A pH 10 y a 277 K (4° C) el espectro de diferencia de FTIR muestra N mayoritariamente para una muestra de BR nativa (figura 4.14). En el caso del mutante el espectro de diferencia corresponde también al intermediario N y en este caso no hay apenas diferencias entre el espectro del mutante y el de la proteína nativa.

Una forma de poder atrapar el intermediario M es utilizar películas de proteína deshidratadas. En este caso, al iluminar la muestra el fotociclo se para en el intermediario M debido a que es necesario un porcentaje mínimo de hidratación de la muestra para que se de la reprotonación desde el exterior de la proteína y, por tanto, pueda finalizar el fotociclo siguiendo el camino $M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR$ (Lazarova et al., 2002).

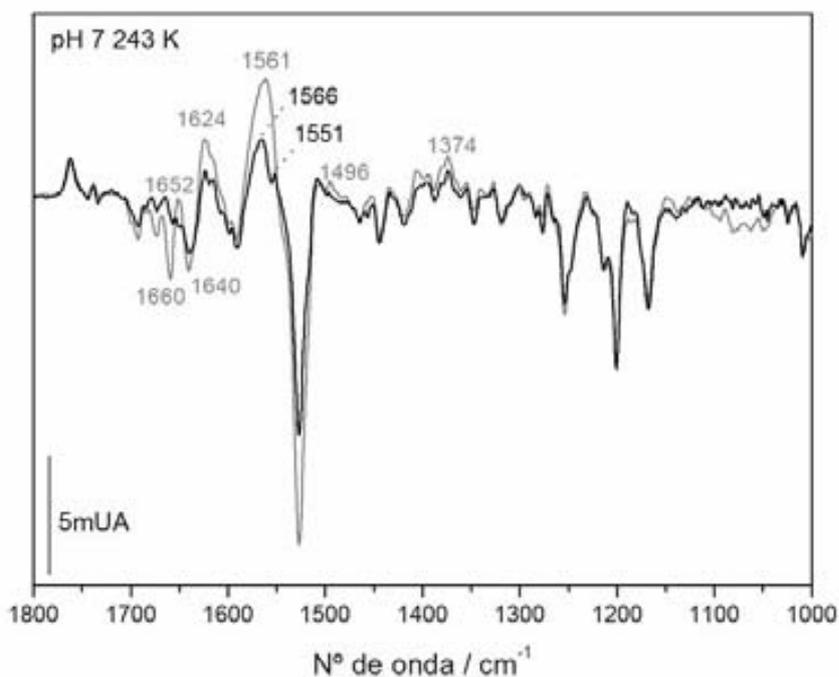


Figura 4.15. Espectros de diferencia de FTIR de muestras sin hidratar del mutante Loop5 (—) y de la BR nativa (—) a 243 K en tampón fosfato 3 mM pH 7 y 150 mM KCl. En estas condiciones se puede atrapar el intermediario M debido a que el fotociclo no puede continuar en ausencia de agua. Las principales diferencias entre el espectro del mutante y de la BR nativa se encuentran en las bandas de la amida I y amida II, situadas en la región 1700-1500 cm⁻¹ del infrarrojo.

El estudio de una muestra deshidratada del mutante Loop5 a pH 7 y 243 K ha permitido atrapar un intermediario “M-like” como puede verse en la figura 4.15. El espectro de diferencia del mutante presenta alteraciones importantes en la región 1700-1500 cm⁻¹ respecto de la proteína nativa. Como ya se ha mencionado anteriormente, en esta región los grupos y estructuras que absorben son la amida I (diferentes estructuras secundarias), la amida II (enlace N-H de los aas y grupos C=C del retinal).

Por tanto, el intermediario M en el mutante Loop5 es difícil de estudiar mediante FTIR estático debido probablemente a que tiene un bajo rendimiento y es más rápido que en la proteína nativa como puede verse en los estudios de fotólisis de destello. Esto dificulta su acumulación a baja temperatura y sólo es posible atrapararlo en muestras deshidratadas en donde el fotociclo se para en M. La figura 4.15 muestra importantes diferencias en el espectro de diferencia del intermediario M del mutante respecto del espectro de la BR nativa, revelando alteraciones importantes en los cambios que se producen en la estructura secundaria cuando la proteína se ilumina y pasa del estado BR₅₇₀ al intermediario M. Asimismo el entorno de la BS también está significativamente alterado por la mutación mostrando una mayor facilidad para

reprotonarse, como puede verse por la banda a 1186 cm^{-1} que siempre es más intensa en el mutante, y la banda a 1624 cm^{-1} que es menos intensa y se cree que puede corresponder a la BS sin protonar (Terpugov et al., 2001).

En cambio el espectro del intermediario N no presenta grandes diferencias en el mutante respecto de la proteína nativa excepto por una mayor diferencia de intensidad entre las bandas a 1186 y 1624 cm^{-1} en el mutante que ya es visible en M, y una mayor intensidad de las bandas a 1650 y 1670 cm^{-1} (cambios en las hélices). Este intermediario es fácil de detectar a baja temperatura y probablemente su presencia a pH neutro es debida a una posible aparición temprana del intermediario durante el fotociclo. Estos resultados confirman la gran alteración funcional que sufre la BR como consecuencia del incremento de flexibilidad de las hélices E y F en el proceso de reprotonación de la proteína desde el lado citoplasmático, afectando de manera muy relevante al intermediario M y a la cinética del fotociclo en general.

El hecho de que la BS parezca reprotonarse con más facilidad podría estar relacionado con una mayor accesibilidad al interior de la proteína desde el lado citoplasmático, lo cual implicaría un desequilibrio en el mecanismo de cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático. Este mecanismo es básico para asegurar que el transporte sea unidireccional y su alteración podría explicar la disminución de la eficiencia en el bombeo de protones que sufre el mutante respecto a la eficiencia del transporte en la proteína nativa.

b) FTIR resuelto en el tiempo (ss-FTIR)

La técnica de step-scan FTIR (ss-FTIR) nos permite adquirir espectros de una muestra hidratada de proteína a una elevada resolución temporal, del orden incluso de 10 nanosegundos al comienzo de la medición hasta 20 ms aproximadamente al final de la adquisición, permitiendo así estudiar la evolución del fotociclo a temperatura ambiente y caracterizar distintos intermediarios, ya que cada uno de ellos tiene un espectro de diferencia de FTIR característico. A pesar de que esta técnica tiene una gran resolución temporal algunos intermediarios son tan rápidos o están tan solapados con otro intermediario que no podemos separar su espectro característico, como por ejemplo los intermediarios K y O. En algunos casos es posible favorecer su acumulación trabajando a distintos pH (Zscherp et al., 2001).

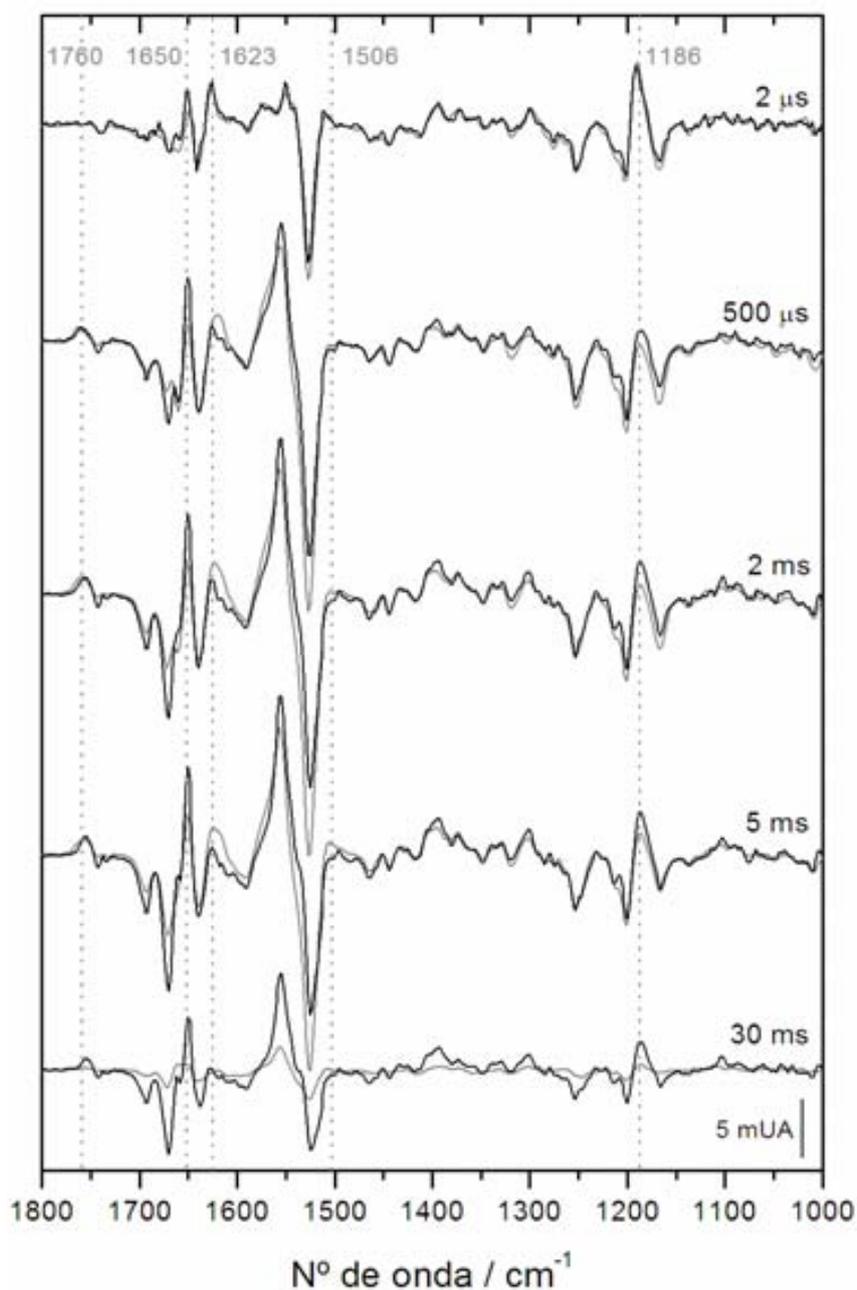


Figura 4.16. Espectros de diferencia de FTIR a distintos tiempos de adquisición tras la excitación mediante un pulso de luz láser de una muestra del mutante Loop5 (—) en tampón Tris 100 mM pH 7, 1 M KCl, 20° C y adquiridos mediante la técnica de ss-FTIR. En gris se representan los espectros de una muestra de proteína nativa en las mismas condiciones. Las líneas de puntos señalan algunas de las bandas que sufren una mayor alteración en el mutante.

Al igual que sucedía en la técnica de fotólisis de destello y también en el FTIR estático, lo que vemos normalmente es una mezcla de intermediarios en donde uno de ellos es el mayoritario pero es casi imposible aislarlos completamente porque el fotociclo es muy rápido y los intermediarios se solapan.

En la figura 4.16 se representan espectros de diferencia a cinco tiempos de adquisición distintos donde puede verse un ejemplo de la evolución temporal de una muestra del mutante Loop5 y de la proteína nativa después de ser fotoexcitadas.

Los espectros de diferencia de la BR nativa muestran como a $2 \mu\text{s}$ se puede ver el espectro característico del intermediario L, que es el primero que se puede estudiar con esta técnica. En este intermediario la proteína acomoda el nuevo estado del retinal isomerizado mediante la reorganización de moléculas de agua en su interior y la relajación de algunas hélices. En el espectro se puede detectar los primeros cambios en la zona de la amida I relacionados con esos cambios en la estructura secundaria, aunque son menos intensos que en M y N.

A $500 \mu\text{s}$ aparece mayoritariamente el intermediario M, aunque ya se forma a tiempos tan tempranos como $20 \mu\text{s}$ pero al estar todavía presente el intermediario L el espectro de diferencia resultante es una suma de los dos intermediarios. A 2 ms ya empieza a formarse N pero todavía M es mayoritario y no es hasta aproximadamente 5 ms que puede verse su espectro característico. A 30 ms la proteína ya se ha relajado casi completamente y sólo queda alguna banda en la zona de la amida I y la amida II y en la zona del retinal aunque muy poco intensas. El fotociclo ya se ha terminado y la proteína ya está preparada para poder comenzar otro ciclo.

En el caso del mutante Loop5 se puede ver también el espectro característico del intermediario L a $2 \mu\text{s}$, sin cambios significativos respecto al espectro de la BR nativa exceptuando pequeñas variaciones en la zona de absorción de las hélices. Estas variaciones podrían estar relacionadas con un mayor contenido de hélice α en el mutante respecto de la proteína nativa suponiendo que el bucle de la Rho tiene un plegamiento similar al nativo cuando se expresa en la BR (ver apartado y figura 4.1).

Pero a $500 \mu\text{s}$ se pueden ver ya mayores diferencias en el espectro del mutante respecto al espectro de la BR nativa. La banda a 1763 cm^{-1} se encuentra desplazada a 1760 cm^{-1} y ensanchada hacia frecuencias menores como en la transición M-N. Aparece una banda negativa a 1743 cm^{-1} que sería característica del Asp96 desprotonado, pero este residuo no se desprotona hasta el intermediario N. Aunque también podría ser debido a alteraciones en el entorno del Asp115 que absorbe muy cerca y se solapa con la banda del Asp96. Aquí las diferencias en la zona de la amida I ($1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$) son ya más notables, sobre todo en lo que se refiere a la banda a 1623 cm^{-1} (BS en estado de relajación presumiblemente), la región de la amida II tiene una forma más característica de intermediario N que de M y además la banda a 1186 cm^{-1} ya es

ligeramente positiva. Por tanto, en el mutante a 500 μ s parece que ya hay presencia del intermediario N. Es decir, al igual que veíamos en fotólisis de destello M es tan rápido que no se puede separar bien en el tiempo mediante la técnica de ss-FTIR. Todo el intermediario M que se acumula en el mutante parece corresponder al intermediario M₁ o M temprano pudiendo darse una pérdida del intermediario lento M_s o M₂ debido a la mutación. Este último estaría relacionado con el cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático (mecanismo de “switch” de la proteína). Esto explicaría que la BS se reprotona tan temprano en el fotociclo, e incluso podría ser el motivo de la desprotonación temprana del Asp96. Es decir, el aumento de la flexibilidad de las hélices E y F en el mutante favorecería en gran medida la reprotonación de la BS, de forma que esta sería reprotonada inmediatamente después de ceder su protón al Asp85. De hecho su absorbancia nunca se vuelve negativa como puede verse en la figura 4.18 (gráfica de intensidad a 1186 cm^{-1}) y como correspondería a la reacción de desprotonación de la BS.

A 2 ms el mutante presenta un espectro que ya es característico del intermediario N mientras que en la proteína nativa se está produciendo la transición M-N. A 5 ms ambas proteínas acumulan N mayoritariamente y puede verse como en el mutante el intermediario presenta unas bandas más intensas en la zona de absorción de la estructura secundaria, así como una importante alteración en las bandas de la amida II donde la relación de intensidades entre la banda positiva (1556 cm^{-1}) y la negativa (1525 cm^{-1}) es más cercana a 1 que en la proteína nativa y además la banda negativa se encuentra ligeramente desplazada a un número de onda menor lo que implica un debilitamiento de los enlaces responsables de la vibración que absorbe en esa zona. No se puede observar la banda positiva a 1506 cm^{-1} correspondiente a la aparición del intermediario O como en la proteína nativa. Además la banda correspondiente al Asp85 (1755 cm^{-1}) protonado es más estrecha y más intensa al igual que la banda correspondiente a la protonación de la BS (1186 cm^{-1}).

El espectro a 30 ms confirma también el enlentecimiento del fotociclo en el mutante donde se distingue claramente el intermediario N, aunque menos intenso, mientras que para la proteína nativa apenas hay absorción. De nuevo se ve como la relajación de la proteína y la recuperación del estado BR₅₇₀ está dificultado por la mayor flexibilidad de las hélices E y F en el mutante Loop5. Además el fotociclo parece seguir el camino L-M-N-BR₅₇₀, desapareciendo por tanto el intermediario O en el fotociclo del mutante.

En la figura 4.17 se representan las áreas y las intensidades que han sido estudiados de manera más extensa para el mutante Loop5 en comparación con la proteína nativa. Además, en el caso de las áreas, se ha asignado el residuo o grupo que absorbe en esa región del espectro y da lugar por tanto a esa banda. Estas regiones del espectro se han elegido por representar las bandas de absorción que sufren más cambios a lo largo del fotociclo en los espectros de diferencia de ss-FTIR entre ambas proteínas.

La banda de absorción en la zona del retinal (centrada a 1250 cm^{-1}) se ha utilizado para la normalización entre ambas muestras de proteína por ser un indicativo de la cantidad de moléculas que han sido fotoexcitadas en cada medición.

Como puede verse en la figura 4.18 el mutante Loop5 presenta cambios significativos en las cinéticas de protonación y desprotonación de algunos residuos, así como cambios que afectan su estructura secundaria.

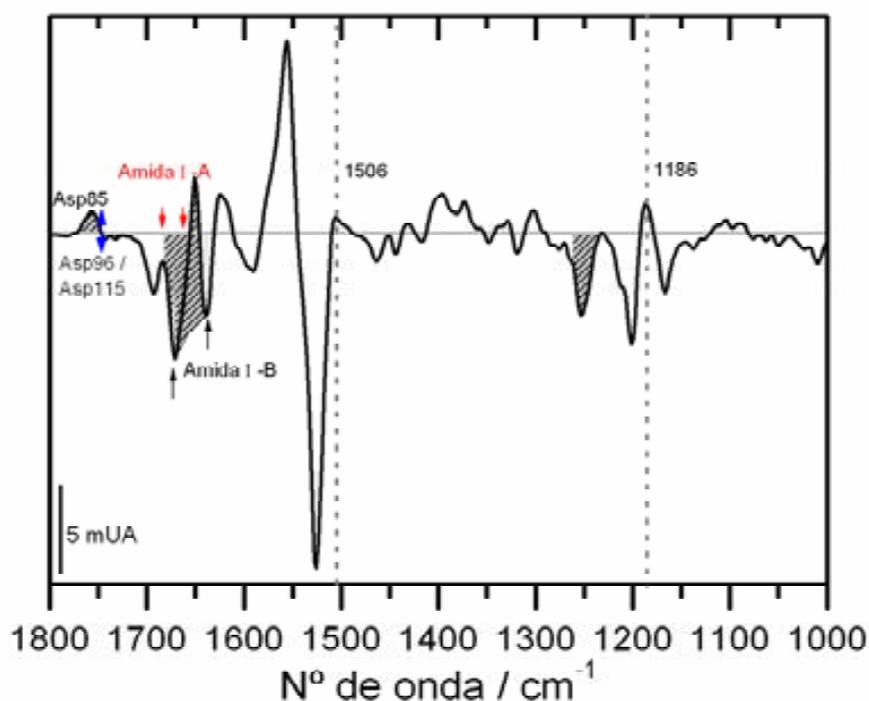


Figura 4.17. Representación de las distintas áreas del espectro de FTIR estudiadas en la figura 4.18 y su correspondiente asignación. El espectro de diferencia corresponde a la proteína nativa en buffer Tris 100 mM, 1 M KCl a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 5 ms de ser fotoexcitada. El área de la banda centrada a 1250 cm^{-1} , que pertenece a un modo de vibración del retinal, se ha usado para normalizar los espectros del mutante respecto de la proteína nativa. Las líneas de puntos representan los valores de las bandas para las cuales se ha representado la variación de su intensidad a su abs_{max} en vez de su área por ser bandas características de un determinado proceso y que aparecen en un tiempo concreto del fotociclo. A este caso pertenecen la banda a 1506 cm^{-1} , que es característica de los intermediarios K y O, y la banda a 1186 cm^{-1} que es debida a la desprotonación y posterior protonación de la BS, y a la recuperación del estado basal de la proteína.

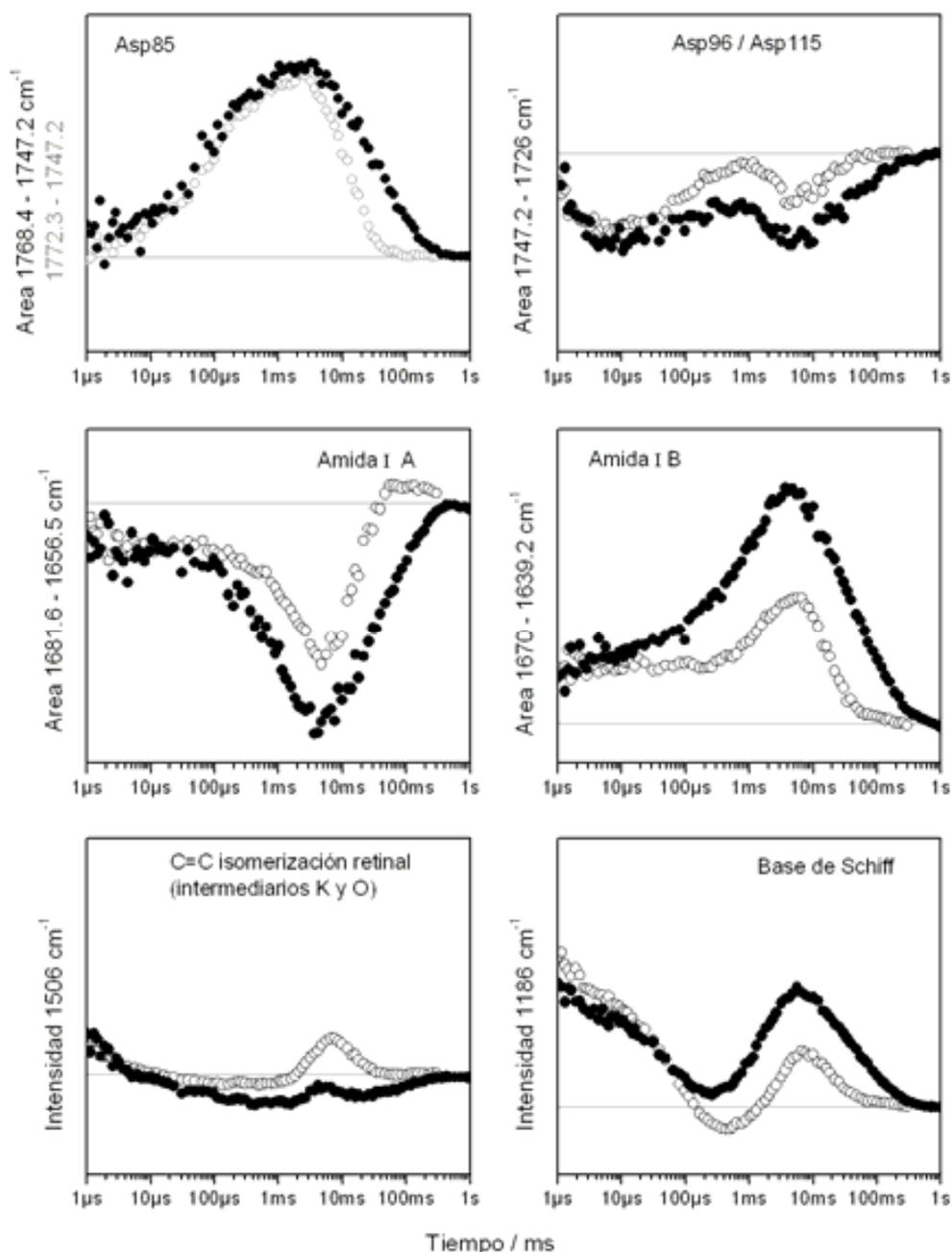


Figura 4.18. Cinéticas del fotociclo determinadas mediante FTIR resuelto en el tiempo (ss-FTIR) para algunas bandas seleccionadas (ver figura 4.17) del mutante Loop5 (círculos negros) y de la BR nativa (círculos grises abiertos). En cada gráfica se especifica la asignación de la banda. Exceptuando las gráficas de la última fila todas las cinéticas corresponden a la integración de una región específica del espectro, corregida para la línea base entre los límites de integración. Todos los espectros han sido normalizados para representar la misma cantidad de moléculas fotoexcitadas.

La banda correspondiente a la vibración del grupo C=O del Asp85 es un poco más intensa en el mutante que en la proteína nativa, y además está desplazada a una frecuencia menor como puede verse por el intervalo que se ha elegido para su integración (figura 4.18). Además su formación (Asp85H) parece un poco más temprana, aunque no hay una gran diferencia con la proteína nativa pero su desaparición es 3 veces más lenta (Asp85⁻) aproximadamente. Por tanto, el tiempo durante el cual el Asp85 está protonado en el fotociclo del mutante Loop5 es mayor que en la proteína nativa.

En el intervalo de 1747-1726 cm⁻¹ aparece la absorción de otros dos aspárticos, Asp96 y Asp115, cuyas bandas se solapan y dificultan su estudio por separado.

El Asp115 sufre perturbaciones en su entorno durante el fotociclo actuando como un elemento regulador del traspaso del protón desde el Asp96 a la BS (Peralvarez-Marin et al., 2007). El Asp96 se desprotona durante el intermediario N para reprotonar a la BS y después es reprotonado desde el lado citoplasmático durante el intermediario O.

En la BR nativa esta banda se vuelve negativa al principio debido a las perturbaciones que sufren ambos residuos al relajarse las hélices para acomodar al retinal isomerizado. Aproximadamente a 1 ms la banda desaparece y después vuelve a aparecer durante la desprotonación del Asp96 en N, volviendo a cero durante su reprotonación y la relajación de la proteína. En el caso del mutante la banda no desaparece hasta el final del fotociclo cuando la proteína se relaja y su intensidad es mayor que en la proteína nativa. El hecho de que esta banda esté presente en todo el fotociclo podría ser debido a que la aparición del intermediario N es tan temprana en el mutante que no hay separación temporal suficiente entre el primer evento (perturbación del entorno Asp96/Asp115) y el segundo evento (desprotonación del Asp96) para poder ser detectada mediante esta técnica.

Dos de las bandas más importantes que aparecen en la zona de la amida I, denominadas en este trabajo amida I-A y amida I-B (ver figura 4.17) corresponden a cambios en hélices α durante el fotociclo. El origen de esos cambios no está claro y ha sido motivo de discusión, pero algunos autores creen que están asociadas a la apertura de las hélices para facilitar la reprotonación al final del fotociclo. El hecho de que su máximo coincida en el tiempo con la aparición del intermediario N y que las bandas tengan signo opuesto parece apoyar la teoría del movimiento opuesto de las hélices F y G. Además de las hélices se cree que el bucle E-F sufriría también un desplazamiento como consecuencia del movimiento de la hélice F hacia fuera de la proteína. Algunos

trabajos sugieren una posible apertura o desenrollamiento del bucle basándose en su mayor accesibilidad al medio acuoso durante la segunda parte del fotociclo (ver apartado 1.9).

Suponiendo que en el mutante Loop5 el bucle que se ha sustituido tiene una parte de conformación α , al igual que en su entorno nativo en Rodopsina, y teniendo en cuenta que es el bucle que une las hélices E y F, si se da ese movimiento de hélices entonces cabría esperar una mayor absorbancia para estas bandas debido a que habría mayor contribución de estructura α en el espectro de diferencia.

En la figura 4.18 puede verse como efectivamente estas bandas son más intensas, sobre todo la amida I B. Además esta banda tiene una cinética de formación más rápida en el mutante que en la proteína nativa, en cambio, la banda de la amida I A en el mutante aparece casi al mismo tiempo que en la proteína nativa. Al igual que en el resto de las cinéticas se ve también como la desaparición de estas bandas, relacionada con la relajación de la proteína, es más lenta.

El cambio de intensidad a 1506 cm^{-1} a lo largo del tiempo permite estudiar la aparición y desaparición de los intermediarios K y O (Zscherp et al., 2001), al igual que sucedía en el visible con la banda a 660 nm. En este caso se ve también como no hay apenas presencia del intermediario O y la banda, además de ser mucho menos intensa, se sitúa por debajo de la línea base.

El estudio de la cinética del cambio de intensidad a 1186 cm^{-1} nos permite caracterizar distintas reacciones en la BR. Es uno de los picos que aporta mayor información sobre el fotociclo. En la proteína nativa esta banda es positiva al principio debido a la isomerización del retinal (K+L), después se hace negativa debido a la desprotonación de la BS (M), vuelve a ser positiva cuando se reprotona la BS (N+O) y finalmente desaparece cuando el retinal vuelve a su conformación inicial (BR₅₇₀).

En la figura 4.18 se ve como esta banda no se vuelve negativa en ningún momento para el mutante, sugiriendo de nuevo que la BS no llega a estar desprotonada porque su reprotonación es casi simultánea a su desprotonación. Asimismo sugiere un bajo rendimiento del intermediario M y una desaparición del intermediario mucho más rápida que en la proteína nativa.

La desaparición más tardía de la banda en el mutante refleja una reisomerización del retinal más lenta que en la proteína nativa. Por tanto, la flexibilidad de las hélices parece influir también en el proceso de reisomerización del retinal *13-cis*, *15-anti*,

siendo necesaria la recuperación de la compactación de las hélices al final del fotociclo para permitir que el retinal vuelva a su estado *todo-trans*.

4.1.3 Discusión

El aumento de flexibilidad del bucle E-F de la bacteriorodopsina que se da en el mutante Loop5 tiene consecuencias estructurales y funcionales muy importantes.

Los estudios estructurales del entorno del retinal (adaptación luz-oscuridad, pK_a Asp85) no revelan diferencias significativas entre el mutante y la proteína nativa, como en principio cabe esperar debido a que la mutación se encuentra lejos de este entorno. Sin embargo los estudios de estabilidad térmica, en el UV-Vis o mediante DSC, demuestran que el mutante es menos estable y se desnaturaliza a una temperatura de 11-15° C inferior a la proteína nativa dependiendo de las condiciones y del experimento. En el termograma de DSC se ve como el pico de pre-transición presente en la BR nativa desaparece o se solapa con el pico principal en el mutante, siendo la causa más probable la pérdida de la compactación de la MP como consecuencia del mayor volumen del bucle E-F. También podría ser que la pérdida de la estructura bidimensional de la MP y la desnaturalización de las moléculas de BR tengan una transición tan próxima que se solapen y den lugar a un solo pico en el termograma. En cualquier caso la estructura parece menos compacta.

Esto coincidiría con los resultados de AFM de la quimera IIIN que se describen en el apartado 4.1, teniendo presente que ambos mutantes tienen 3 aminoácidos de diferencia en el bucle sustituido. En el mutante IIIN se sustituyen 8 aminoácidos del bucle 5 de la BR por 24 aminoácidos del homólogo en la Rho y se expresa en *H.salinarum* dando lugar al mutante IIIN, con tres aminoácidos más que el mutante Loop5. Este bucle presenta una gran flexibilidad en el entorno de la MP. Además, se ve también como este bucle adopta una combinación de estructura α con estructura desordenada como se muestra en la figura 4.19.

Mediante AFM es posible ver como la sustitución del bucle genera una protuberancia de la proteína en el lado citoplasmático de la MP, aunque esta no muestra alteraciones significativas en su ordenamiento ni en la vista de la membrana desde el lado extracelular.

Sin embargo, esta alteración del lado citoplasmático de la MP podría ser suficiente para causar una alteración en el proceso de desnaturalización de la proteína.

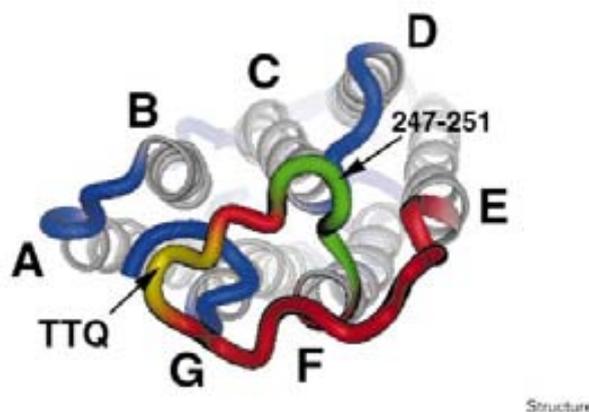


Figura 4.19. Estructura de una probable conformación del bucle E-F en el mutante IIN de BR, en donde se ha sustituido el bucle EF de la BR por el equivalente en Rho. Esta estructura ha sido determinada mediante AFM (Heymann et al., 2000).

A nivel funcional el mutante presenta cambios más drásticos. El transporte de protones es la mitad de efectivo que en la BR nativa como demuestran los estudios de bombeo de protones de la proteína incorporada en liposomas, y los cambios de absorción de la piranina a 460 nm en muestras de proteína fotoexcitadas mediante láser. Esto se corresponde con un fotociclo alterado donde la acumulación del intermediario M es también del 50 % respecto a la proteína nativa.

Además el intermediario M en el mutante tiene una cinética acelerada (liberación del protón y cambio de accesibilidad de la proteína). Asimismo el mutante Loop5 tiene una escasa o nula acumulación del intermediario O (reprotonación del Asp96 desde el citoplasma) y una recuperación del estado basal (BR₅₇₀) aproximadamente diez veces más lenta que la BR nativa. Se ha visto mediante estudios de rayos X en cristales de mutantes de BR que la reprotonación del Asp96 es necesaria para que se de la reisomerización del retinal (Dioumaev et al., 2001). En mutantes donde está dificultada la reprotonación de esta aspártico también está dificultada la reisomerización del retinal.

La posible pérdida de algún subintermediario de M, en donde la proteína cambia su accesibilidad del lado extracelular al lado citoplasmático, junto con una aparición tan temprana del intermediario N, determinada mediante ss-FTIR, podría indicar que en el mutante la proteína tiene una apertura preferente hacia el lado citoplasmático debido a la mayor flexibilidad del bucle E-F. El mecanismo de cambio de accesibilidad en la proteína es el responsable de la vectorialidad del transporte. El hecho de que esté alterado explicaría que el transporte sea menos efectivo.

Además la cinética del fotociclo no está influenciada por la fuerza iónica del medio como sucede para la BR nativa, cuyos espectros muestran una aceleración del fotociclo al aumentar la fuerza iónica. Estos resultados sugieren un papel dinámico del bucle E-F en el fotociclo debido a que alterar su estructura y su polaridad influye sobre la cinética del mismo.

Por otro lado, una menor sensibilidad del bucle de la Rho en el mutante Loop5 respecto al bucle de la BR podría estar marcada por la función que desarrolla ese bucle en cada proteína. Es decir, en la BR ese bucle es móvil y se cree que participa de forma indirecta en el transporte sufriendo cambios durante la reprotonación de la proteína. Estos cambios estructurales podrían favorecer contactos electrostáticos y de Van der Waals con el medio ayudando a atraer los protones que están en el lado citoplasmático para poder ser introducidos dentro de la proteína y transportados al lado extracelular. Por el contrario, en la Rho este bucle interacciona con la transduccina que es la proteína que se acopla al receptor cuando se activa. El hecho de que este bucle sea más “compacto” y un poco más hidrofóbico podría favorecer esa interacción proteína-proteína.

Ese cambio en la secuencia aminoacídica del bucle constituiría por tanto un cambio evolutivo para adecuarse a la función de cada proteína de membrana, pero en ambos casos indica que es un bucle dinámico y que participa en el proceso de transporte en el caso de la BR y de señalización molecular en el caso de la Rho. Asimismo podría ejercer un papel similar en otras GPCRs siendo por tanto un elemento dinámico en el funcionamiento de estos receptores de membrana.

Este papel dinámico ha sido ampliamente debatido (ver introducción, apartado 1.9). Existen diversos trabajos, utilizando distintas técnicas y aproximaciones, que sugieren un movimiento de la hélice G hacia el interior de la proteína y de la hélice F hacia el exterior, pudiendo arrastrar consigo el bucle E-F y extenderse incluso a la parte superior de la hélice E.

La posibilidad de que este movimiento de hélices pueda estar reflejado en los espectros de diferencia en el infrarrojo entre la proteína iluminada y la proteína sin iluminar, asociado a las bandas a 1650 y 1670 cm^{-1} en la zona de la amida I, sería coherente con el hecho de que estas bandas son más intensas para el mutante en donde el bucle sustituido parece tener tendencia a formar estructura α .

Otra alteración importante es la aparición tan temprana en el fotociclo de la banda de desprotonación del Asp96 y la banda de reprotonación de la BS en ss-FTIR. El

Asp96 podría desprotonarse más rápido en el mutante debido a una disminución en el valor de su pK_a al quedar más expuesto al medio acuoso. De la misma forma se favorecería la reprotonación de la BS.

La coexistencia de los intermediarios M y N podría ser debida a que la expulsión del protón y la reprotonación de la BS no están separadas temporalmente en el mutante o incluso la captura del protón se da antes, lo cual sucede también en la BR nativa cuando se estudia el fotociclo a pH ácido (Zimanyi et al., 1992b).

El hecho de que la acumulación del intermediario O en el mutante sea casi inexistente refleja también una profunda alteración en el mecanismo de reprotonación de la proteína y en la recuperación del estado basal al final del fotociclo.

En el intermediario O, además de la reisomerización del retinal, el Asp 96 se reprotona desde el lado citoplasmático. No se sabe con certeza si esa reprotonación es directa desde el agua que se encuentra en el exterior de la proteína y a través de la red de aguas en el interior de la proteína; o si hay otro residuo que actúa de antena captando el protón y cediéndolo al Asp96, ya que éste no está expuesto directamente a la superficie citoplasmática de la proteína.

Si el Asp96 se reprotonase a partir de otro residuo, en la proteína nativa, podría suceder que en el mutante lo hiciese directamente desde el medio acuoso por estar más accesible debido a la mayor flexibilidad de las hélices E y F. Esto explicaría también el hecho de que el intermediario O apenas se acumule en el fotociclo de este mutante.

Por otro lado la reisomerización del retinal es mucho más lenta que en la proteína nativa, como puede verse en fotólisis de destello mediante el cambio de absorbancia de la forma BR₅₇₀, y en infrarrojo en el seguimiento de las bandas asociadas al retinal, en especial la banda a 1186 cm^{-1} cuya desaparición refleja el retorno del retinal a la configuración del estado basal de la BR.

El hecho de que la recuperación del estado basal del retinal esté tan desfavorecida en el mutante Loop5 sugiere un papel importante de la flexibilidad de las hélices en este proceso, siendo probable que la compactación de las hélices sea la que favorezca energéticamente la reacción de reisomerización del retinal de *13-cis*, *15-anti* a *todo-trans*.

Esta recuperación tan lenta del retinal en su conformación *todo-trans* en el mutante podría dar lugar a un intermediario O muy tardío en el fotociclo. De hecho tanto la cinética de la banda del cambio de absorción en el visible a 660 nm (figura 4.9),

como la cinética de la banda a 1506 cm^{-1} en el infrarrojo (figura 4.18), ambas asociadas al intermediario O, parecen mostrar un incremento hacia el final de la medición.

En resumen, el incremento de la longitud del bucle E-F produce una desincronización en el fotociclo e incluso una alteración en el transcurso de los intermediarios. La proteína parece tener una conformación más abierta hacia el lado citoplasmático, haciendo que el mecanismo que regula que el transporte sea unidireccional (mecanismo de *switch*) se altere, y disminuyendo por tanto la eficiencia del transporte protónico. Por el mismo motivo la recuperación del estado basal al final del fotociclo, que comprende la reisomerización del retinal y la recuperación de la posición inicial de las hélices, está también desfavorecida en el mutante respecto a la BR nativa, siendo probablemente el primer proceso dependiente del segundo.

4.2 Restricción de la movilidad de las hélices E-F: Estudio del mutante F153C/R175C

En el apartado 4.1 se han descrito los efectos de aumentar la flexibilidad del bucle E-F en el fotociclo de la BR y se ha podido ver como el aumento de la flexibilidad afecta de manera importante la cinética del fotociclo y la función de la proteína. Para descartar la posibilidad de que esos cambios se deban al hecho de haber aumentado el tamaño del bucle en sí, y no estén directamente relacionados con el cambio de flexibilidad en las hélices, hemos abordado el estudio desde el punto de vista contrario, es decir, restringiendo el movimiento de las hélices. Para ello se ha introducido una cisteína en cada hélice en posiciones cercanas en el espacio, basándonos en las estructuras cristalográficas, con el objetivo de poder formar un puente disulfuro interhélice que impida o dificulte el movimiento de las hélices (ver figura 4.20).

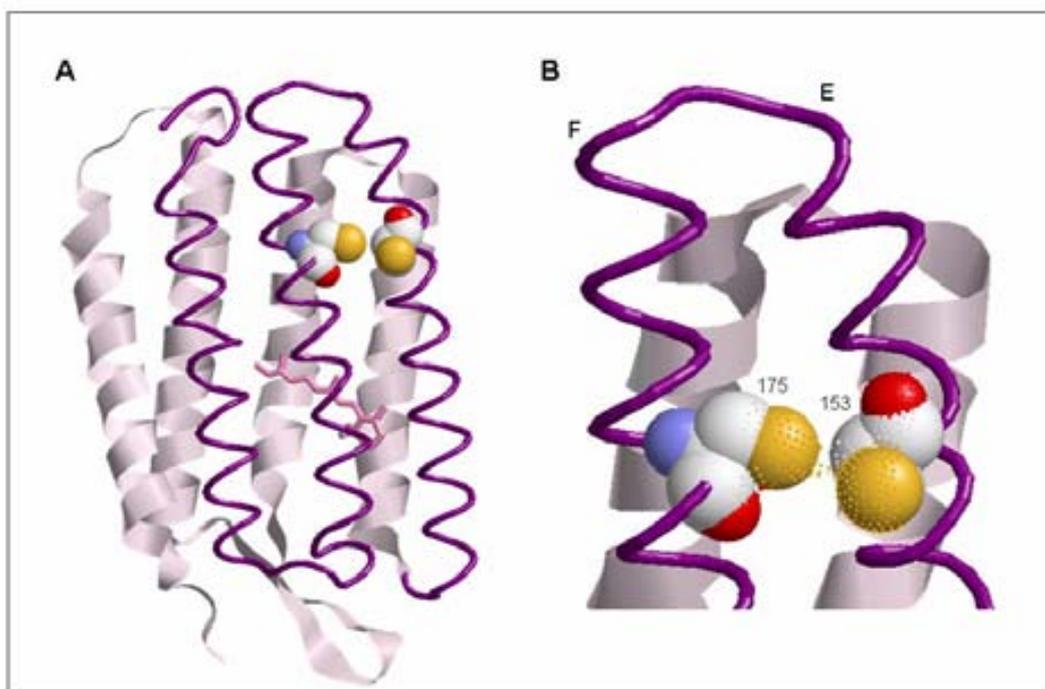


Figura 4.20.A. Estructura del mutante F153C/R175C de la bacteriorodopsina con las hélices E, F y G resaltadas en púrpura y los residuos mutados representados a nivel atómico y con su superficie de Van der Waals. **B.** Detalle de las interacciones de Van der Waals entre las cisteínas en el mutante. Representación obtenida a partir de una estructura publicada en el PDB con el código 1BRR.

Al mismo tiempo, basándonos en la bibliografía publicada hasta ese momento, se escogieron dos aminoácidos (Phe153 y Arg175) para los cuales no se había descrito ninguna implicación en la función de la proteína y por tanto era de esperar que no afectasen de manera importante al fotociclo. Por tanto, el mutante en su forma reducida donde las hélices son libres de moverse presentaría un fotociclo similar a la proteína nativa, en cambio, en su forma oxidada donde las hélices tienen más dificultad para desplazarse se esperarían cambios importantes.

Pero el estudio del doble mutante, tanto en su forma reducida como oxidada, ha mostrado tener diferencias importantes con la proteína nativa en cuanto a la cinética del fotociclo, revelando una implicación indirecta de uno de los residuos, o de ambos, en el transporte del protón y/o cambios estructurales durante el fotociclo.

Para elucidar los efectos de cada mutación por separado se han expresado los mutantes simples y se han estudiado mediante fotólisis de destello y FTIR estático.

4.2.1 Obtención del mutante F153C/R175C y de los mutantes simples F153C y R175C

El mutante F153C/R175C ha sido obtenido mediante dos rondas de PCR como se describe en el apartado 3.3.1, a partir de dos oligonucleótidos mutagénicos, cada uno con una de las mutaciones en su secuencia nucleotídica. Los mutantes simples se han obtenido a partir del doble mutante mediante digestión enzimática con SphI, que corta la secuencia del gen *bop* entre el codón de la Met163 y la Arg164, y con BamHI para aislar la mutación F153C y HindIII para aislar la mutación R175C.

Cada uno de los fragmentos aislados se ha ligado en el vector pUCBM20-*bop* digerido con la misma combinación de enzimas y aislado mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de su transformación en *E.coli* y de la extracción de DNA a partir de algunas colonias se han enviado a secuenciar para comprobar que los mutantes eran correctos, antes de transformar el DNA en la cepa L33 de *H.salinarum* para expresar la proteína.

4.2.2 Caracterización del estado de oxidación de las cisteínas

Las cisteínas libres poseen un grupo –SH que es muy reactivo, sobre todo a pH ligeramente alcalino (pH 7,5-8,2) y que puede reaccionar con algunos reactivos, como por ejemplo agentes alquilantes o fluoróforos, de manera muy específica. Uno de estos fluoróforos es el 2-(4'-maleimidilnilino)naftalen-6-ácido sulfónico o Mians, que

además tiene preferencia por entornos hidrofóbicos como es el caso de los segmentos transmembrana de las proteínas de membrana.

Esta sonda fluorescente es adecuada para caracterizar cisteínas que se encuentran en zonas muy plegadas de la proteína debido a su gran permeabilidad.

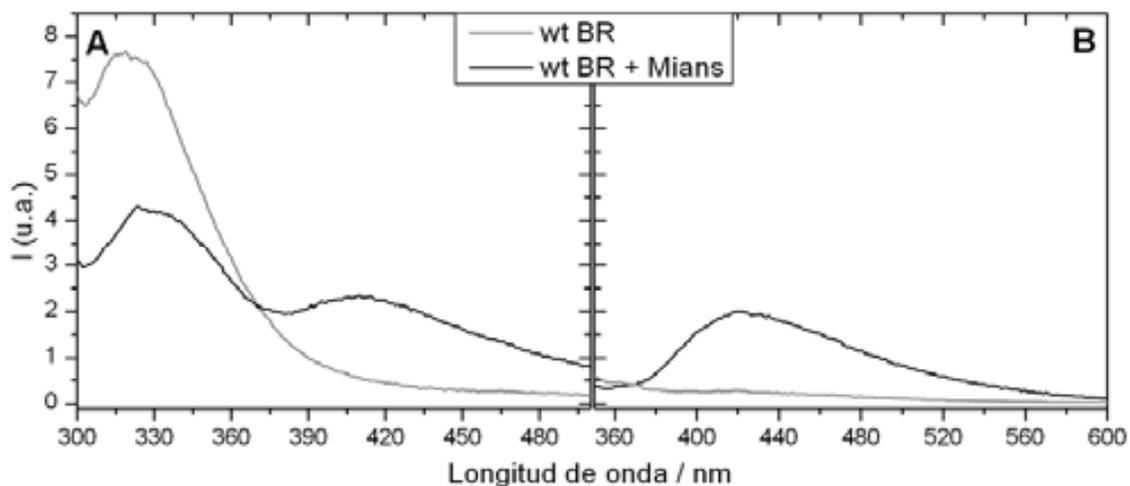


Figura 4.21. **A** Espectro de emisión de los triptófanos (excitación a 290 nm) para una muestra de BR nativa de concentración 2 μM en tampón fosfato 50 mM pH 7, antes y después de añadir la sonda fluorescente Mians a una concentración 24 μM . **B**. Espectro de emisión del Mians (excitación a 325 nm) en la misma muestra de proteína antes y después de añadir la sonda e incubarla durante más de 12 horas. Todas las medidas fueron hechas a 20° C. La BR nativa tiene una reacción inespecífica con el Mians.

En la figura 4.21 puede verse como el Mians presenta una reacción inespecífica cuando la reacción se lleva a cabo en una muestra de BR nativa, en donde no hay ninguna cisteína. Esta reacción inespecífica podría darse a nivel de los lípidos de la MP ya que la proteína no está solubilizada. Sin embargo, esta reacción inespecífica tiene aproximadamente el 20-25% de intensidad en el espectro de emisión del Mians que la que se obtiene en los mutantes con una cisteína (figura 4.22.D) y permite ver claramente si las cisteínas están reducidas u oxidadas en el caso de un mutante con dos cisteínas (figura 4.23). Por tanto, el Mians es una sonda adecuada para caracterizar la presencia de cisteínas en la BR mutada pese a que podría reaccionar débilmente con otros componentes de la MP.

Además, el estudio de las cinéticas de reacción del Mians con la proteína permite conocer la accesibilidad de cada residuo a la sonda, dando una idea de si ese residuo es más o menos accesible al disolvente.

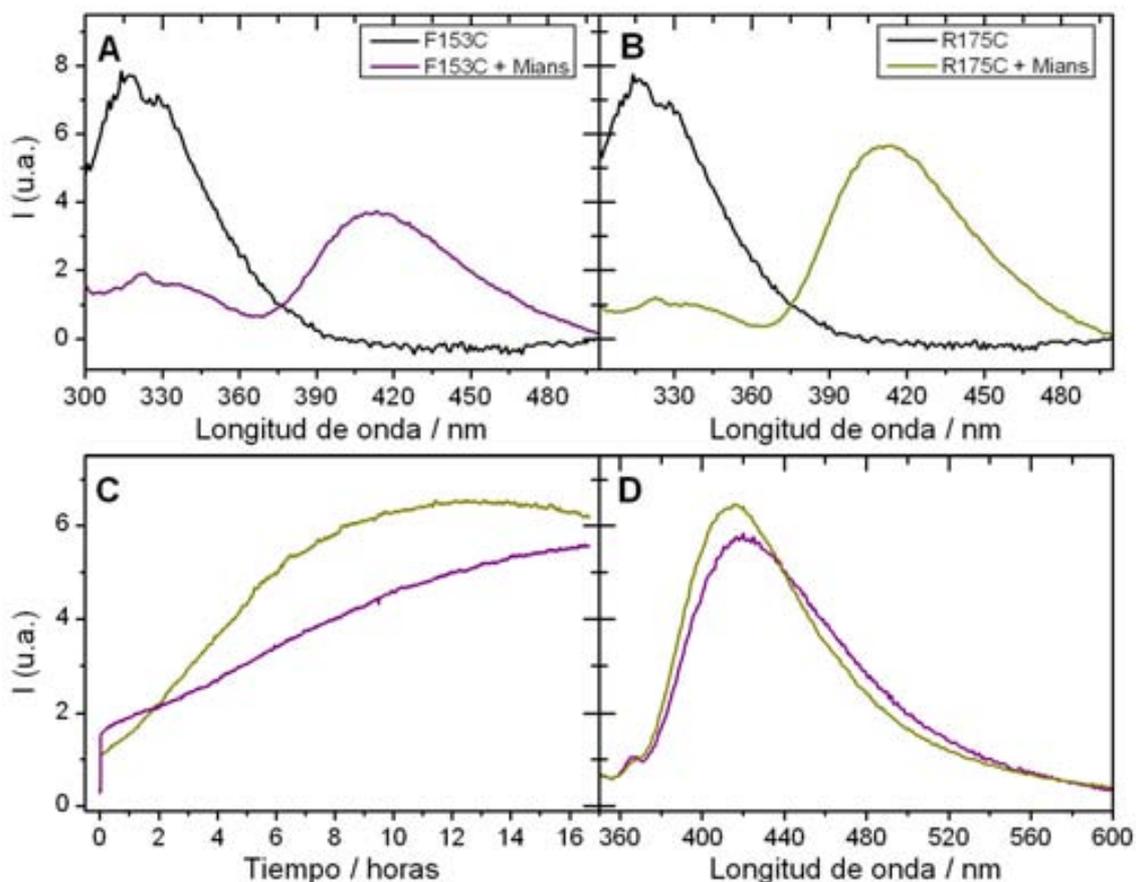


Figura 4.22. A. Espectro de emisión de los triptófanos del mutante de BR F153C antes y después de la reacción con la sonda fluorescente Mians ($\lambda_{exc}=290$ nm). B. Espectro de emisión de los triptófanos para una muestra del mutante R175C antes y después de añadir Mians. C. Cinética de reacción del Mians con los mutantes F153C y R175C determinada como el incremento en la emisión de la sonda a 430 nm respecto al tiempo de incubación ($\lambda_{exc}=325$ nm). D. Espectros de emisión del Mians que se ha unido a las cisteínas tras finalizar la reacción para ambos mutantes. Las muestras se han preparado en tampón fosfato 50 mM pH 7 a una concentración 2 μ M y se ha añadido Mians a una concentración final de 24 μ M. Las mediciones se han realizado a 20 °C.

En la figura 4.22 puede verse como el residuo F153C es menos accesible a la sonda que el residuo R175C debido a que su reacción es más lenta (gráfica C). Mientras que el mutante R175C necesita aproximadamente 10 horas para completar la reacción de marcaje con la sonda fluorescente, el mutante F153C necesita unas 16 horas. Estos resultados sugieren que la Phe153 se encuentra menos accesible que la Arg175 como cabría esperar por la estructura tridimensional de la BR.

En ambas muestras se produce una transferencia de energía entre los triptófanos que se encuentran próximos a estos residuos y el Mians, como puede verse por el espectro de emisión de los triptófanos (figura 4.22.A y B). En este caso la banda a 310-340 nm disminuye su intensidad y aparece una nueva banda, centrada a 420 nm

aproximadamente, correspondiente a la emisión del Mians excitado mediante la fluorescencia emitida por los triptófanos.

La señal de fluorescencia obtenida para los mutantes simples (figura 4.22.D) es la mitad de la señal obtenida para el mutante doble en estado reducido (figura 4.23.D), partiendo de la misma concentración de proteína en cada caso. Esto es también una prueba de la presencia de una cisteína en F153C y R175C, y dos cisteínas en F153C/R175C y, por tanto, de que la mutación o mutaciones han sido introducidas y expresadas correctamente.

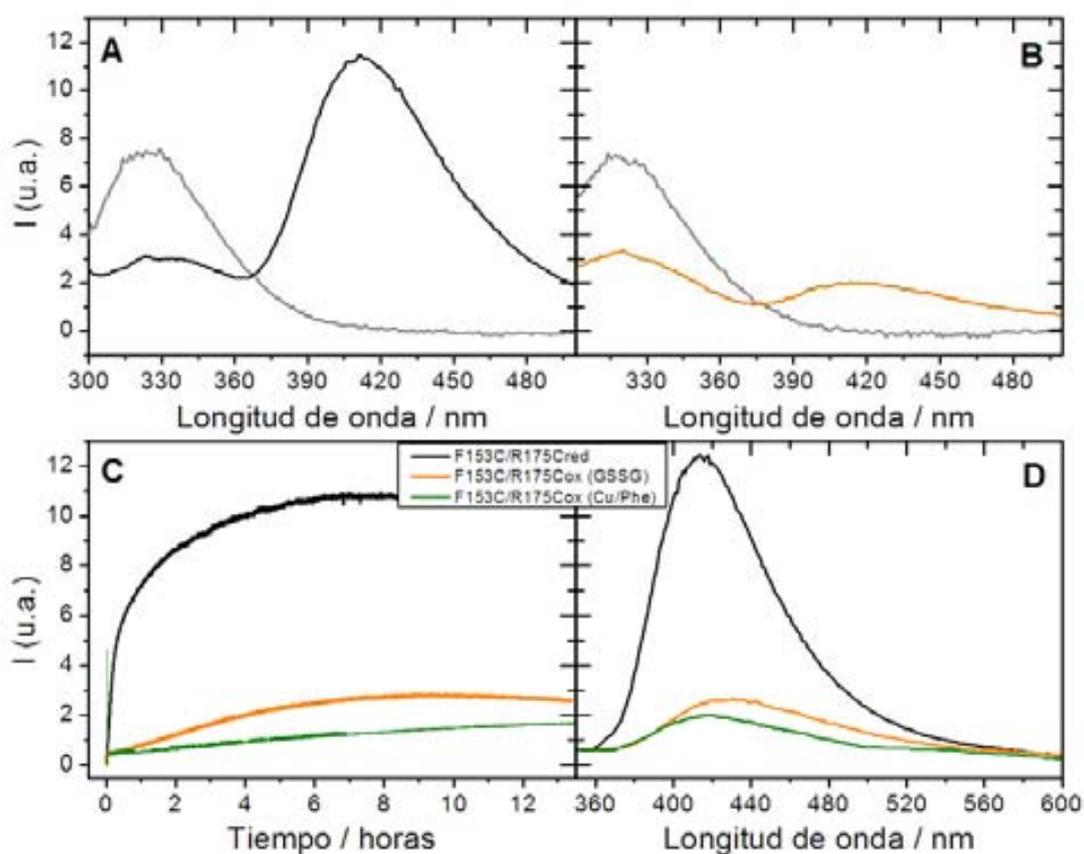


Figura 4.23. Espectros de emisión de triptófano de una muestra del mutante F153C/R175C de concentración $2 \mu\text{M}$ en tampón fosfato 50 mM pH 7 en estado reducido (A) y oxidado con GSSG (B) antes y después de añadir Mians $24 \mu\text{M}$. En gris se representan los espectros de emisión de triptófano de las muestras antes de añadir la sonda. C. Cinéticas de reacción de la sonda fluorescente Mians con muestras del mutante F153C/R175C reducido, oxidado con glutatión (GSSG) o con un complejo de cobre con fenantrolina (Cu/Phe). D. Espectros de emisión del Mians después de la incubación. Todas las medidas se han hecho a 20°C .

El marcaje del doble mutante con Mians ha permitido caracterizar el estado de oxidación de las cisteínas, e incluso comparar entre distintos oxidantes. Como puede verse en la figura 4.23, la oxidación con el complejo de Sulfato de Cobre y fenantrolina ($\text{Cu}(\text{Phe})_3$) es supuestamente un poco más efectiva en este caso que el glutatión oxidado (GSSG), aunque la diferencia no es muy relevante. La ventaja de usar GSSG es que resulta más fácil de eliminar del medio mediante lavados de la proteína que el $\text{Cu}(\text{Phe})_3$.

Este método ha permitido detectar la presencia de cisteínas en los mutantes de BR y conocer su estado de oxidación en el caso del doble mutante. Las cisteínas oxidadas en el mutante F153C/R175C no pueden reaccionar con el Mians ya que se encuentran formando un puente disulfuro interhélice. En este trabajo se ha denominado F153C/R175Cred al mutante con las cisteínas libres y F153C/R175Cox al mutante con las cisteínas oxidadas y que forma un puente disulfuro entre las hélices E y F. Este mutante nos permitirá conocer la influencia de la restricción de la flexibilidad de las hélices en la función de la BR ya que es de esperar que el movimiento de la hélice F esté dificultado o impedido.

4.2.3 Estudio funcional de los mutantes simples F153C y R175C

4.2.3.1 Estudio de intermediarios del fotociclo mediante fotólisis de destello

Los mutantes de BR que poseen cisteínas se purifican en presencia de DTT 1 mM cuando queremos mantenerlas reducidas, sobre todo cuando tenemos dos cisteínas que pueden formar un puente disulfuro entre sí (ver apartado 3.4.2). Y en todos los experimentos se mantiene esa concentración de DTT para asegurarse de que las cisteínas se mantienen en estado reducido durante toda la medición.

Con los mutantes simples se sigue el mismo procedimiento para poder comparar los resultados. De la misma forma, la proteína nativa se pone también en presencia de DTT 1 mM para determinar la influencia del agente reductor en los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas. Cuando se trabaja con los mutantes doble cisteína oxidados un stock de proteína nativa se trata también con el agente oxidante para comprobar si éste tiene alguna influencia en las distintas mediciones.

En el caso del estudio de los intermediarios M, O y del estado basal BR₅₇₀ mediante fotólisis de destello se ha visto que el DTT no influye las cinéticas ni la intensidad de las bandas de absorción de ninguna de las especies.

Los estudios de distintos intermediarios del fotociclo han revelado cambios importantes en el fotociclo de los mutantes respecto de la proteína nativa, sobre todo para el mutante F153C como puede verse en la figura 4.24.

El mutante F153C tiene una desaparición del intermediario M aproximadamente 2,7 veces más lenta que en la proteína nativa, a pesar de que su aparición no sufre muchos cambios exceptuando que, al ser más ancha la banda, el máximo de formación de M se encuentra un poco desplazado. La acumulación del intermediario O es mucho menor que en la proteína nativa, pese a que su cinética no parece estar muy afectada.

La cinética del estado BR₅₇₀ también está afectada siendo su acumulación menor que en la proteína nativa, pudiendo estar causada por una menor acumulación del intermediario N, y su recuperación más lenta.

Estos resultados sugieren una alteración en la reprotonación de la proteína que afecta sobre todo a la segunda parte del fotociclo (M→N/O→BR) en el mutante F153C. Por tanto, la Phe153 podría tener alguna implicación en el proceso de reprotonación o su mutación a cisteína podría interferir en este proceso.

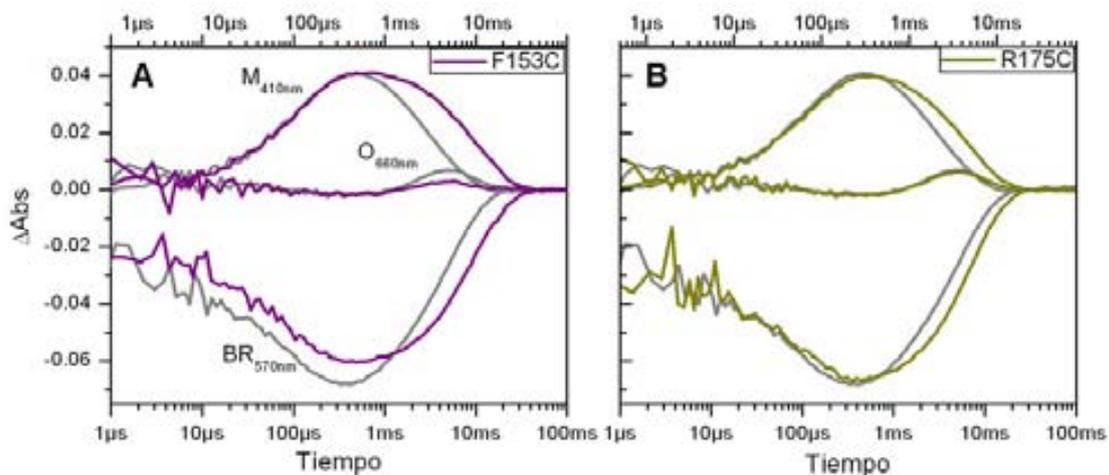


Figura 4.24. Estudio de los intermediarios M y O y del estado BR₅₇₀ en el mutante F153C (A) y en el mutante R175C (B) mediante la técnica de fotólisis de destello. Las líneas grises corresponden a una muestra de BR nativa. Las muestras han sido preparadas en tampón fosfato 3 mM pH 7 y 150 mM KCl a una concentración de proteína 15 μM. En el eje (x) inferior se muestra la escala de tiempo convencional para una muestra medida a 20° C, y en el eje superior se muestra la escala de tiempo de las muestras representadas cuya cinética estaba acelerada debido a un incremento de temperatura.

En el caso del mutante R175C la principal diferencia se da en el intermediario M (figura 4.24.B), donde la caída del intermediario es un poco más lenta que en la proteína nativa pero, sobre todo, tarda más en desaparecer que el intermediario O. Como consecuencia la recuperación del estado basal (BR₅₇₀) también se hace más lenta.

Sin embargo la acumulación y la cinética del intermediario O no están afectadas. Por tanto, los cambios en este mutante parecen estar localizados en la transición M→N/O, pero sin afectar de manera importante la primera parte del fotociclo, como se ve por la formación de M, ni la recuperación del estado basal, como puede verse por la curva del cambio de absorbancia a 570nm que, aunque su recuperación es más lenta que en la proteína nativa marcada por un intermediario M más lento, la diferencia en la intensidad y la cinética no es muy relevante.

Por tanto, en las dos mutaciones introducidas en la BR la que parece influenciar más el transcurso del fotociclo es la mutación F153C, siendo la mutación R175C un poco más conservadora aunque parece tener cierta influencia también en el transcurso de la segunda parte del fotociclo.

4.2.3.2 FTIR a baja temperatura

Para caracterizar mejor lo que sucede con los intermediarios M y N en los mutantes se hicieron varias medidas de FTIR a baja temperatura y distintos pH.

Los espectros de diferencia de FTIR entre muestras iluminadas y muestras sin iluminar (figura 4.25) muestran algunas diferencias importantes. En primer lugar no se puede atrapar N para el mutante F153C en las condiciones en las que se acumula en la proteína nativa (pH 10, 277 K). El caso contrario sucede con el mutante R175C donde N aparece a 243 K (-30° C) y en cambio a 277 K (4° C) su señal es menos intensa, es decir, N se acumula a temperatura más baja que en la proteína nativa, probablemente por ser más rápido. En cambio, el hecho de no poder atraparlo en el mutante F153C podría ser indicativo de que N tiene un rendimiento menor, como también parece indicar la disminución de la banda de absorción a 568 nm en las medidas de fotólisis de destello (ver figura 4.24).

A pH 7 y 243 K no se ven grandes diferencias en los espectros de los mutantes respecto del espectro de la proteína nativa. En el mutante F153C la banda a 1737 cm⁻¹ es menos intensa que en la BR nativa. Esta banda se cree que es debida a la vibración de grupos C=O causada por perturbaciones en el entorno de grupos Aspártico (Zscherp et al., 1997; Hessling et al., 1997), pudiendo ser el Asp96 uno de los residuos implicados.

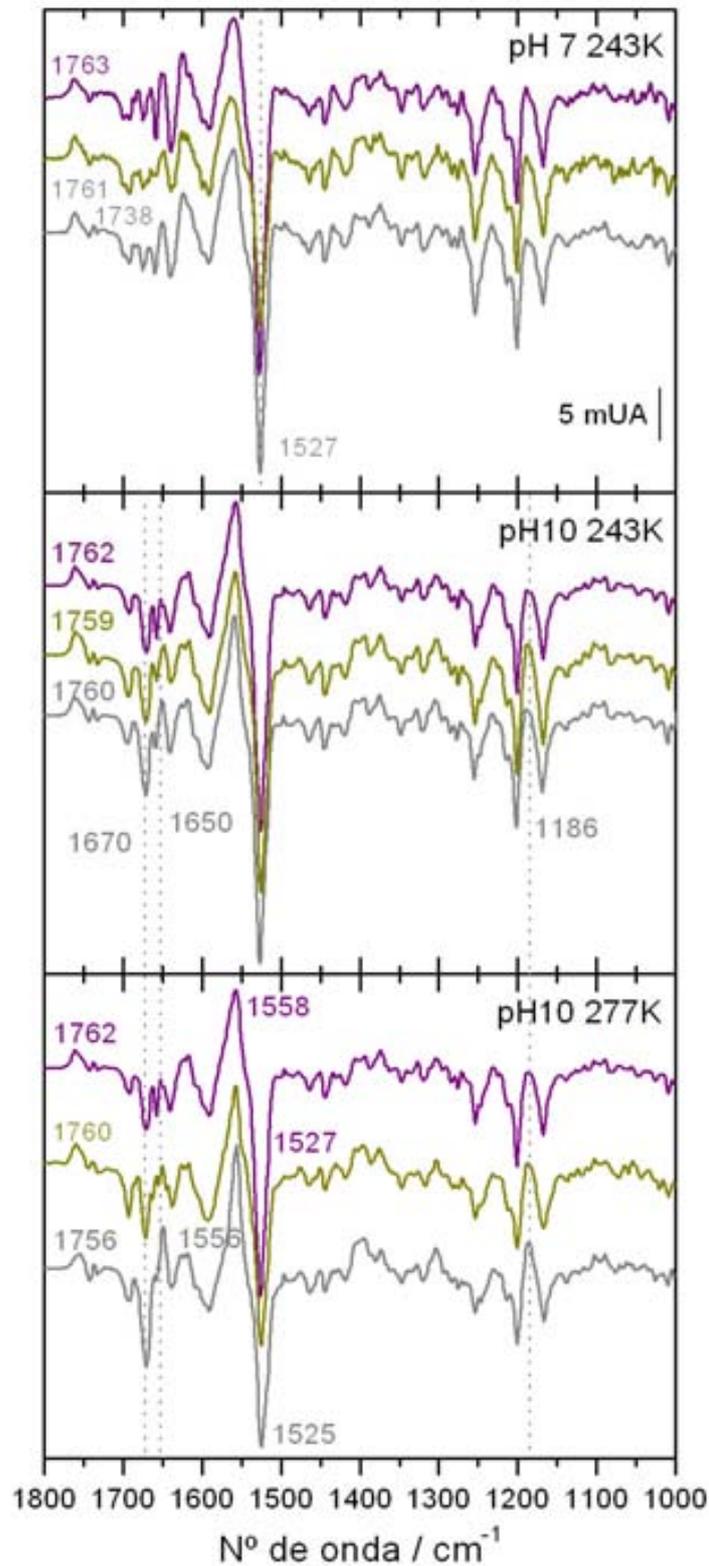


Figura 4.25. Espectros de diferencia de FTIR a baja temperatura de la bacteriorodopsina nativa (—) y de los mutantes F153C (—) y R175C (—) en 150 mM de KCl, 1 mM de DTT y tampón fosfato 3 mM para pH 7 y carbonato 3 mM para pH 10. Los espectros han sido normalizados para la banda del retinal a 1250 cm^{-1} .

Otra diferencia en el espectro del mutante F153C respecto de la proteína nativa es la banda negativa a 1527 cm^{-1} correspondiente a la amida II que es más intensa. Esta banda corresponde a la vibración de los enlaces N-H y C-N de los aminoácidos pero también se ha asignado a vibraciones de los grupos C=C del retinal por lo que es imposible separar ambas contribuciones.

En principio se podría esperar que debido a que la mutación no se encuentra en la cercanía del retinal no afectase al comportamiento de éste, y que el aumento de intensidad de esta banda es causada por los enlaces N-H de los residuos aminoacídicos de las hélices principalmente. Pero se han descrito muchas mutaciones en la proteína con efectos a larga distancia y no se puede descartar que el comportamiento del retinal esté afectado por la mutación F153C. Por otro lado, debido a que la banda de la BS a 1186 cm^{-1} parece ligeramente positiva podría deberse a que el espectro de este mutante tiene una pequeña contribución del intermediario L. En el mutante R175C también se observa que la esta banda está un poco por encima de la línea base, pero en este mutante parece más razonable pensar que se debe a la contribución del intermediario N que parece más rápido que en la proteína nativa como se ve en los otros espectros.

A pH 10 y 243 K el espectro de diferencia del mutante F153C se corresponde a un intermediario M mayoritariamente, donde no hay aparentemente contribución de N. En cambio, para la proteína nativa se ve una acumulación de los dos intermediarios donde M es el predominante, aunque ya empiezan a verse cambios en la bandas típicos de N, como por ejemplo las bandas a $1650/1670\text{ cm}^{-1}$ de la amida I. En el mutante R175C el intermediario predominante es N sin embargo, como puede verse por la banda del Asp85 desplazada a 1759 cm^{-1} y la banda a 1186 cm^{-1} correspondiente a la protonación de la BS además de las bandas en la zona de la amida I.

A pH 10 y 277 K la proteína nativa muestra un espectro de diferencia característico del intermediario N. En el caso del mutante F153C tenemos de nuevo un espectro típico de M, y en el caso del mutante R175C se observa la mezcla de los dos intermediarios y el espectro es similar al de la proteína nativa a 243 K. Las aparentes diferencias que se observan en las bandas de la amida I se deben a que el espectro era muy ruidoso y poco intenso y ha sido ampliado multiplicando del orden de 10 veces el original.

Todos estos resultados parecen indicar que las mutaciones tienen efectos antagonistas en el fotociclo. Mientras que la mutación F153C favorece la acumulación de M y parece dificultar la reprotonación de la proteína a través del camino N/O-BR, en

el mutante R175C, pese a que el intermediario M también tarda un poco más en decaer que en la proteína nativa el intermediario N parece más rápido ya que se necesita disminuir la temperatura de trabajo para poder favorecer su acumulación en los espectros de FTIR estático.

4.2.3.3 Bombeo de protones en presencia de piranina

Mediante el uso del indicador de pH piranina se puede determinar el transporte de protones de una muestra de BR fotoexcitada midiendo el cambio de absorbancia de la piranina a 460 nm (apartado 3.6.2.2). El problema de usar esta técnica es que la piranina es sensible a las condiciones del medio y el DTT, por ejemplo, influye en su capacidad de protonarse y desprotonarse.

En una muestra de BR nativa en 150 mM KCl y 1 mM de DTT el cambio de absorción máximo, que nos indica la efectividad del transporte, es aproximadamente la mitad del que se obtiene para la BR nativa en ausencia de DTT y la dispersión entre distintas medidas es más grande que en las muestras sin DTT (tabla 4-3 y 4-1).

Tabla 4-3. Eficiencia del transporte de protones de muestras 15 μM de BR nativa y de los mutantes F153C y R175C en 150 mM KCl y 1 mM DTT a pH $\sim 7,2$ determinado como el cambio de absorbancia de una muestra de piranina 50 μM a 460 nm.

Transporte (tasa_{max} en pyr)	
wt BR	100 \pm 20
F153C	99 \pm 21
R175C	96 \pm 11

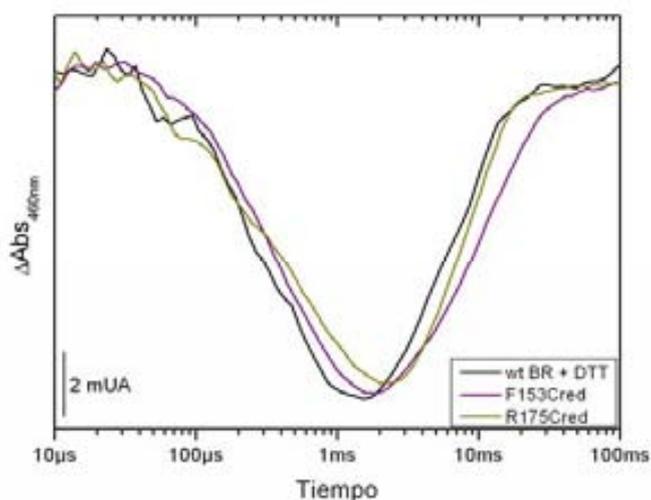


Figura 4.26. Cinéticas de desprotonación y reprotonación de una muestra 15 μM de BR nativa, y de los mutantes F153C y R175C en 150 mM KCl a pH $\sim 7,2$ y DTT 1mM, fotoexcitadas en presencia de piranina 50 μM . El término red en los mutantes indica que la cisteína está reducida.

Sin embargo, pese a no ser un método tan fiable en estas condiciones, nos proporciona una idea de lo que sucede con el transporte en los mutantes y, sobre todo, con la cinética de expulsión del protón y reprotonación de la proteína.

En la Figura 4.26 podemos comprobar cómo la expulsión del protón está más retardada en ambos mutantes, siendo el R175C el más lento pese a tener un intermediario M más rápido que el mutante F153C, aunque la diferencia no es muy significativa. Pero el mutante F153C tiene una cinética de reprotonación más lenta que la proteína nativa, del orden de 2 ms.

Por otro lado, la eficiencia del transporte no parece estar muy afectada y se aproxima bastante a la eficiencia de la proteína nativa en las mismas condiciones.

Por tanto parece que las mutaciones F153C y R175C en la BR no producen cambios muy relevantes en la eficiencia de bombeo de protones pese a mostrar un fotociclo ligeramente alterado.

4.2.4 Estudio del doble mutante F153C/R175C

4.2.4.1 Adaptación luz-oscuridad

Para comprobar si los reactivos que se usan para oxidar y mantener reducidas las cisteínas influyen en el proceso de adaptación luz-oscuridad se han hecho varias mediciones de muestras de proteína nativa y del mutante en DTT y tratados con GSSG en agua.

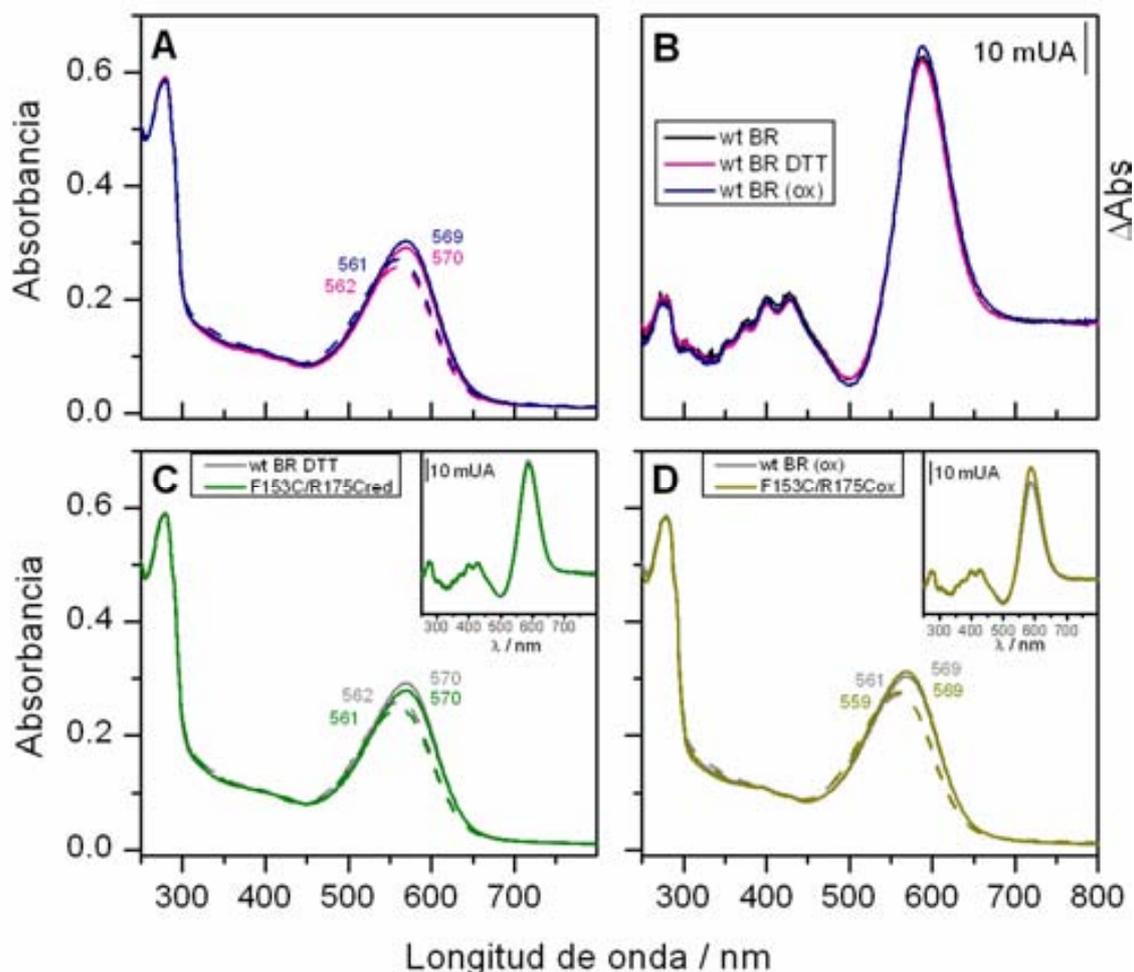


Figura 4.27. **A.** Espectros de absorción de una muestra de bacteriorodopsina en agua, a pH neutro y en presencia de DTT 1 mM o tratada con el oxidante GSSG, adaptadas a la oscuridad (líneas discontinuas) y tras ser iluminadas (líneas continuas; para identificación de las muestras ver leyenda figura B). **B.** Espectro de diferencia de la forma iluminada (LA) menos la forma adaptada a la oscuridad (DA) de la proteína nativa en agua y de las muestras anteriores. **C.** Espectro de absorción de una muestra del mutante F153C/R175C reducido y de la BR nativa en presencia de DTT en su forma DA (líneas discontinuas) y LA (líneas continuas). En la gráfica insertada en la esquina superior derecha se puede ver los correspondientes espectros de diferencia para ambas muestras. **D.** Espectros de absorción de una muestra DA y LA del mutante F153C/R175C oxidado y de la BR nativa tratada con GSSG y sus correspondientes espectros de diferencia (gráfica insertada). Las muestras se han mantenido a oscuras y a 4 °C durante dos días para su adaptación a la oscuridad.

El mutante F153C/R175C con las cisteínas libres se denominará a partir de ahora F153C/R175Cred, y el mutante con las cisteínas oxidadas formando un puente disulfuro se denominará F153C/R175Cox. Para la proteína nativa se usarán los términos wt BR DTT para indicar que la proteína está en presencia de DTT 1 mM al igual que el mutante reducido, y wt BR (ox) cuando se refiera a la proteína nativa sometida al mismo tratamiento de oxidación con GSSG que los mutantes doble cisteína.

Como puede observarse en la figura 4.27.A el máximo de absorción de la BR nativa sufre un pequeño desplazamiento hacia el rojo en la banda de absorción del pigmento. El desplazamiento del máximo de absorción de la forma adaptada a la luz respecto a la forma adaptada a la oscuridad es de 8 nm frente a los 10 nm de la proteína en agua. Pero estos cambios no son significativos y caen en el margen de variabilidad que puede observarse al determinar el máximo de absorción de cualquier muestra.

En el caso del mutante también se puede observar que este proceso no sufre una importante alteración y los máximos de absorción de ambas formas, DA y LA, se parecen a los valores de la proteína nativa.

Lo que sí supone una diferencia respecto a la proteína nativa es el aparente aumento del coeficiente de extinción molar (ϵ) cuando la proteína ha sido tratada con el oxidante GSSG, sobre todo en las muestras adaptadas a la luz (figura 4.27, espectros de diferencia). Esta diferencia es más patente en el mutante F153C/R175C que en la proteína nativa y por tanto podría estar relacionada con un posible cambio estructural debido a la formación del puente disulfuro. Pero cabe también la posibilidad de que sea debido a alguna interacción inespecífica del reactivo con la proteína y el hecho de que sea mayor en el mutante podría deberse a una mayor concentración de restos de GSSG en la muestra tras los lavados.

En el mutante reducido el coeficiente de extinción molar es aproximadamente un 3% inferior al de la proteína nativa.

Por tanto, el proceso de adaptación luz-oscuridad no está influenciado por el uso de estos agentes (DTT y GSSG) de manera importante. Solamente el GSSG parece contribuir a un ligero aumento en la banda de absorción del retinal en la proteína, pero no está claro que ese cambio sea inducido por un cambio estructural al formarse el puente disulfuro en el mutante F153C/R175C ya que también se ve en la proteína nativa aunque en menor proporción. Este aumento en la banda de absorción del pigmento podría deberse a alguna interacción inespecífica del reactivo con la proteína, lo que

indicaría en todo caso una gran accesibilidad del agente oxidante al interior de la proteína.

4.2.4.2 Estabilidad térmica

Para comprobar cómo influye la doble mutación en la estabilidad de la proteína, así como la formación de un puente disulfuro en una proteína que no posee ninguno, se ha estudiado la desnaturalización térmica mediante espectroscopia UV-Vis y mediante DSC de ambas formas del mutante, reducido y oxidado.

a) T_m de desnaturalización determinada mediante espectroscopia UV-Vis

Como puede verse en la figura 4.28 la BR nativa no sufre apenas un cambio de T_m de liberación del retinal de la proteína por desnaturalización mediante calor cuando está en presencia de DTT. Sin embargo, el tratamiento con el oxidante parece afectar su estabilidad térmica siendo esta aproximadamente 2,5 °C inferior. Esta aparente disminución de la estabilidad térmica cuando la proteína es tratada con GSSG parece estar más relacionada con la presencia de restos del agente oxidante tras los lavados de la proteína que con el tratamiento en sí mismo ya que una medida independiente de una preparación posterior, donde la presencia de GSSG pudo ser determinada mediante espectroscopia UV tanto en el mutante como en la proteína nativa, la estabilidad disminuyó en ambos casos en aproximadamente 10 °C. Pero lo que siempre se repite es una ligera disminución de la estabilidad del mutante respecto de la BR nativa, que se da también en el mutante reducido (F153C/R175Cred).

Como ya se mencionó en el apartado 3.4.2 el GSSG es un tripéptido. Este pequeño péptido podría interactuar con la BR desestabilizándola mediante interacciones electrostáticas, bien a nivel de los lípidos de la MP, bien a nivel de la proteína o influyendo en ambas moléculas.

En cambio el DTT es una molécula pequeña que no parece interactuar con la proteína, al menos a nivel de su estabilidad.

Por tanto el mutante tiene ligeramente disminuida su estabilidad térmica respecto a la proteína nativa, con una T_m de hidrólisis del retinal del orden de 6 °C inferior a la T_m de la BR nativa.

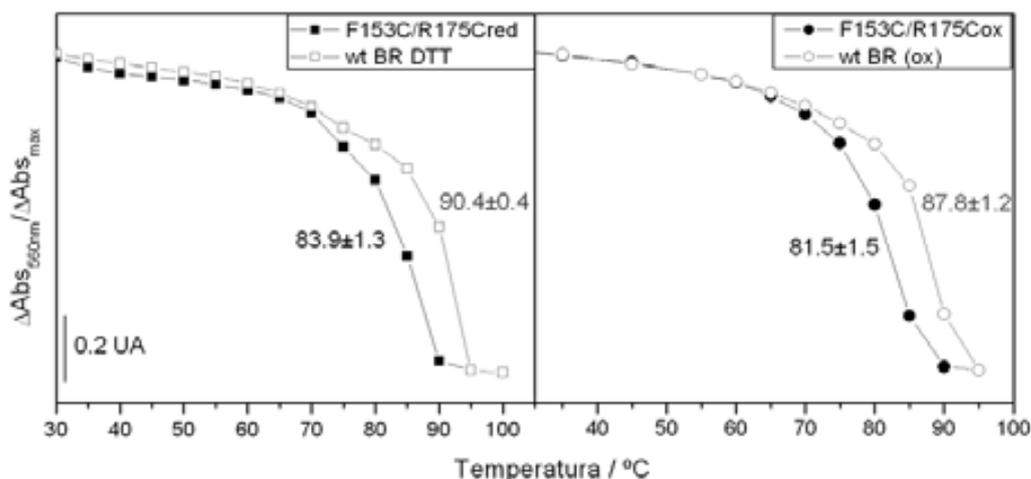


Figura 4.28. Desnaturalización térmica del mutante F153C/R175C determinada mediante el cambio de absorción en el visible del pigmento al incrementar la temperatura. En la primera gráfica se representa el cambio de absorción para el mutante con las cisteínas reducidas (en presencia de DTT 1mM) y en la segunda gráfica se representa el resultado para el mutante oxidado. En ambos casos la proteína nativa ha sido tratada con los mismos reactivos para determinar los cambios que producen estos agentes en la estabilidad de la BR. Todas las muestras han sido preparadas a una concentración de 0,4 mg/ml en agua, y el pH se ajustó a 7 mediante el uso de una disolución de NaOH 0,1 M.

El mutante oxidado tiene aproximadamente la misma estabilidad que el mutante reducido, es decir, la formación de un puente disulfuro entre las hélice E y F en el lado citoplasmático y cerca del bucle que las une no aumenta la estabilidad térmica de la proteína. Por otro lado la aparente desestabilización que se da en el mutante F153C/R175C oxidado respecto del mutante reducido, como una disminución de la temperatura de desnaturalización de 2-3 °C, parece en principio atribuible a la presencia de GSSG en el medio más que a la formación del puente disulfuro. Por este mismo motivo se ve también esa aparente disminución en la estabilidad de la BR nativa cuando ha sido tratada con GSSG.

b) T_m determinada mediante DSC

Como ya se mencionó anteriormente la calorimetría diferencial de barrido permite el estudio de la desnaturalización de la proteína desde un punto de vista más global, es decir, teniendo en cuenta incluso la pérdida de la estructura paracristalina de la MP reflejada en la pre-transición.

Para comprobar la influencia de los tratamientos redox aplicados a la proteína primero se estudió la proteína nativa en las diferentes condiciones.

Existen diversos trabajos que describen la posibilidad de realizar las medidas de DSC en presencia de DTT a muy bajas concentraciones para conservar las proteínas reducidas. Se hizo una prueba con la BR nativa en presencia de DTT 0,2 mM y, como puede verse en la figura 4.29, el DTT afecta de manera muy importante al estudio del proceso de desnaturalización de la BR mediante esta técnica. La capacidad calorífica es mucho menor y las banda principal es más ancha, indicativo de una menor cooperatividad en el proceso. Además la banda de la pre-transición aparece a una temperatura aproximadamente 13 °C inferior a la posición habitual en la proteína sin tratar.

En cambio, el tratamiento con el agente oxidante GSSG no tiene tanta influencia en este proceso. El cambio más significativo es una disminución en la temperatura de la pre-transición, que podría ser debido a la posible interacción del oxidante con la proteína que ya se mencionó en el apartado anterior. Como la banda de la pre-transición se debe al proceso de descompactación y pérdida de la disposición hexagonal de la MP, las moléculas de GSSG podrían influenciar este proceso haciendo que la proteína sea menos compacta mediante interacciones con los residuos aminoacídicos y/o lipídicos de la MP.

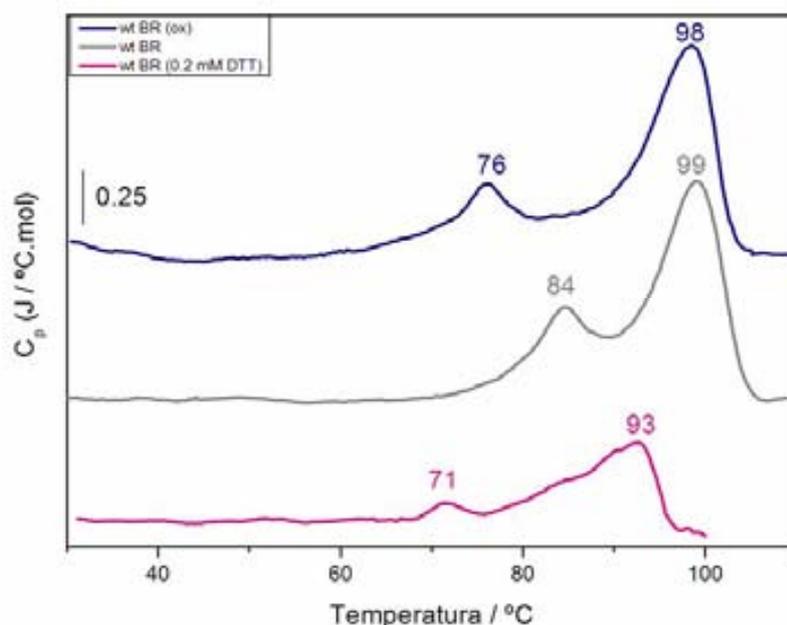


Figura 4.29. Termogramas de desnaturalización de la bacteriorodopsina nativa en agua, tratada con 1 mM de DTT o con el agente oxidante GSSG. Las muestras han sido preparadas a una concentración de 2 mg/ml y dializadas durante una noche en agua a pH 6,5-7. La muestra que contenía DTT 1 mM se dializó en una disolución de DTT 0,2 mM a pH neutro.

El problema de eliminar el DTT mediante diálisis es la probable oxidación de las cisteínas en el mutante.

Cabe la posibilidad de utilizar otros reductores como el β -mercaptoetanol. El problema de este reactivo es su elevada volatilidad y su rápida desactivación.

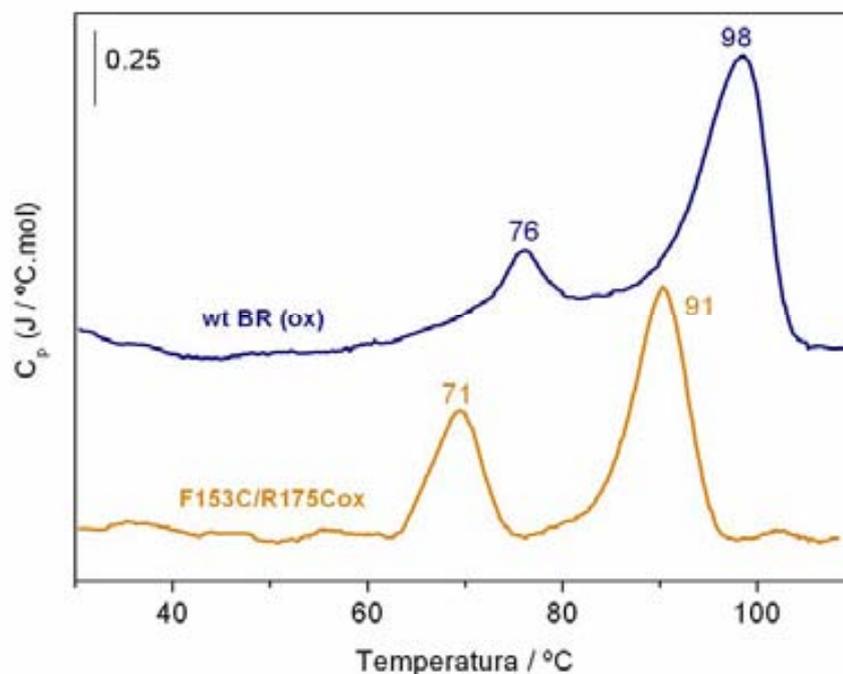


Figura 4.30. Termograma de una muestra de concentración 2 mg/ml del mutante F153C/R175C oxidado con GSSG y de la proteína nativa sometida al mismo tratamiento obtenido mediante DSC. Las muestras han sido dializadas en agua a pH neutro durante más de 12 horas.

En la figura 4.30 puede observarse el termograma de DSC del mutante F153C/R175C oxidado y de la proteína nativa sometida al mismo tratamiento. En el mutante se produce un desplazamiento de las dos bandas, pre-transición y transición principal, a una temperatura inferior mostrando una pérdida de estabilidad en la estructura de la BR debida a la mutación de los residuos Phe153 y Arg175. Como ya se vio en los experimentos de desnaturalización mediante espectroscopia UV-visible del mutante reducido, el cambio de esos residuos a cisteína causa una disminución en la estabilidad térmica de 6 °C aproximadamente, respecto a la hidrólisis del retinal.

Sin embargo la pre-transición es mucho más intensa mostrando un proceso de desordenamiento de la MP más cooperativo en el mutante que en la proteína nativa, y pudiendo deberse a una mayor compactación de las moléculas de proteína inducida por la presencia del puente disulfuro entre las hélices E y F. Por otro lado, la presencia de este puente disulfuro no produce un aumento de la estabilidad de la proteína en sí como

se refleja en el desplazamiento de la transición principal a una temperatura inferior en el mutante respecto de la proteína nativa y en una menor intensidad de esta banda. Pero ambas bandas están más definidas en el mutante indicando por tanto una mayor cooperatividad en todo el proceso de desnaturalización de la MP.

4.2.4.3 Estudio de intermediarios del fotociclo

Mediante la técnica de fotólisis de destello se han estudiado las cinéticas y la acumulación de algunos intermediarios del fotociclo para el mutante F153C/R175C en su estado oxidado y reducido.

Para comprobar la posible influencia del reductor DTT y del tratamiento con el oxidante GSSG en la cinética del fotociclo se ha hecho primero una prueba con la proteína nativa.

Como puede observarse en la figura 4.31 el uso de estos reactivos no altera en absoluto el fotociclo, por tanto, los cambios que se observan en el mutante son debidos únicamente a las mutaciones introducidas en la proteína, y a la presencia del puente disulfuro en el caso del mutante oxidado.

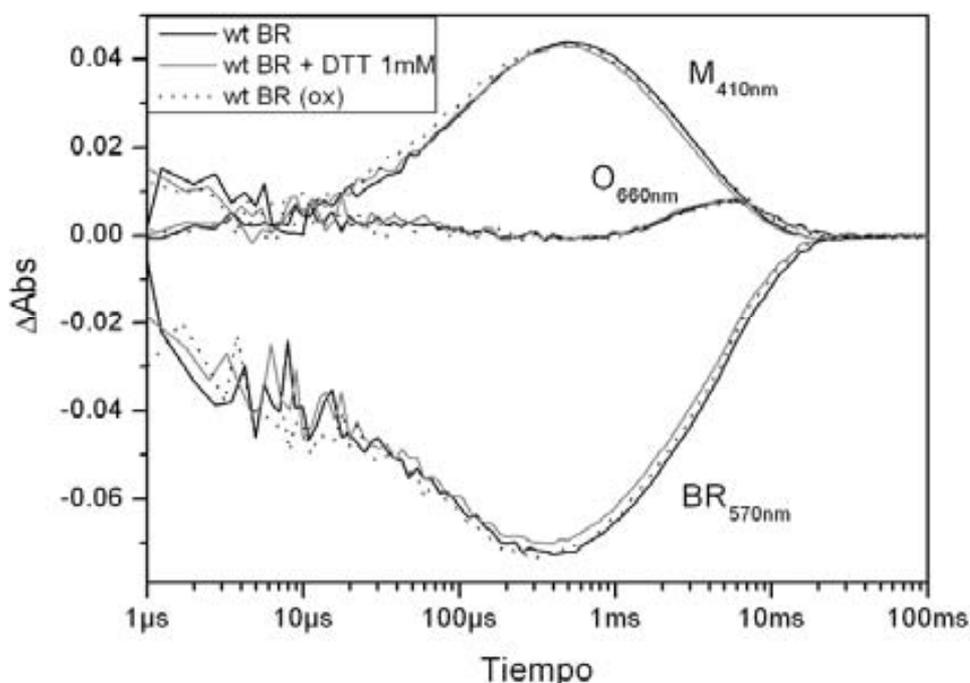


Figura 4.31. Cambio transitorio de absorbancia en el visible inducido por un pulso de luz láser a tres longitudes de onda (410, 660 y 570 nm) de una muestra de proteína nativa 15 μM en tres condiciones distintas: sin añadir nada, añadiendo DTT 1 mM y tratada con GSSG. Las muestras se prepararon en tampón fosfato 3 mM y 150 mM KCl a pH 7.

En el caso del mutante F153C/R175C sí que pueden observarse cambios importantes en la cinética del fotociclo, siendo más relevantes los cambios que se observan para el estado reducido de la proteína que para su estado oxidado (figura 4.32).

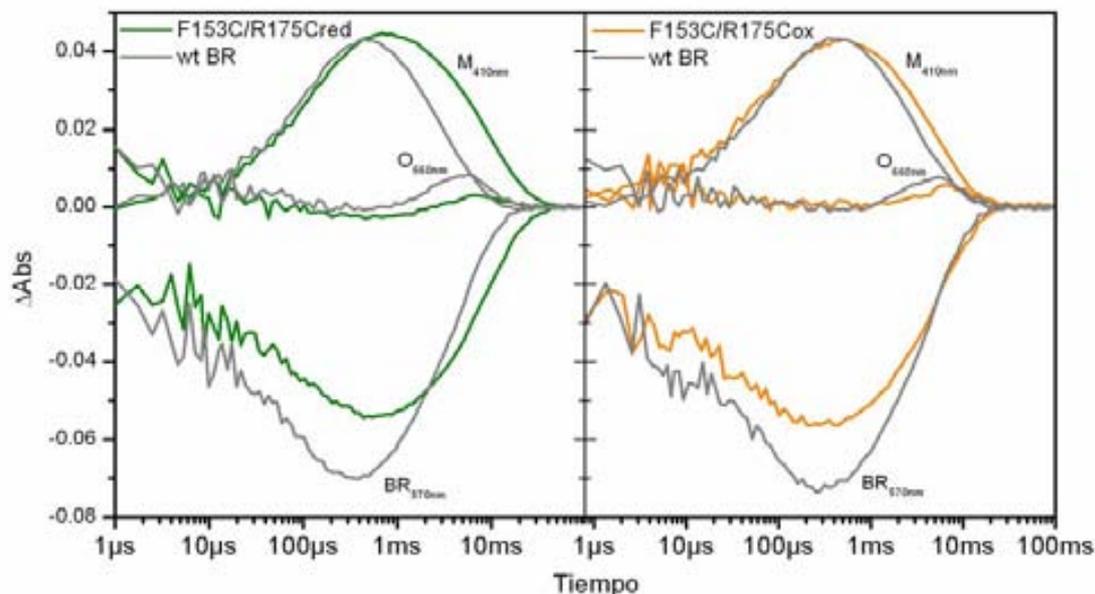


Figura 4.32. Estudio de los intermediarios M, O y del estado BR₅₇₀ del mutante F153C/R175C reducido y oxidado y de las correspondientes muestras de BR nativa en las mismas condiciones mediante fotólisis de destello. La concentración de las muestras es 15 μ M en tampón fosfato 3 mM, pH 7 y 150 mM KCl.

El mutante con las cisteínas libres (F153C/R175Cred) presenta un intermediario M más lento que la proteína nativa, estando su máximo de formación desplazado 1,4 veces respecto al de la proteína nativa y siendo su desaparición aproximadamente 2,5 veces más lenta. El intermediario O tiene un rendimiento más bajo que en la proteína nativa y es también algo más lento. El estado basal del fotociclo (BR₅₇₀) tiene también una recuperación más lenta debido a que la desaparición de M es también más lenta, y la menor relación entre su cambio de absorbancia máximo y el de M sugiere una menor acumulación del intermediario N, siendo probable que el fotociclo esté alterado y parte de las moléculas vayan de M a BR₅₇₀ sin pasar por N/O.

Las cinéticas de M, O y BR₅₇₀ del mutante F153C/R175C reducido se parecen mucho a las obtenidas para el mutante simple F153C (figura 4.24), como cabría esperar al comparar los cambios inducidos por las mutaciones simples con los cambios inducidos por la doble mutación ya que el mutante R175C no es responsable de alteraciones significativas en las cinéticas de estos intermediarios, exceptuando la cinética de desaparición de M.

Sorprendentemente al oxidar las cisteínas para formar un puente disulfuro (F153C/R175Cox) se revierten en buena medida estos cambios y las cinéticas se parecen más a las de la proteína nativa (figura 4.32). La diferencia más importante en este caso es una menor acumulación de N/O en el mutante respecto de la proteína nativa, y una caída de M más lenta también aunque la diferencia respecto a la proteína nativa se reduce a 1,4 veces respecto a las 2,5 veces del mutante reducido.

Por tanto, la oxidación de las cisteínas en el mutante F153C/R175C revierte parcialmente los cambios en el fotociclo producidos por ambas mutaciones. Aún así el mutante oxidado sigue presentando pequeñas alteraciones en el camino de reprotonación de la proteína.

Los cambios de comportamiento entre el mutante reducido y el oxidado parecen estar más relacionados con la desaparición del residuo polar -SH en la posición F153C que con la formación de un puente disulfuro entre las hélices E y F.

4.2.4.4 Espectros de FTIR a baja temperatura

Para poder estudiar los cambios que se producen en el entorno de la proteína durante los intermediarios M y N se ha utilizado la técnica de FTIR a baja temperatura para poder atrapar estos intermediarios. Mediante esta técnica se puede hacer una mayor aproximación a cambios estructurales y residuos afectados durante la formación de estos intermediarios en el mutante, tanto en el caso de las cisteínas libres en donde se puede ver el efecto de cambiar dos residuos de la BR por cisteínas, como en el caso del mutante oxidado, donde la proteína tiene un puente disulfuro que no está presente en la proteína nativa.

Como muestra control se ha usado en cada caso la proteína nativa en las mismas condiciones que el mutante, es decir en presencia de DTT 1mM o tratada con GSSG para ver la posible interacción de estos reactivos en la acumulación de estos intermediarios.

El uso de DTT 1mM en las muestras no altera los espectros de diferencia obtenidos para la proteína nativa. Sin embargo, el oxidante GSSG favorece la acumulación de N como puede verse en los espectros de diferencia a pH 10 y 243 K (figura 4.33) en donde el intermediario mayoritario es M en la proteína nativa pero con algunos cambios típicos de N y en el caso de la muestra tratada con GSSG el intermediario que se ve mayoritariamente es N. En la muestra con DTT el espectro es idéntico al que se obtiene en la muestra nativa sin tratar.

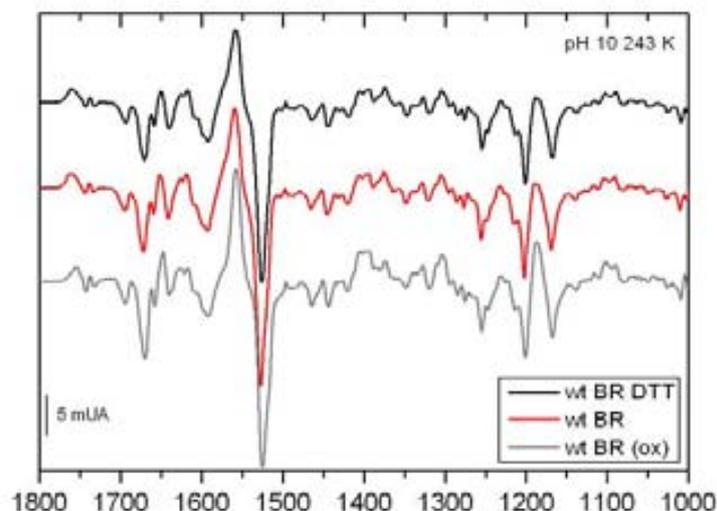


Figura 4.33. Espectros de diferencia de FTIR para la proteína nativa con DTT 1 mM, sin tratar y tratada con GSSG. Las muestras han sido preparadas en tampón carbonato 3 mM pH 10 y 150 mM KCl. Los espectros fueron adquiridos a 243 K.

Asimismo el oxidante parece intensificar los cambios que se producen en las bandas de la amida I durante los intermediarios M y N como puede observarse en los espectros adquiridos a pH 7, 243 K y pH 10, 277 K respectivamente, aunque en el primer caso ese cambio más acentuado de las bandas a 1670 y 1650 cm^{-1} podría deberse más a un mayor porcentaje de L o N en la muestra como indica también la banda correspondiente a la BS situada a 1186 cm^{-1} , que no está por debajo de la línea base como corresponde al intermediario M, en donde la BS no está protonada.

En ambos casos las bandas correspondientes a la amida II, sobre todo la banda positiva situada a 1560 cm^{-1} , son más intensas en la proteína tratada con GSSG respecto a la proteína nativa o en presencia de DTT. Estas bandas corresponden sobre todo a los enlaces N-H de la proteína y a vibraciones del enlace C=C del cromóforo. En este caso parece estar más relacionado con esa mezcla de M con L o N. El problema de distinguir entre estos dos intermediarios es que las bandas características que se detectan cuando están mezclados con M se parecen mucho, a pesar de que los espectros de sus formas puras se pueden distinguir perfectamente. Esto se debe a que en ambos casos la BS está protonada y se producen cambios en la amida I y amida II debido a cambios en la disposición de algunas hélices. Además, el cambio más importante que puede verse corresponde a la banda del Asp85 que en L está desprotonado y en N es positiva debido a que se encuentra protonado. Pero esta banda está dominada por M, que es sin embargo el intermediario mayoritario que se acumula en estas condiciones. En cualquier caso la forma de los espectros no cambia de manera importante y el uso de GSSG no parece

afectar al fotociclo en general como puede verse en las cinéticas de distintos intermediarios del fotociclo estudiadas mediante fotólisis de destello (apartado 4.2.4.3). Lo que parece indicar los experimentos de FTIR a baja temperatura es que la acumulación de N está favorecida por la presencia de restos de GSSG a pH básico y a pH neutro es probable que también haya un importante porcentaje de N o L en los espectros de diferencia. Es como si este reactivo favoreciese la congelación del fotociclo en este intermediario debido a que establece interacciones dentro de la proteína que probablemente disminuyen la energía de formación de N o N/L y, al mismo tiempo acentuase alguno de los cambios estructurales que tienen lugar durante estos intermediarios, pero sin alterar el transcurso del fotociclo como demuestran las medidas de fotólisis de destello.

Como puede observarse en la figura 4.34 el mutante reducido también acumula M a pH 7 y 243 K al igual que la proteína nativa en presencia de DTT 1 mM, y su espectro no revela diferencias respecto al espectro de la BR nativa.

En cambio N es más difícil de atrapar a pH básico, tanto a 277 K como a 243 K se ve una mezcla de M y N donde predomina el primero. Esto indica que N está menos favorecido en este mutante como también parecía indicar la disminución de la intensidad de la banda BR₅₇₀ en fotólisis de destello (figura 4.32).

El mutante F153C/R175C oxidado se comporta sin embargo de forma más parecida a la proteína nativa. Las diferencias más importantes se encuentran en una mayor acumulación de L o N a pH 7 y 243 K, que ya se veía en la BR nativa tratada con GSSG y, sobre todo un intermediario N en donde la intensidad de las bandas de la amida I y la banda de reprotonación de la BS son menores que en la proteína nativa.

Esta reducción de la intensidad de las bandas a 1650 y 1750 cm⁻¹ en el mutante oxidado podría estar relacionado con esa disminución en la flexibilidad de las hélices E y F.

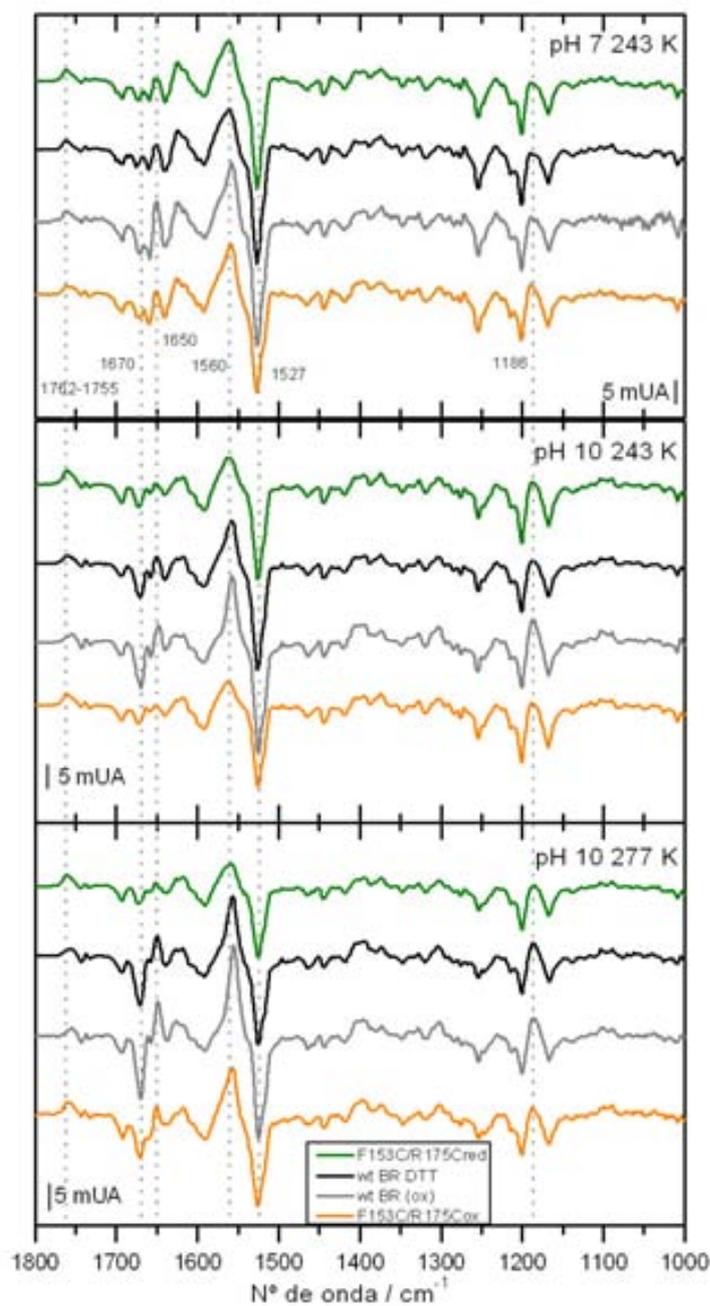


Figura 4.34. Espectros de diferencia de FTIR del mutante F153C/R175C reducido y oxidado y de las correspondientes muestras control de BR nativa. Los espectros han sido adquiridos en distintas condiciones de pH y de temperatura permitiendo así la acumulación de los intermediarios M y N principalmente. Las muestras han sido preparadas a partir de 0,4 mg de proteína en tampón fosfato 3 mM pH 7, o carbonato 3 mM pH 10, con 150 mM KCl.

4.2.4.5 Bombeo de protones

a) Mediante el uso de piranina

Para comprobar si la cinética y la eficiencia del transporte estaba alterada debido a la doble mutación F153C/R175C en la BR y a la formación del puente disulfuro, en el caso del mutante oxidado, se han hecho estudios de desprotonación y protonación en muestras fotoexcitadas en presencia del indicador de pH piranina.

Tanto el DTT (ver apartado 4.2.3.3) como el GSSG interaccionan con la piranina y alteran mucho el número de moléculas del indicador que se protonan transitoriamente, es decir, interfieren en el cambio de absorbancia máximo provocando una gran variabilidad entre cada medición. Sobre todo en el caso del GSSG donde la muestras no siguen una tendencia clara. Pero estos compuestos no interfieren en las cinéticas del transporte, ni en la expulsión del protón por el lado extracelular de la proteína ni en su reprotonación desde el lado citoplasmático como puede verse en la figura 4.35 en los espectros de absorbancia de la proteína nativa en presencia de DTT 1mM y una muestra tratada con GSSG respecto a la proteína nativa en condiciones normales, donde las curvas han sido normalizadas para facilitar su comparación.

En el caso del mutante F153C/R175C reducido el transporte se vuelve más lento (figura 4.35) como corresponde a un intermediario M también más lento que en la proteína nativa (figura 4.32). Sobre todo la mayor diferencia se produce en la reprotonación que se corresponde con la recuperación del cambio de absorbancia de la piranina, siendo aproximadamente 2 veces más lento para el mutante que para la proteína nativa. El tiempo al que se alcanza el máximo de expulsión de protones se desplaza de 1,5 ms a 2,7 ms. Los cambios observados en la cinética de transporte del doble mutante se corresponden aproximadamente con la suma de los cambios observados (figura 4.26) para los dos mutantes sencillos F153C y R175C, por tanto es de esperar que la mutación que mayor contribuye a las diferencias de comportamiento del mutante respecto a la proteína nativa sea la mutación del residuo Phe153.

Para el mutante oxidado, al igual que sucedía con la cinética de M, la expulsión del protón y la reprotonación de la proteína son un poco más lentos pero se aproxima más a la proteína nativa que en el caso del mutante reducido, siendo la reprotonación 1,5 veces más lenta y el tiempo al que se alcanza el máximo de expulsión de protones de 2,3 ms.

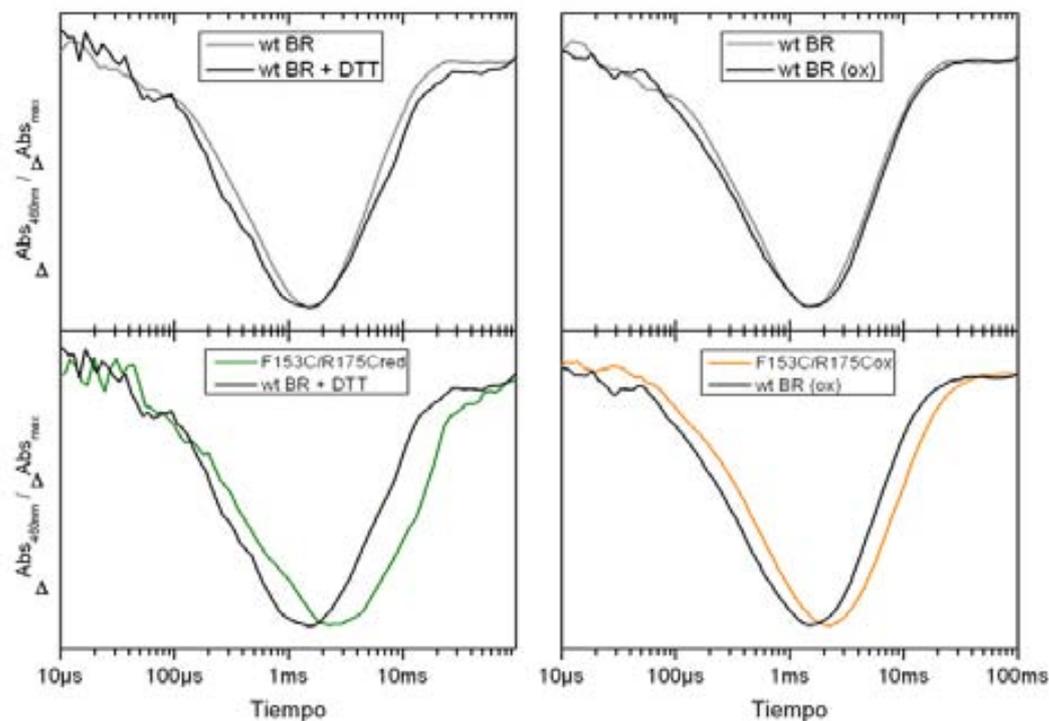


Figura 4.35. Cinéticas de aparición y desaparición de protones en el medio determinadas mediante el uso de piranina en muestras de concentración $15 \mu\text{M}$ del mutante F153C/R175C y de bacteriorodopsina nativa, en presencia de DTT 1 mM o tratadas con GSSG (ver leyenda), fotoexcitadas mediante un pulso de luz láser. Las muestras han sido preparadas en KCl 150 mM y el pH se ha ajustado a $7,2$. La relación molar proteína/piranina es de $3:10$. El cambio de absorción de la piranina al ser protonada transitoriamente se adquiere a 460 nm y a la absorbancia de la muestra en presencia de piranina se le resta la absorbancia de la proteína a esa misma longitud de onda. Todas las curvas han sido normalizadas dividiendo cada valor de cambio de absorbancia por el valor del cambio de absorbancia máximo.

La introducción de cisteínas en la posición Phe153 y Arg175 de la BR hace que el transporte de protones sea más lento como ya se comprobó mediante el estudio de los mutantes sencillos, sobre todo en el caso de la mutación F153C (ver apartado 4.2.3.3) y su oxidación recupera parcialmente este cambio.

b) Proteína incorporada en liposomas

Para poder comprobar la eficiencia del transporte en el mutante y, sobre todo, la influencia de restringir la flexibilidad de las hélices E y F mediante la formación de un puente disulfuro en el caso del mutante oxidado se hicieron medidas de transporte de muestras de proteína incorporada en liposomas.

Como siempre se realizó un control con muestras de proteína nativa en presencia de los agentes DTT y GSSG.

En este caso el DTT resultó causar una mayor distorsión en las medidas, mientras que el GSSG no altera en absoluto el transporte de la BR incorporada en liposomas al contrario de lo que sucedía con la piranina.

Cuando la proteína nativa se mide en presencia de DTT 1 mM y KCl 150mM la eficiencia máxima del transporte se reduce casi un 20% en comparación con la proteína nativa en las mismas condiciones pero sin DTT. Además, al iluminar durante tres minutos una muestra adaptada a la oscuridad la saturación del proceso de transporte se alcanza antes y, aunque se siga iluminando la proteína la curva del cambio de pH con el tiempo empieza a descender.

Pero si iluminamos las muestras durante la mitad de tiempo, es decir un minuto y medio, la cinética se parece a la que se obtiene con la proteína nativa en condiciones normales y la tasa máxima de transporte que se alcanza en cada muestra es reproducible. Por tanto, utilizando como control la proteína nativa en estas condiciones se puede determinar la eficiencia del transporte en el mutante F153C/R175C en sus dos estados, reducido y oxidado.

Tabla 4-4. Cálculo de la eficiencia de transporte de suspensiones del mutante F153C/R175C, reducido y oxidado, y de la BR nativa en las mismas condiciones incorporadas en EPC. A partir de las curvas del cambio de pH con el tiempo al iluminar las muestras (figura 4.36) se obtiene la velocidad inicial de transporte (v_i), ajustando los primeros puntos a una recta, y la tasa máxima de transporte que corresponde al gradiente de pH máximo que se alcanza al iluminar la muestra.

Transporte	Tasa máxima (%)	V_i (%)
wt BR DTT 1mM	100±6	100±5
F153C/R175Cred	95±3	130±14
wt BR (ox)	100±6	100±12
F153C/R175Cox	45±7	75±13

En la figura 4.36 se representan las cinéticas de transporte de protones de muestras de proteína incorporada en liposomas, tanto del mutante F153C/R175C como de la proteína nativa tratadas con GSSG o en presencia de DTT. En la tabla 4-4 se recogen los valores de la tasa máxima de transporte y de la velocidad inicial.

En el mutante reducido la velocidad inicial del transporte es aproximadamente un 30% mayor que en la proteína nativa pero la saturación se produce antes como puede verse por la forma de la curva que en seguida forma un plato, mientras que en la proteína nativa va disminuyendo la velocidad de transporte pero la muestra es todavía

capaz de transportar más protones durante todo el tiempo de iluminación. Sin embargo, la tasa máxima de transporte en el mutante es similar a la obtenida en el caso de la proteína nativa. Por tanto, el transporte en los proteoliposomas del mutante F153C/R175Cred está acelerado al principio pero no cambia apenas la eficiencia, siendo incluso un poco menor que en la proteína nativa y llegando antes a la saturación del sistema que consiste en el equilibrio entre los protones que son introducidos en el interior del liposoma transportados por la proteína y los que salen del liposoma por difusión.

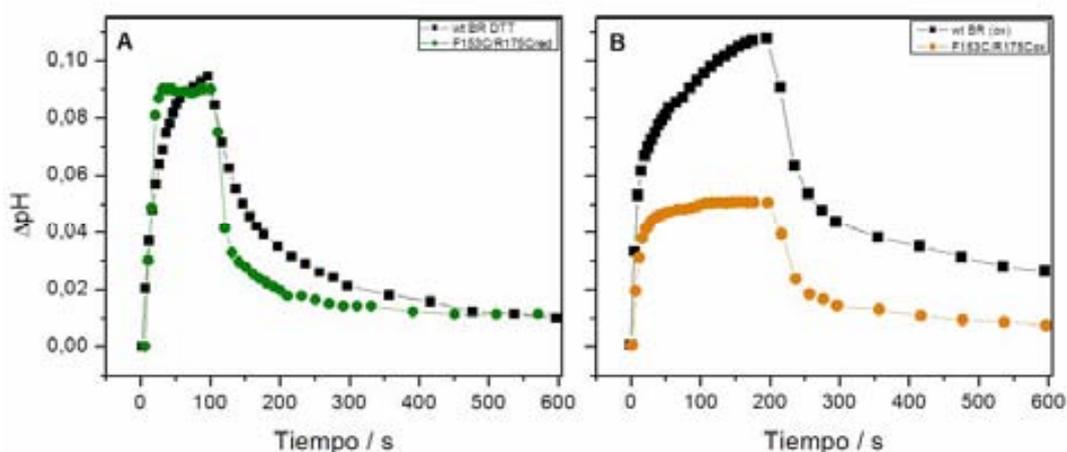


Figura 4.36. Bombeo de protones de una suspensión de proteína incorporada en liposomas del mutante F153C/R175C reducido con DTT 1 mM y de la bacteriorodopsina nativa en presencia de DTT (A) iluminadas durante 1,5 minutos; y del mutante F153C/R175C oxidado y su correspondiente muestra control de BR nativa (B) iluminadas durante 3 minutos. La concentración de proteína en las muestras es de 0,12 mg/ml y el lípido tiene una concentración de 6 mg/ml. Las muestras fueron preparadas en 150 mM KCl a pH 6,5. Para cada muestra se ha hecho un promedio mínimo de 9 medidas.

Por el contrario, el mutante F153C/R175C oxidado tiene la mitad de eficiencia aproximadamente en la tasa máxima de transporte que la proteína nativa sometida al mismo tratamiento. Su velocidad inicial es también inferior, siendo un 75% de la que tiene la proteína nativa.

Pese a que al estar reducido el mutante F153C/R175C tiene una cinética de transporte en general más alterada que cuando se oxida para formar un puente disulfuro por posibles interacciones de las cisteínas introducidas en esas posiciones, el transporte es más eficiente cuando estas están reducidas, es decir, cuando las hélices E y F y el bucle que las une pueden moverse libremente.

4.2.5 Discusión

El estudio de los mutantes simples F153C y R175C así como del doble mutante F153C/R175C demuestra que la sustitución de estos residuos, y en especial la Phe153, altera el funcionamiento de la proteína.

En principio no se esperaba que estos aminoácidos introdujesen cambios importantes en la función de la proteína debido a que no participan en el transporte y se encuentran alejados del camino por el cual es transportado el protón. Además no existe bibliografía que ponga de manifiesto efectos negativos causados por la sustitución de la Phe153 o la Arg175 en la bacteriorodopsina por otro residuo aminoacídico.

En el doble mutante F153C/R175C se ve una disminución de la estabilidad térmica de la proteína que apunta a la pérdida de alguna interacción estabilizadora de la proteína en el estado basal, aunque la diferencia respecto a la proteína nativa no es muy grande. La hidrólisis del retinal al aumentar la temperatura, determinada mediante espectroscopia UV-Vis, indica una disminución de la T_m del proceso de aproximadamente 6 °C, tanto en el estado reducido como en el estado oxidado de la proteína.

La formación de un puente disulfuro entre las hélices E y F en el mutante F153C/R175C oxidado, a pesar de no aumentar la estabilidad térmica de la BR, hace que el proceso de desnaturalización sea más cooperativo, como indican las bandas del termograma que son más estrechas en el mutante que en la proteína nativa. La banda de pre-transición del mutante, a pesar de aparecer desplazada a una temperatura aproximadamente 5 °C inferior (figura 4.30), tiene un área mayor que en la proteína nativa. Es decir, el proceso tiene una mayor entalpía y posiblemente la MP presenta una mayor compactación.

El estudio de intermediarios del fotociclo mediante fotólisis de destello y FTIR a baja temperatura de los mutantes simples muestra que en el caso de la Arg175 no hay cambios importantes al mutarla a cisteína, en cambio, en el caso de la Phe153 se produce una disminución en la acumulación del intermediario N y O, y un intermediario M más lento, es decir, la sustitución Phe153→Cys altera el mecanismo de reprotonación.

Como puede verse por los experimentos de fluorescencia mediante marcaje de las cisteínas con Mians, el residuo F153C se encuentra menos accesible que el R175C. Esto

concuerta con la posición que tiene este residuo en la estructura cristalográfica de la proteína (figura 4.37), prácticamente orientado hacia los lípidos. Lo que en principio no hacía sospechar que interfiriese en modo alguno en el fotociclo.

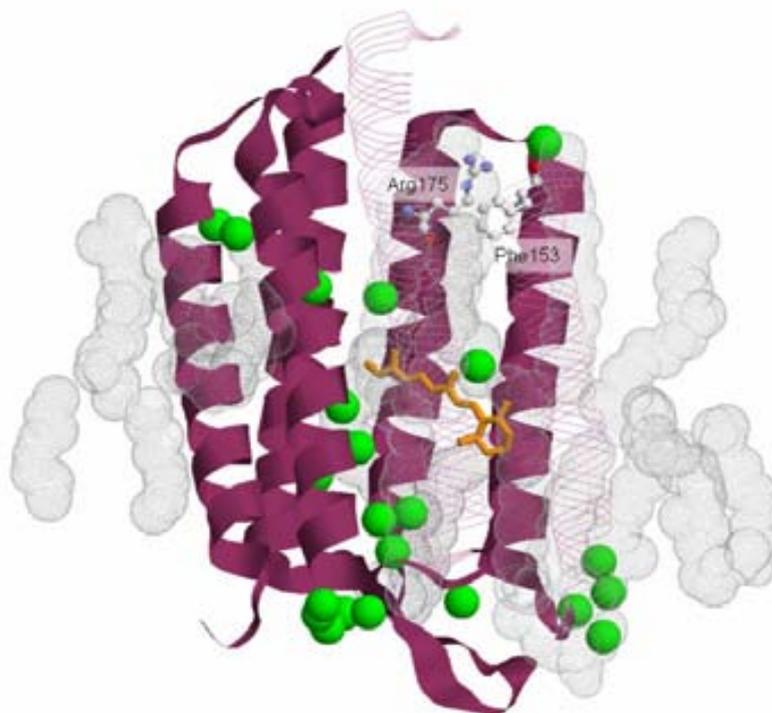


Figura 4.37. Representación de la bacteriorodopsina a partir de la estructura cristalina 1c3w en su estado basal (Luecke et al. 1999b). El bucle E-F no ha podido ser determinado, así como parte de los extremos N y C-terminal, debido a su alta flexibilidad. Las moléculas de agua aparecen representadas en color verde y también pueden verse algunos de los lípidos que rodean la proteína representados en color gris. En la estructura se ve como la Phe153 (hélice E) está orientada hacia los lípidos mientras que la Arg175 (hélice F) está orientada hacia la hélice E.

Por tanto, no es fácil determinar la causa que produce esa alteración en el fotociclo al sustituir la fenilalanina en posición 153 por una cisteína. En principio parece razonable pensar que esta sustitución cambia de manera importante el entorno de este residuo por ser un aminoácido polar y relativamente pequeño en comparación con la fenilalanina que es apolar y voluminosa. Este cambio en el entorno parece tener consecuencias a larga distancia interfiriendo en el proceso de reprotonación de la BS a partir del Asp96 y la posterior protonación de este residuo desde el lado citoplasmático.

Como ya se comentó en la introducción, la apertura de las hélices en el lado citoplasmático tiene como objetivo permitir la entrada de agua desde el medio y la reorganización de las moléculas de agua en la cavidad citoplasmática de la proteína, permitiendo así que se forme una red de aguas que sería la responsable de disminuir el

pK_a del Asp96, facilitando así la transferencia del protón del Asp96 a la BS y, posteriormente, del citoplasma al Asp96.

La mutación F153C podría causar una alteración importante en la formación de esta red de aguas por interacción directa de la cisteína, o por una alteración en el entorno de la hélice E. Esto cambiaría las interacciones establecidas por otros residuos de la hélice con esta red de aguas, haciendo que cambie su conformación y se dificulte el proceso de transferencia del protón.

Estos cambios podrían estar relacionados también con la pérdida de alguna interacción interhélice, o incluso proteína-lípido, al sustituir el aminoácido apolar Phe por el aminoácido polar Cys, con un papel importante en relación a los cambios de la hélice E durante la segunda parte del fotociclo.

Como ya se mencionó anteriormente, la Phe153 se encuentra orientada hacia los lípidos de la membrana y en un entorno hidrofóbico. Estos lípidos, y en especial los lípidos neutros, se ha visto que tienen un papel importante en el transcurso del fotociclo (Hendler et al., 2001). La presencia de los lípidos neutros favorece la formación de M_f (*M fast*) que sería el intermediario que daría lugar a la formación de $N \rightarrow O$ y posteriormente BR_{570} . En cambio, en ausencia de estos lípidos se favorece la formación del intermediario M_s (*M slow*) cuya desaparición da lugar al estado basal BR_{570} , es decir, a partir de M_s no se forman los intermediarios N y O . Se cree que el papel de los lípidos neutros en la formación de M_f consiste en neutralizar la carga de algunos residuos superficiales de la proteína (aspárticos) entre los trímeros de BR, favoreciendo así la formación de M_f y el camino de recuperación del estado basal a través del intermediario O .

De la misma forma se podría asignar un papel similar a los residuos de la proteína que se encuentran orientados hacia la parte exterior como es el caso de la Phe153, que en algunas estructuras parece estar interaccionando con los lípidos que rodean la proteína (figura 4.37). De hecho la hélice E, donde se encuentra este residuo, es una de las hélices implicadas en la interacción entre monómeros (ver apartado 1.3.1). El cambio de fenilalanina a un residuo polar como es la cisteína podría ser el responsable de la alteración en la cinética del fotociclo, en donde disminuye el rendimiento del intermediario O y el intermediario N también está desfavorecido.

Por otro lado, el anillo β -ionona del retinal está estabilizado por residuos de las hélices D, E y F (Heyn et al., 2000). Un cambio en la interacción de estas hélices con el

retinal, causado por la mutación de alguno de los aminoácidos que forman estas hélices, podría influir también en el transcurso del fotociclo.

El hecho de que se reviertan parcialmente los cambios observados en la cinética de M y BR₅₇₀ en fotólisis de destello para el doble mutante oxidado, respecto al reducido y respecto a F153C, sugiere una neutralización de la influencia de sustituir la Phe en posición 153 por una Cys. Esto apoyaría la hipótesis de que la Cys en posición Phe153 podría establecer interacciones, bien de Van der Waals o bien por puente de hidrógeno mediante el enlace S-H, que no existen en la proteína nativa y que distorsionarían el transcurso normal de la segunda parte del fotociclo.

En este sentido al oxidar las cisteínas se pierden los enlaces S-H para formar el enlace S-S, y por tanto se pierde la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno diferentes a los que tiene la proteína nativa.

El mutante F153C/R175C oxidado, a pesar de tener un fotociclo en el visible más similar al de la proteína nativa respecto a su forma reducida, sus espectros de diferencia de FTIR muestran alteraciones importantes en la estructura secundaria de la proteína durante el proceso de reprotonación de la BS en M y N como demuestra la disminución de la intensidad de las bandas de la amida I y la banda a 1186 cm⁻¹ correspondiente a la BS. El hecho que las bandas de la amida I a 1650 y 1670 cm⁻¹ sean menos intensas concuerda con los resultados obtenidos para el Loop5 en FTIR estático y resuelto en el tiempo. En este caso se veía como estas bandas eran más intensas al aumentar la flexibilidad y el tamaño del bucle que une las hélices. Por tanto, es lógico que al disminuir la libertad de movimiento de esas hélices las bandas sean menos intensas.

Por otro lado, a pesar de que el mutante con las cisteínas oxidadas tiene una cinética de transporte en presencia de piranina (figura 4.35) y una curva de cambio de pH al iluminar una muestra de proteína incorporada en liposomas (figura 4.36) más similares a las de la proteína nativa, no es tan eficiente transportando protones como en su forma reducida. Esto se demuestra por las mediciones del transporte de protones en liposomas (figura 4.36 y tabla 4-4). Es decir, al restringir el movimiento de las hélices se disminuye la eficiencia del transporte.

El hecho de que el mutante con las cisteínas reducidas muestre unas cinéticas de transporte de protón más alejadas de la proteína nativa se debe al efecto de la mutación

F153C como puede verse en la cinética de transporte del mutante en presencia de piranina (figura 4.26).

Todos estos resultados resaltan la relevancia que tiene la flexibilidad del bucle E-F en la función de la bacteriorodopsina, así como los residuos que se encuentran en la región hidrofóbica del lado citoplasmático.

De hecho este bucle no se puede ver en algunas estructuras cristalográficas debido a su alta movilidad y desordenamiento (figura 4.37).

4.3 Restricción de la movilidad de las hélices F-G: Estudio del mutante E166C/A228C

Además de las hélices E y F y el bucle que las une, se cree que la hélice G está también implicada en la apertura que tiene lugar en el lado citoplasmático de la proteína para facilitar la reprotonación (ver apartado 1.9).

Con el objetivo de explorar la implicación de la hélice G se diseñó el doble mutante de cisteína E166C(hélice F)/A228C(hélice G). Así, la oxidación de las cisteínas para formar un puente disulfuro debería dificultar el movimiento de ambas hélices interfiriendo en el proceso de reprotonación de la BR.

En la figura 4.38 se puede observar como los residuos seleccionados se encuentran próximos y bien orientados para poder formar un puente disulfuro.

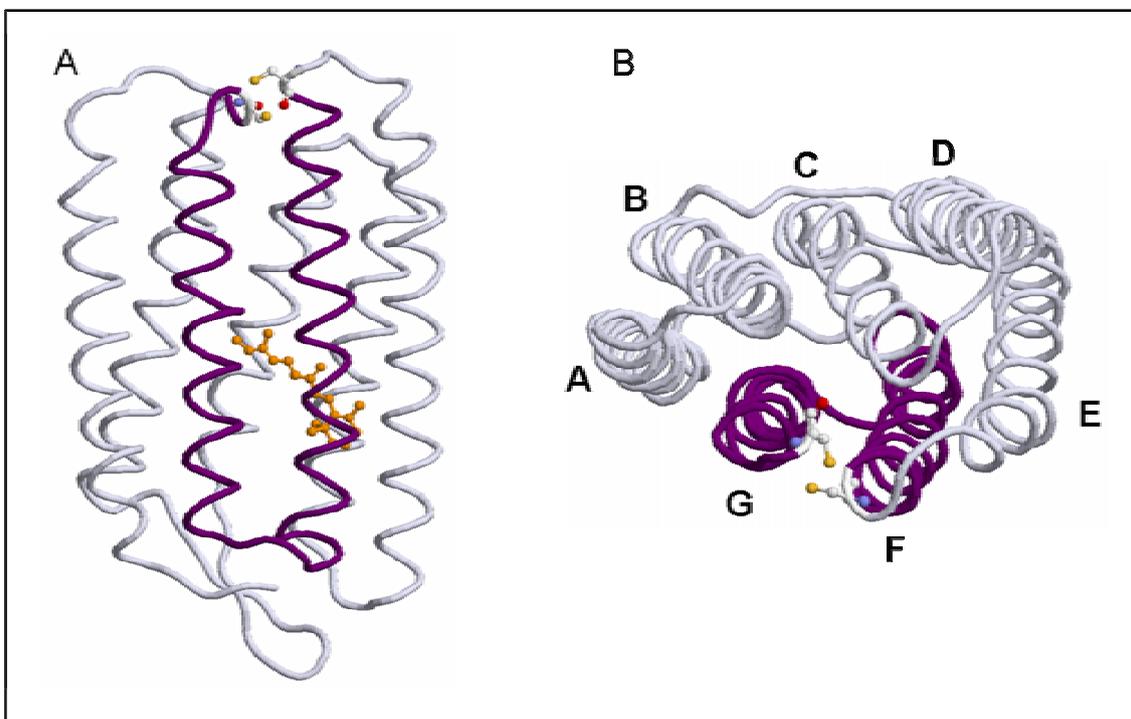


Figura 4.38. Estructura del mutante E166C/A228C obtenida a partir de la estructura cristalográfica 1BRR del PDB. A. Vista lateral con las hélices F y G resaltadas en color púrpura. B. Vista desde el lado citoplasmático de la proteína.

Para oxidar las cisteínas se usó el oxidante GSSG durante el proceso de purificación y para obtener el mutante reducido se purificó en presencia de DTT 1 mM. Esta última condición se mantuvo en los experimentos para asegurar que el mutante no se oxidara durante la medición, lo cual podría haber originado una mezcla de ambas condiciones.

4.3.1 Caracterización del mutante E166C/A228C reducido y oxidado mediante fluorescencia

Como ya se describió en el apartado 3.4.4 y 4.2.2 el uso de la sonda fluorescente Mians permite la caracterización del estado de oxidación de las cisteínas en el interior de la proteína.

En la figura 4.39 se observa como la incubación del mutante E166C/A228C en su estado reducido con el Mians da una cinética de tipo exponencial que alcanza su máximo de reacción a las 2 horas aproximadamente, mientras que el mutante en su estado oxidado no da apenas reacción. La señal que se observa en este caso parece corresponder a una reacción inespecífica de la MP con la sonda como se vio al incubar la proteína nativa, que no tiene cisteínas, con el Mians (figura 4.21).

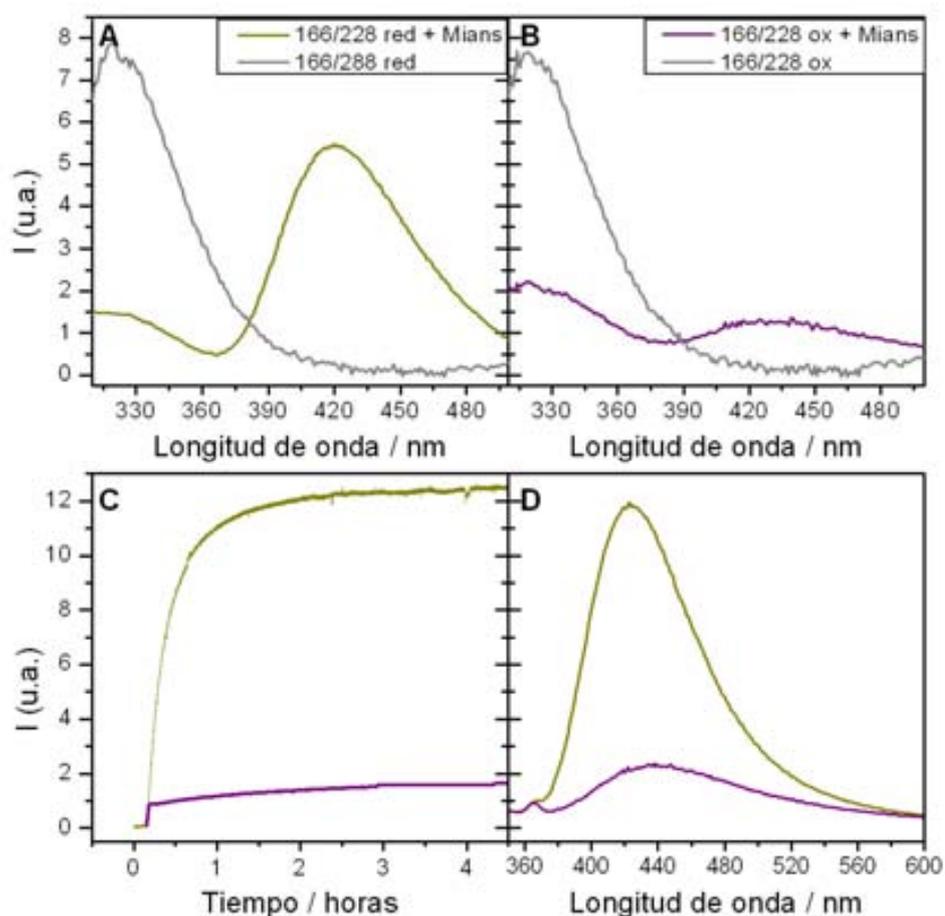


Figura 4.39. Espectro de emisión de triptófano de una muestra de concentración $2 \mu\text{M}$ del mutante E166C/A228C reducido (A) y del mutante oxidado (B) antes y después de hacer reaccionar la proteína con la sonda fluorescente Mians. La longitud de onda de excitación de los triptófanos fue 290 nm. C. Cinéticas de emisión del Mians excitado a 325 nm y adquiridas a 430 nm para una muestra del mutante E166C/A228C reducido y otra muestra del mutante oxidado. D. Espectro de emisión del Mians para ambas muestras después de finalizar la reacción de marcaje de las cisteínas. La relación molar proteína/sonda es de 1:12 y las muestras se prepararon en tampón fosfato 50 mM a pH 7. Todas las mediciones fueron realizadas a 20 °C.

La señal que se obtiene para el mutante reducido es del mismo orden de la que se obtuvo para el mutante F153C/R175C reducido (figura 4.22).

En la grafica 4.39.A se ve como el Mians que ha reaccionado con los residuos E166C y A228C interacciona con algunos triptófanos de la proteína produciéndose FRET de los triptófanos a la sonda y disminuyendo así la intensidad de la emisión de los triptófanos.

Por tanto, podemos considerar que en el estado reducido de la proteína tenemos realmente las cisteínas libres como demuestra la reacción con el Mians. En cambio, en el estado oxidado del mutante las cisteínas están formando un puente disulfuro que impide que las cisteínas puedan reaccionar con la sonda.

4.3.2 Adaptación luz-oscuridad

Con el objetivo de comprobar que la mutación E166C/A228C y la formación del puente disulfuro entre las hélices F y G no interfieren en el proceso de isomerización del retinal, permitiendo que la BR pueda realizar el fotociclo, se estudió el proceso de adaptación luz-oscuridad en muestras reducidas y oxidadas del mutante.

Como puede observarse en la figura 4.40 el desplazamiento del máximo de absorbancia del pigmento y su localización coinciden con los valores de la proteína nativa indicando un proceso de adaptación luz-oscuridad completamente normal en el mutante.

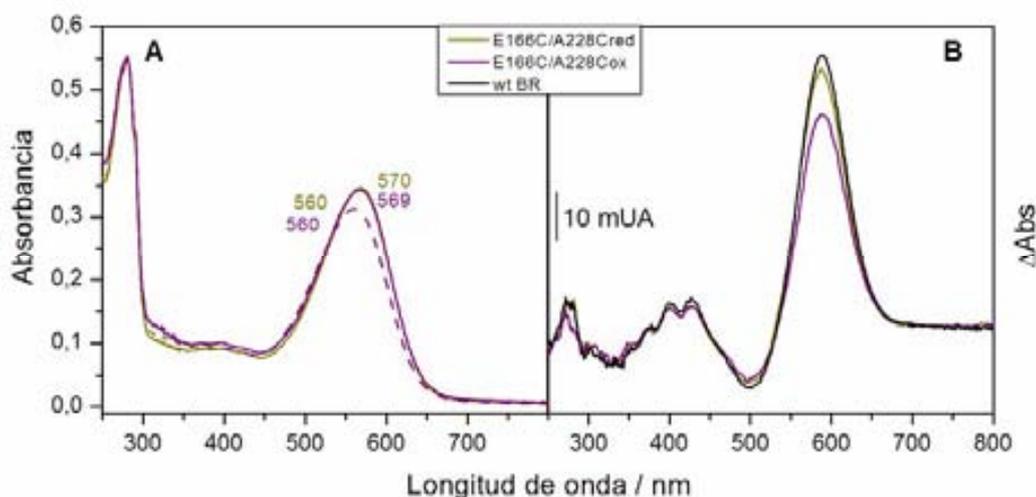


Figura 4.40. **A.** Espectros de absorbancia en el UV-Vis de una muestra del mutante E166C/A228C reducido y otra muestra del mutante oxidado de concentración 5 μ M adaptadas a la oscuridad y adaptadas a la luz, en agua y a pH neutro. **B.** Espectros de diferencia entre la forma adaptada a la luz y la forma adaptada a la oscuridad para ambos mutantes y para la proteína nativa. En la gráfica A se ha excluido la representación de la proteína nativa para mayor claridad.

Pero en el caso del mutante oxidado el aumento en el coeficiente de absorción molar entre la forma adaptada a la oscuridad y la forma adaptada a la luz es aproximadamente un 20% menor que en la proteína nativa y que en su forma reducida, reflejando alguna pequeña alteración en el entorno del retinal debido a la restricción de la flexibilidad de las hélices F y G. Esta alteración podría ser debida a que el retinal no puede acomodar fácilmente su nueva conformación debido a que se necesita una cierta relajación de las hélices. Por tanto, la flexibilidad de las hélices F y G parece ser importante también para este proceso.

4.3.3 Estabilidad térmica

4.3.3.1 Determinada mediante espectroscopia UV-Vis

El estudio de la estabilidad térmica del mutante E166C/A228C en su forma reducida y oxidada muestra una tendencia contraria respecto a la proteína nativa. Es decir, el mutante reducido es un poco menos estable que la proteína nativa (figura 4.41) del orden de 8 °C, indicando que las mutaciones introducidas en la BR en la posición Glu166 y Ala228 son ligeramente desestabilizadoras; en cambio el mutante oxidado es igual de estable que la proteína nativa o incluso un poco más estable, indicando que el puente disulfuro aumenta la estabilidad de la proteína respecto a la forma reducida y compensa el efecto de las mutaciones. Este aumento de estabilidad de la forma oxidada es indicativo también de la presencia del puente disulfuro en el mutante cuando se trata con el oxidante GSSG.

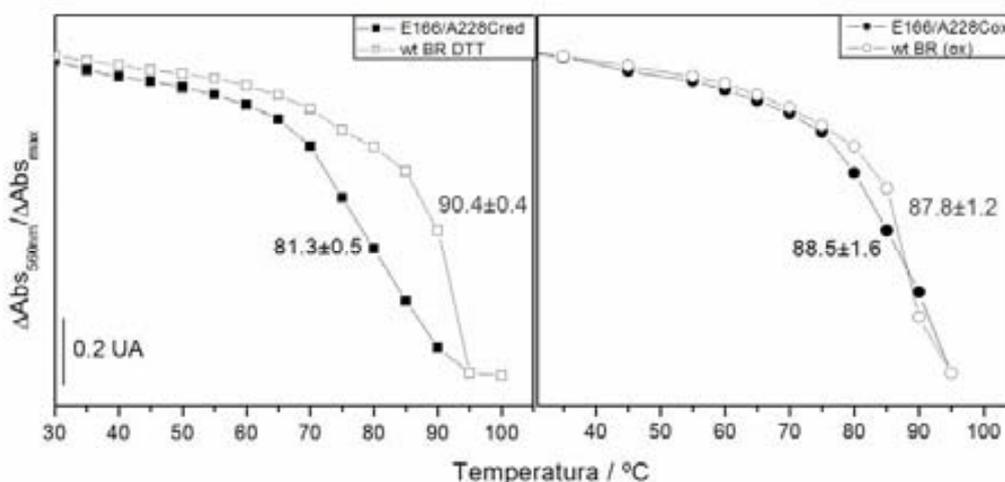


Figura 4.41. Cinética de desnaturalización del mutante E166C/A228C con las cisteínas reducidas y con las cisteínas oxidadas, y de la proteína nativa sometida a los mismos tratamientos. La T_m del proceso ha sido determinada a partir del cambio de absorbancia en el máximo de la banda del pigmento (560 nm) al incrementar la temperatura de una muestra de concentración 15 μ M en agua a pH neutro.

4.3.3.2 Calorimetría diferencial de barrido del mutante E166C/A228C oxidado

El estudio del mutante E166C/A228C en su forma oxidada mediante DSC muestra también ese aumento de la estabilidad térmica del mutante respecto a la proteína nativa, tratada o no con GSSG (figura 4.29 y 4.42).

Este aumento de estabilidad se refleja en la banda de la pre-transición y en la transición principal siendo la primera del orden de 5 °C más estable que la proteína nativa tratada con GSSG y 2 °C menos estable que la pre-transición en la proteína nativa sin tratar. Esta banda es además más intensa como corresponde a un proceso más cooperativo, indicando que la compactación de la proteína mediante un puente disulfuro parece compactar también la disposición ordenada de los monómeros de BR en la MP.

La banda de la transición principal se ensancha y su máximo se desplaza también 4 °C respecto al de la proteína nativa.

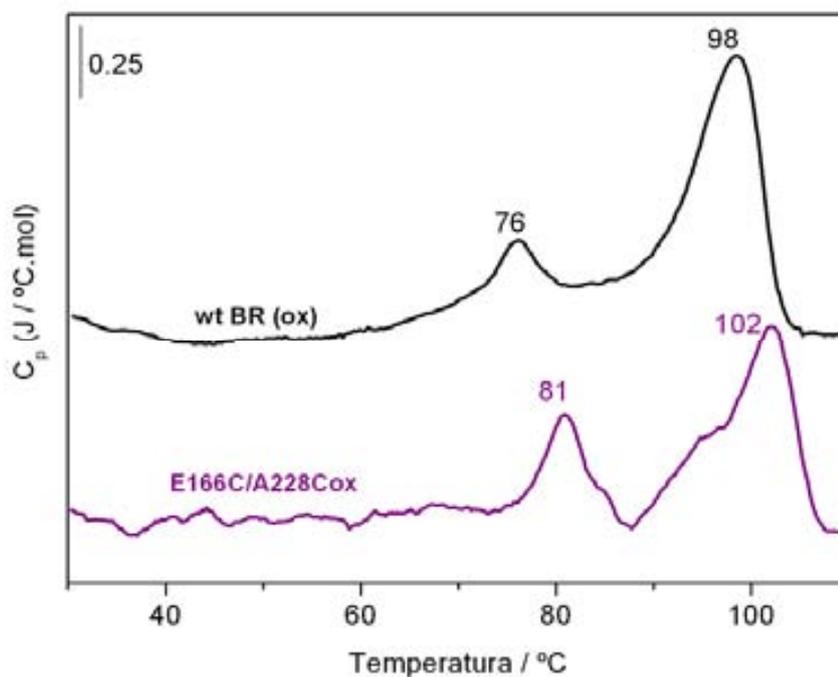


Figura 4.42. Termograma de DSC del mutante E166C/A228C oxidado y de la proteína nativa tratada con el mismo oxidante (GSSG). Las muestras han sido preparadas a una concentración de 2 mg/ml y dializadas previamente en agua a pH neutro. La velocidad de barrido ha sido de 1,5 °C/min.

La introducción de un puente disulfuro entre las hélices F y G aumenta ligeramente la estabilidad de la bacteriorodopsina y hace que aparezca un nuevo evento de desnaturalización en el termograma de DSC que se solapa con la transición principal, y que probablemente corresponda a la ruptura de ese puente disulfuro. El termograma de la proteína reducida (DTT 0,2 mM), a pesar de ser muy ruidoso, muestra unos valores de temperatura de ambas bandas muy similares a los de la proteína nativa lo que indica que las mutaciones no son desestabilizadoras. La forma del termograma se parece sin embargo al de la proteína oxidada pudiendo atribuirse a la existencia de ambas formas. Es decir, el DTT podría desactivarse por calor y el mutante estaría parcialmente oxidado.

4.3.4 Estudio de intermediarios del fotociclo

El estudio del fotociclo del mutante E166C/A228C reducido, con las cisteínas libres, y del mutante oxidado formando un puente disulfuro entre las hélices F y G, mediante fotólisis de destello muestra claramente como el fotociclo sufre un cambio drástico al bloquear las hélices.

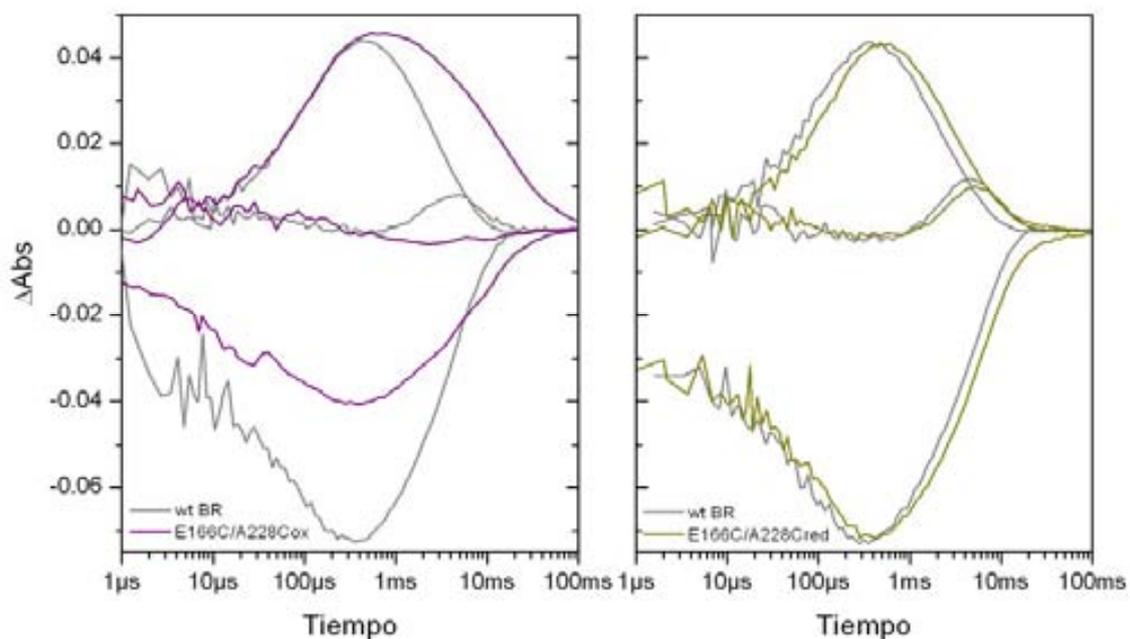


Figura 4.43. Cinéticas de los intermediarios M, O y del estado BR₅₇₀ en el visible obtenidas a partir de suspensiones de concentración 15 μ M del mutante E166C/A228C, oxidado y reducido, y de la bacteriorodopsina nativa en tampón fosfato 3 mM y 150 mM de KCl excitando las muestras mediante un pulso de luz láser y adquiriendo el cambio de absorbancia en el tiempo respecto a la absorbancia de la proteína sin excitar.

En la figura 4.43 puede verse como en el mutante oxidado M es muy lento y no se forma el intermediario O. La banda de BR₅₇₀ es mucho menos intensa debido a que M tiene mayor acumulación que en la proteína nativa y probablemente porque no hay formación del intermediario N o tiene muy poco rendimiento. Cuanto más pequeña es la relación entre la absorbancia de la banda de BR₅₇₀ respecto a la absorbancia de la banda de M menor es la acumulación del intermediario N. Esto indica que probablemente el fotociclo sigue otro camino distinto del habitual pasando de M a BR₅₇₀.

En el mutante E166C/A228C reducido, donde las hélices pueden moverse, el fotociclo se parece mucho al de la proteína nativa, con un ligero enlentecimiento y una menor acumulación del intermediario O que es debido a las mutaciones como demuestra el estudio del mutante simple E166C (no incluido en el presente trabajo). Pero en este caso las alteraciones que produce la sustitución de los residuos Glu166 y Ala228 por cisteína no son tan significativas.

4.3.5 FTIR a baja temperatura

Mediante los espectros de diferencia de FTIR se caracterizó más a fondo lo que sucede con la estructura de los intermediarios M y N en el mutante E166C/A228C en sus dos estados, reducido y oxidado.

Como puede verse en la figura 4.44 a pH 7 y 243 K (-30 °C) se acumula mayoritariamente M y, en el caso del mutante E166C/A228C este intermediario M parece normal tanto para la proteína oxidada como para la proteína reducida. Las diferencias más importantes son una cierta mezcla de L o N con M en el mutante reducido, al igual que sucede con la proteína nativa tratada con GSSG y que ya se comentó en el apartado 4.2.4.4. Y en el mutante oxidado la banda a 1738 cm⁻¹, asignada a perturbaciones en el entorno del Asp115, es menos intensa apuntando a un posible efecto a larga distancia al bloquear el movimiento de las hélices que podría depender de la relajación o algún pequeño cambio conformacional en las hélices. Sin embargo, esta banda se vuelve más intensa cuando se aumenta la temperatura a 15 °C.

A pH 10 y 243 K en donde aparece la transición M-N en la proteína nativa se ve como el mutante reducido presenta también un espectro característico de esta situación, mientras que el mutante oxidado acumula M sin ninguna traza de N, como puede por las bandas de la amida I y amida II y la banda correspondiente a la protonación de la BS a 1186 cm⁻¹.

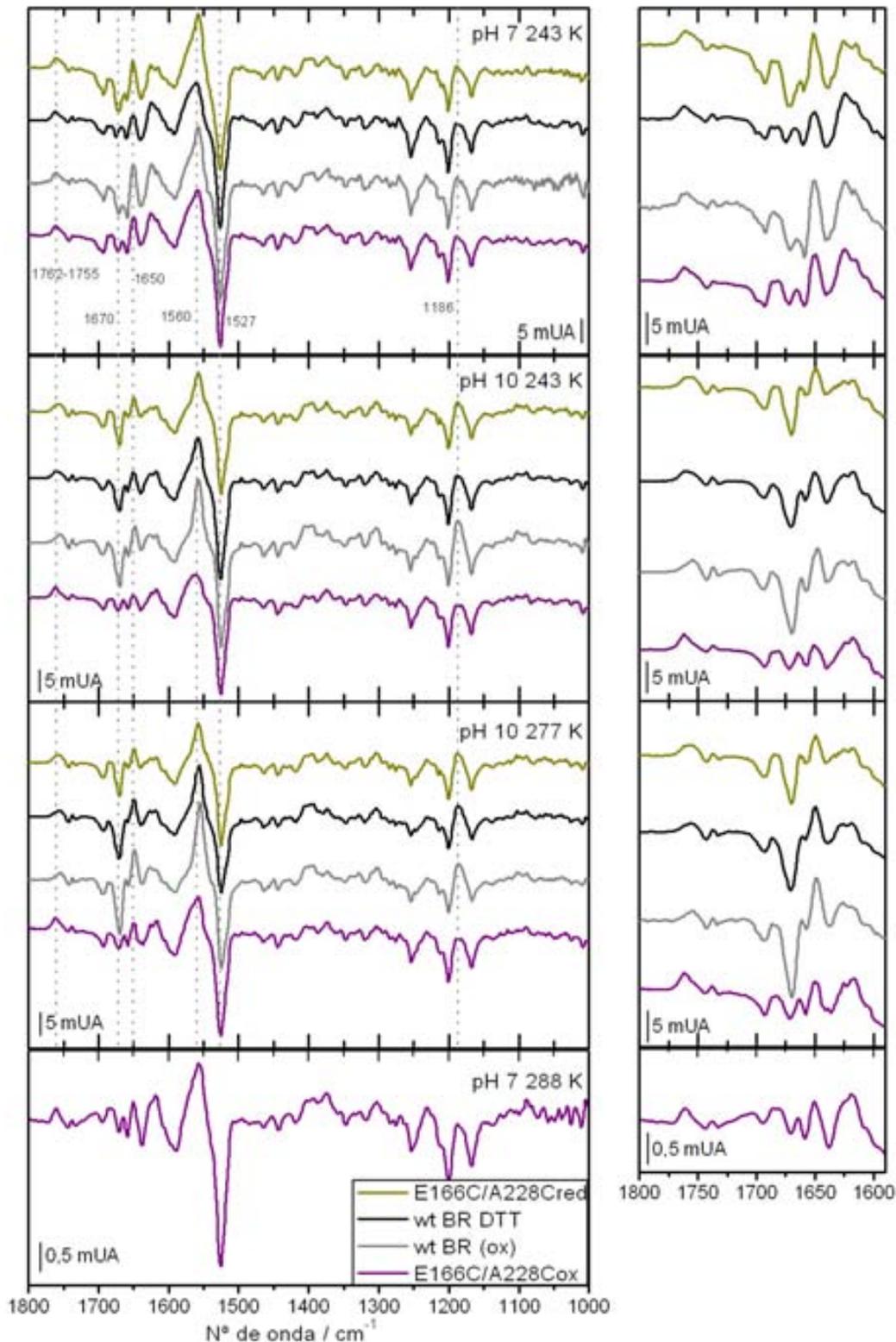


Figura 4.44. Espectros de diferencia de FTIR del mutante E166C/A228C oxidado y reducido, y de la bacteriorodopsina nativa sometida a los mismos tratamientos, adquiridos a distintas condiciones de pH y temperatura. En la gráfica de la derecha se representa una ampliación de la zona de la amida I y de las bandas de los carboxilos. Las muestras a pH 7 se prepararon en tampón fosfato 3 mM y las muestras a pH 10 en tampón carbonato 3 mM, ambos con una concentración de KCl 150 mM.

Si aumentamos la temperatura a 277 K el mutante en su forma reducida acumula N al igual que la proteína nativa, mientras que en su forma oxidada sigue acumulando M. De hecho es tan lento que puede acumularse incluso a 288 K (15 °C) como muestra la figura 4.44. Además este intermediario M, adquirido a una temperatura elevada para atrapar cualquier intermediario del fotociclo, no muestra ningún cambio en las bandas a 1650 cm^{-1} y 1670 cm^{-1} que presumiblemente estarían relacionadas con ese movimiento de hélices que comienza durante el paso de M a N y es más intenso en N, y que se observa en la proteína nativa y en el mutante E166C/A228C reducido.

Las mutaciones E166C y A228C producen por tanto alguna pequeña alteración en el fotociclo como se ve por la diferencia en el espectro del intermediario M a pH 7 y 243 K pero en general no cambian la estructura de los intermediarios.

En cambio, la unión de las hélices F y G mediante un puente disulfuro no permite que la proteína pase de M a N durante el fotociclo presentando por tanto un bloqueo del fotociclo en este intermediario y un posible camino alternativo que consistiría en el paso de M a BR₅₇₀ directamente.

4.3.6 Bombeo de protones

4.3.6.1 *En presencia de piranina*

Al igual que sucedía en el estudio del mutante F153C/R175C la presencia de DTT en el medio, o los restos de GSSG que quedan en el stock de proteína oxidada tras los lavados, interfieren en las medidas de transporte de protones causando una gran dispersión en el cambio de absorbancia a 460 nm que experimenta la piranina al protonarse y desprotonarse transitoriamente.

Pero estos compuestos no alteran la cinética de la curva, siendo por tanto un buen método para poder estudiar el transporte a nivel molecular.

En la figura 4.45 se representan las curvas obtenidas para el mutante E166C/A228C en sus dos condiciones y la comparación con la BR nativa en las mismas condiciones.

En primer lugar se puede ver cómo a pesar de tener un fotociclo tan alterado el mutante E166C/A228C oxidado puede transportar protones, aunque este transporte es mucho más lento.

El mutante reducido presenta una cinética muy similar a la de la proteína nativa, mientras que el mutante oxidado tiene una cinética muy alterada, siendo la expulsión del

protón al medio extracelular y la reprotonación del mutante un orden de magnitud más lentas que en la proteína nativa.

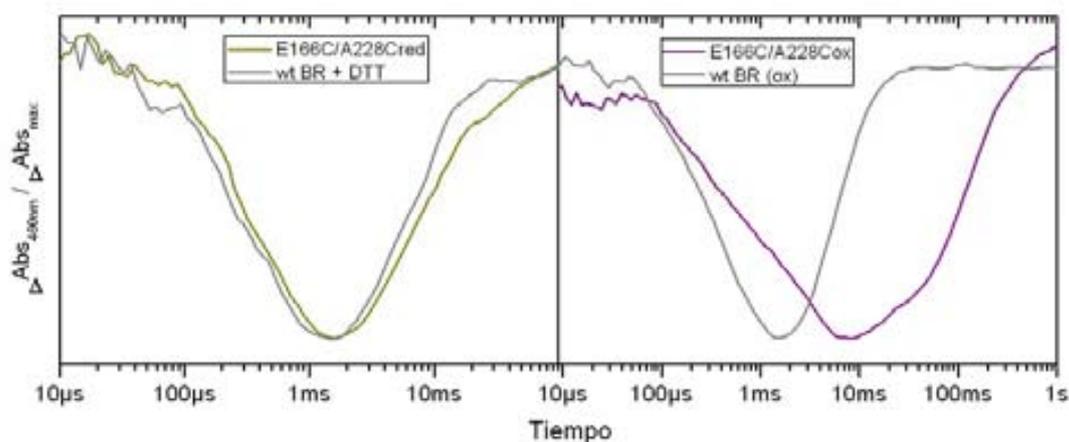


Figura 4.45. Cinéticas de desprotonación y reprotonación del mutante E166C/A228C en su forma reducida y oxidada y de la proteína nativa en muestras fotoexcitadas en presencia de piranina. Las curvas han sido normalizadas dividiendo cada valor de cambio de absorbancia por el valor máximo. La relación molar proteína/piranina ha sido de 3:10 y las muestras fueron preparadas en KCl 150 mM a pH 7,2.

Mientras que la cinética es bastante similar a la de la proteína nativa cuando las cisteínas están libres, al bloquear las hélices F-G mediante la formación de un puente disulfuro la cinética de expulsión del protón y de reprotonación de la BR se ven profundamente perjudicadas pasando a tener un ciclo de transporte más lento.

4.3.6.2 Proteína incorporada en liposomas

Tabla 4-5. Tasa máxima de transporte y velocidad inicial (V_i) obtenidas a partir de las cinéticas de transporte de protones de una suspensión de proteoliposomas del mutante E166C/A228C, en su estado reducido y oxidado, y de la BR nativa en las mismas condiciones (figura 4.46).

Transporte	Tasa máxima (%)	V_i (%)
wt BR DTT 1mM	100±6%	100±5
E166C/A228Cred	83±2,5%	129±20
wt BR (ox)	100±6%	100±12
E166C/A228Cox	46±10%	34±14

Como ya se mencionó anteriormente (apartado 4.2.4.5) la presencia de DTT en muestras de liposomas produce una pequeña alteración en las curvas de cambio de pH con el tiempo al iluminar las muestras. Esta interferencia consistía principalmente en

una pequeña reducción en la tasa máxima de transporte y una saturación de los liposomas más temprana al ser iluminados.

Sin embargo, iluminando durante menos tiempo la muestra se consiguen resultados reproducibles.

En la tabla 4-5 se recogen los valores obtenidos para el mutante y la proteína nativa a partir de las cinéticas de transporte de muestras de proteína incorporada en liposomas (figura 4.46).

El mutante E166C/A228C reducido tiene una cinética de transporte de protones muy similar a la proteína nativa, como se veía también en las curvas de absorbancia en el visible en presencia de piranina. Sin embargo, la eficiencia del transporte está afectada siendo un 83% de la eficiencia que se observa en la BR nativa en presencia de DTT 1mM. La velocidad inicial de transporte es mayor pero los liposomas pierden antes su capacidad de seguir transportando protones durante el tiempo de iluminación de la muestra (figura 4.46.A).

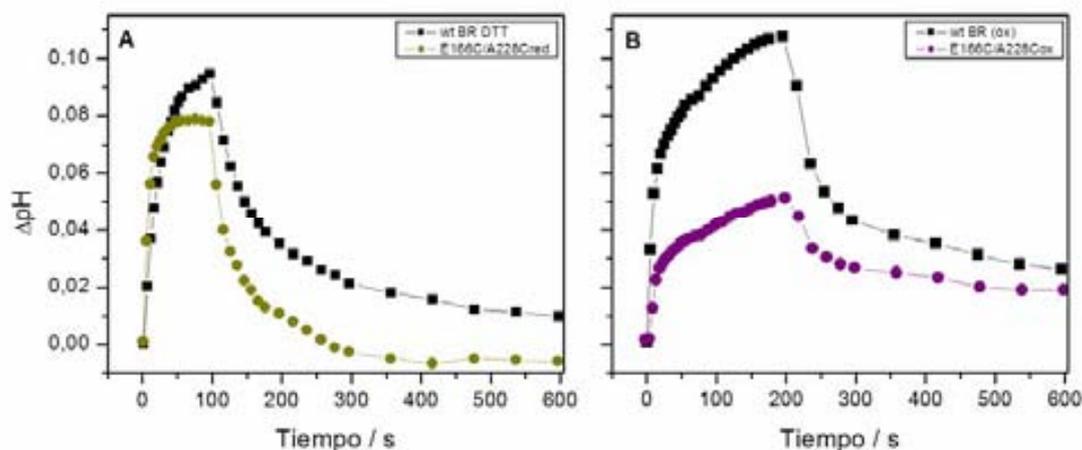


Figura 4.46.A. Cinética de transporte de protones de una muestra de proteoliposomas del mutante E166C/A228C y de la proteína nativa en presencia de DTT 1 mM iluminadas durante 90 segundos y después mantenidas en oscuridad. **B.** Cinéticas de transporte de una muestra del mutante E166C/A228C oxidado y de la proteína nativa tratada con el mismo oxidante iluminadas durante 3 minutos. La concentración de proteína en las muestras es de 0,12 mg/ml y el lípido tiene una concentración de 6 mg/ml. Las muestras fueron preparadas en 150 mM KCl a pH 6,5.

El estudio de muestras de proteoliposomas del mutante E166C/A228C oxidado muestra que es capaz de transportar protones, al igual que se veía en los estudios de la proteína en presencia de piranina, pero en este caso el transporte está claramente afectado siendo su efectividad un poco menos de la mitad de la efectividad que tiene la

BR nativa en las mismas condiciones. Además la velocidad inicial de transporte es aproximadamente un tercio de la velocidad de bombeo de la MP nativa.

Por tanto, al limitar el movimiento de las hélices F y G en la BR la función de transporte se ve muy afectada, y aunque la proteína es capaz de transportar el transporte es más lento y menos efectivo.

4.3.7 Discusión

El estudio del mutante E166C/A228C muestra en primer lugar una pequeña alteración debido a la sustitución de los residuos Glu166 y Ala228 por cisteínas que se refleja en una pequeña pérdida de estabilidad estructural en el mutante reducido, siendo la T_m de liberación del retinal, determinada mediante espectroscopia UV-Vis, unos 8-9 °C inferior a la T_m de la proteína nativa. Aunque el estudio del proceso de desnaturalización del mutante reducido mediante la técnica de DSC, que proporciona datos de este proceso desde un punto de vista más estructural, parece indicar que no hay una pérdida de estabilidad respecto a la proteína nativa, si bien no se puede descartar que la proteína pueda estar parcialmente oxidada. Por otro lado la eficiencia del transporte es aproximadamente un 20% inferior a la eficiencia de la BR nativa.

Estas alteraciones observadas en el mutante E166C/A228C reducido, y que se deben a la doble mutación, podrían estar causadas por interacciones de estos residuos con la red de aguas que se encuentra en el lado citoplasmático, afectando sobre todo al proceso de reprotonación, que es cuando las moléculas presentes en la cavidad citoplasmática sufren un cambio de ordenamiento aumentando incluso el número de moléculas de agua presentes en el interior de la proteína.

Sin embargo, estos cambios no son muy drásticos como demuestran los estudios de intermediarios del fotociclo mediante fotólisis de destello y mediante FTIR a baja temperatura, y la proteína conserva todos los cambios estructurales que tienen lugar durante la segunda parte del fotociclo que era el objetivo de la construcción del mutante.

Cuando se oxida, el mutante E166C/A228C forma un puente disulfuro y así las cisteínas ya no son capaces de reaccionar con la sonda fluorescente Mians (figura 4.39). El proceso de adaptación luz-oscuridad sufre un cambio relativamente pequeño al introducir este puente disulfuro como demuestran los espectros de absorbancia en el UV-Vis del mutante reducido y oxidado, disminuyendo el incremento en el coeficiente de absorción molar que se produce en la muestra iluminada respecto de la muestra

adaptada a la oscuridad. Es decir, la restricción de la movilidad de las hélices tiene ciertos efectos a larga distancia provocando cambios en el entorno del retinal.

Sin embargo, la estabilidad estructural de la proteína aumenta ligeramente, tanto a nivel molecular como a nivel de compactación de la membrana púrpura como se deduce del estudio del termograma de DSC del mutante oxidado. Además, en el termograma aparece otro pico que parece solaparse con la transición principal y que corresponde a un nuevo evento de desnaturalización, pudiendo estar relacionado con una desnaturalización más tardía de las hélices F y G al estar unidas por un puente disulfuro.

Pero la introducción de este puente disulfuro tiene cambios drásticos en el fotociclo y en la función de la BR. El estudio del fotociclo mediante fotólisis de destello muestra un mayor tiempo de vida medio para el intermediario M en el mutante oxidado respecto a la proteína nativa, siendo posible estudiarlo casi a temperatura ambiente como demuestra la obtención del espectro de diferencia de M a pH 7 y 15 °C.

En cambio, no se detecta intermediario O y N tampoco parece formarse en el mutante, como demuestran los estudios de FTIR a baja temperatura y la drástica disminución de la intensidad de la banda de BR₅₇₀ en los estudios de fotólisis de destello respecto a la banda del intermediario M.

Todos estos cambios en el fotociclo se revierten en el mutante reducido, permitiendo asignar inequívocamente los resultados observados a la restricción de la flexibilidad de las hélices F y G.

En los espectros de diferencia de FTIR se puede ver como los cambios en las bandas de la amida I típicos de M₂ y N (1650 y 1670 cm⁻¹) son detectables en el mutante reducido pero no en el oxidado. Por tanto, estas bandas parecen estar relacionadas con el movimiento de las hélices.

A pesar de que el mutante oxidado es capaz de transportar protones el transporte es mucho más lento, como se ve en las cinéticas de transporte en muestras fotoexcitadas en presencia de piranina. Asimismo la eficiencia del transporte está reducida a aproximadamente la mitad de la que tiene la BR nativa como demuestran los estudios de transporte de proteína incorporada en liposomas. Por el contrario, el mutante reducido tiene una cinética y una eficiencia de transporte similares a la proteína nativa.

Al dificultar el movimiento de las hélices F y G, por medio de la introducción de un puente disulfuro, la función de la bacteriorodopsina se ve afectada de forma muy importante. El fotociclo se bloquea en M y parece seguir el camino M→BR₅₇₀ y el transporte de protones se vuelve mucho más lento.

Debido a que las hélices no se pueden separar en el mutante E166C/A228Cox la entrada de las moléculas de agua que permitirían disminuir el pK_a del Asp96 (apartado 1.9, figura 1.17) no es posible. De esta manera se bloquea el paso de $M \rightarrow N$ o se dificulta en gran medida. En el mutante podría haber un camino alternativo para la reprotonación de la BS que podría consistir en otro residuo o en las moléculas de agua que están presentes en el estado basal, tras reorganizarse durante el intermediario M.

De la misma forma desaparece el intermediario N' y O donde se da la reprotonación del Asp96 y el retinal se reisomeriza a *todo-trans*. La reisomerización del retinal también está dificultada por la fijación de las hélices y es más lenta, como se ve en la recuperación del estado BR₅₇₀ en fotólisis de destello. El evento que favorece esta reacción de reisomerización es el retorno de las hélices a su posición basal. Como en el mutante oxidado no se da este evento es probable que la reacción de reisomerización en el paso $M \rightarrow BR_{570}$ esté desfavorecida energéticamente. Esto alarga el tiempo de vida media de estas especies y disminuye la eficiencia del fotociclo.

Por último, es probable que se pierda también el mecanismo de cambio de accesibilidad de la proteína desde el lado extracelular al lado citoplasmático, que también es dependiente de la flexibilidad de las hélices. Este mecanismo es básico para que el transporte transcurra de forma eficiente y sea unidireccional. En el mutante E166C/A228Cox podría suceder que la reprotonación se produzca también desde el lado extracelular. Esto explicaría que el transporte neto sea menor que en la proteína nativa.

Por tanto, el movimiento de las hélices F y G es relevante para el correcto funcionamiento de la proteína y es vital para la segunda mitad del fotociclo que transcurre mediante la reacción $M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR_{570}$, apoyando la hipótesis de que las hélices se mueven para facilitar la reprotonación de la BS en N y la reprotonación del Asp96 en N'/O mediante la entrada de moléculas de agua.

5 DISCUSIÓN GENERAL

El aumento de flexibilidad del bucle E-F produce alteraciones estructurales en la bacteriorodopsina como muestra el estudio del mutante Loop5, en donde el bucle nativo de la BR se ha incrementado en 13 aminoácidos.

A nivel estructural la proteína es menos compacta como demuestra la pérdida de la pre-transición en el termograma de DSC que se ha asignado a la relajación y desordenamiento de la estructura paracristalina de la MP. En cambio, al restringir la flexibilidad de las hélices aumenta la entalpía de este proceso como demuestra el termograma del mutante F153C/R175C oxidado en donde la banda de la pre-transición es más intensa. Sin embargo este mutante es menos estable que la proteína nativa debido a que los residuos mutados desestabilizan la proteína como demuestra el estudio de la T_m de desnaturalización mediante espectroscopia UV-Vis del mutante reducido en comparación con el mutante oxidado. El mutante reducido es menos estable que la proteína nativa, por eso, al formarse el puente disulfuro pese a que aumenta la T_m de desnaturalización del mutante no llega a ser tan alta como la de la BR nativa.

En cambio, en el caso de que las hélices que se unan mediante un puente disulfuro sean las hélices F y G la estabilidad de la proteína aumenta como demuestra el termograma del mutante E166C/A228C oxidado, donde la estabilidad de la molécula de BR es mayor que en la proteína nativa y el pico de la transición principal está situado por encima de los 100 °C. Sin embargo, en el mutante reducido la estabilidad es un poco menor que en la proteína nativa, como demuestran los estudios de desnaturalización térmica mediante UV-Vis.

Estos resultados resaltan el papel estructural que tiene la flexibilidad de estas hélices en la compactación de la proteína y de los trímeros de BR para dar lugar a la estructura ordenada de la MP.

Sin embargo, el aumentar o restringir la flexibilidad de las hélices no cambia de forma importante el entorno del retinal y del Asp85 como demuestran los estudios de adaptación luz-oscuridad y los experimentos de titración ácida y alcalina en el mutante Loop5. Solamente en el caso del mutante E166C/A228C oxidado se ve una pequeña disminución del coeficiente de extinción molar de la forma adaptada a la luz. Esta disminución del coeficiente indica un posible cambio en el entorno del retinal al isomerizarse, sugiriendo que para acomodar el retinal isomerizado podría ser necesario una cierta relajación de las hélices, entre las cuales estarían implicadas la F y la G.

En la tabla 5-1 se recogen los cambios estructurales y funcionales más importantes que se dan en los tres mutantes en donde se han introducido alteraciones en la flexibilidad de las hélices E, F y G.

Tabla 5-1. Resumen de los cambios estructurales y funcionales más importantes de los mutantes Loop5, F153C/R175Cox y E166C/A228Cox respecto a la BR nativa.

Mutante	Loop5	F153C/R175Cox	E166C/A228Cox
Movilidad hélices E-F	Alta	Restringida	Normal para E Restringida para F
Movilidad hélices F-G	Alta para F Normal para G	Restringida para F Normal para G	Restringida
Adaptación luz-oscuridad	Normal	Normal	Ligeramente afectada
Estabilidad térmica	Disminuida. Posible pérdida de la ordenación de la MP	Menor, pero con un aumento de la entalpía de desnaturalización de la MP	Mayor que en la proteína nativa
Intermediario M	Cinética acelerada y menor acumulación	Cinética similar a la de la BR nativa	Mayor acumulación y mayor $t_{1/2}$
Intermediario N	Mayor acumulación y mayor $t_{1/2}$	Cinética aparentemente normal pero con cambios estructurales importantes	No se acumula
Intermediario O	No se acumula	Menor acumulación	No se acumula
Mecanismo de <i>switch</i>	Afectado Apertura preferente de la proteína hacia el lado citoplasmático	Aparentemente normal	Afectado Apertura preferente hacia el lado extracelular
Transporte	Muy afectado	Muy afectado	Muy afectado

En el mutante Loop5 el fotociclo está muy alterado siendo la formación del intermediario M mucho más rápida y su acumulación mucho menor.

La BS se protona de forma muy temprana como muestran los estudios de FTIR resuelto en el tiempo, y también aparecen de forma muy temprana las bandas de la amida I que corresponden a los cambios que se producen en las hélices durante el intermediario N. La recuperación del estado basal es mucho más lenta que en la proteína nativa. En definitiva el fotociclo va de N a BR₅₇₀ sin pasar por el intermediario O. Además, al ser M tan rápido es probable que se pierdan algunos de sus subintermediarios. De hecho es durante uno de estos subintermediarios cuando se

produce el cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático y en este mutante parece haberse perdido ese mecanismo.

En cambio, al restringir la flexibilidad de las hélices E-F o F-G el intermediario M se hace más lento que en la proteína nativa, sobre todo en el caso de que el puente disulfuro se introduzca entre las hélices F y G como demuestra el estudio del mutante E166C/A228C, en donde además M tiene un mayor rendimiento.

En el caso del mutante F153C/R175C el intermediario M es sólo un poco más lento que en la proteína nativa, así como también disminuye un poco la acumulación de O, pero el fotociclo en general no está muy afectado en comparación con el mutante reducido. Esto se debe a que los residuos mutados, que en principio no parecían tener ninguna relevancia en el fotociclo de forma directa, influyen el transcurso del mismo de forma indirecta. En este sentido el estudio de los mutantes simples ha permitido caracterizar al residuo F153C como el causante de esta distorsión.

El doble mutante F153C/R175C oxidado, pese a tener un fotociclo más similar al de la proteína nativa que en su forma reducida, muestra un intermediario N alterado en los espectros de FTIR, con una disminución de la intensidad de las bandas de la amida I. Es decir, a pesar de que el fotociclo en el mutante transcurre siguiendo el camino clásico $M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR_{570}$, al contrario de lo que sucede en el mutante Loop5 y E166C/A228Cox, los cambios conformacionales que se producen durante este proceso están afectados por la reducción de la movilidad de las hélices E y F.

Así, el estudio de los espectros de diferencia de FTIR de los tres mutantes nos ha permitido relacionar las bandas de la amida I a $1650(+)$ y $1670(-)$ cm^{-1} , cuyo origen ha sido tema de profundo debate (Hessling et al., 1993), con el movimiento de estas hélices en el intermediario N ya que la secuencia que siguen es la siguiente:

- Loop5 \rightarrow aumento de la flexibilidad del bucle E-F \rightarrow aumento de la intensidad de las bandas.
- F153C/R175Cox \rightarrow disminución de la flexibilidad de las hélices E y F \rightarrow disminución de la intensidad de las bandas.
- E166C/A228Cox \rightarrow disminución de la flexibilidad de las hélices F y G \rightarrow no se forma N y por tanto no hay cambios en estas bandas exceptuando los que se producen en M y que son de menor magnitud.

Lo mismo sucede con la banda a 1186 cm^{-1} , con intensidades inversamente proporcionales. La banda a 1186 se vuelve menos intensa cuanto menos movilidad

tienen las hélices. Esta banda se asigna a la protonación de la BS, así en el mutante Loop5 la BS parece mucho más accesible para ser reprotonada que en el caso del mutante F153C/R175Cox, donde es menos intensa, y del mutante E166C/A228Cox donde no se vuelve positiva en ninguna de las condiciones estudiadas.

Por otro lado el estudio conjunto de los tres mutantes nos ha permitido establecer la relación entre el cambio de accesibilidad de la proteína y apertura de las hélices, con la reacción irreversible $M_1 \rightarrow M_2$ del fotociclo de la BR.

Casi todos los intermediarios del fotociclo pueden tener “backreactions”, es decir, existe un equilibrio entre ellos. Pero en el paso de M_1 a M_2 la reacción es irreversible y lo que hace que sea irreversible es precisamente ese cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático (Luecke et al., 1999a).

Este cambio de accesibilidad consiste en el cambio de orientación de la Arg82 (residuo cargado positivamente) que pasa de formar parte del contraión del Asp85 para interaccionar con la red de aguas que se encuentran en el complejo liberador del protón (Luecke et al., 1999a; Sass et al., 2000), deslocalizadas entre el Glu194/Glu204 (figura 5.1). Este cambio en el entorno del Asp85 incrementa su pK_a favoreciendo su protonación durante el intermediario M, al mismo tiempo que disminuye el pK_a del complejo liberador del protón (PRG) permitiendo así su desprotonación.

La reprotonación de la BR, que sigue el camino $N \rightarrow O \rightarrow BR_{570}$, está facilitada por la apertura de la hélice F y la entrada de varias moléculas de agua en el espacio citoplasmático que cambian en el entorno del Asp96 disminuyendo su pK_a . De esta manera el Asp96 se desprotona y su protón es transferido a la BS mediante la red de moléculas de agua que hay entre ambos residuos y posteriormente es reprotonado a partir del agua que se encuentra en el medio citoplasmático. El mecanismo por el cual tiene lugar esta última reprotonación no se conoce bien (ver apartado 1.6.2).

Debido a que la hélice F se desplaza hacia el exterior de la proteína aparece una cavidad en el entorno del ión guanidinio de la Arg82, cargado positivamente. Esto desestabilizaría la conformación que adopta en el intermediario M_2 , es decir, apuntando hacia el PRG (figura 5.1 estado M_2).

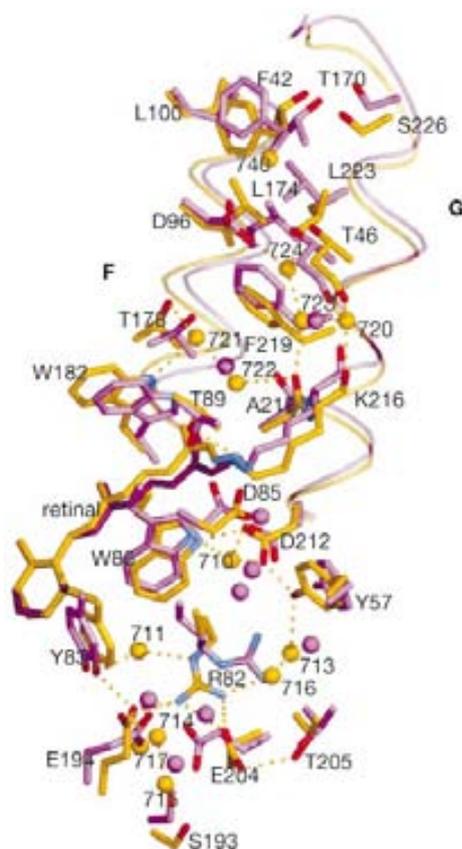


Figura 5.1. Localización de algunos residuos en el estado BR₅₇₀ (color púrpura) y en el intermediario M₂. En la imagen se representan algunos aminoácidos que son funcionalmente relevantes, el retinal, algunas moléculas de agua y el lado citoplasmático de las hélices F y G mostrando las alteraciones más importantes entre ambos estados. La parte superior representa el lado citoplasmático de la BR (Sass et al., 2000).

Esta desestabilización se debe a que la carga negativa del par Glu194/Glu204 se vuelve difusa (Luecke et al., 1999a). El Glu194 se aleja del Glu204, y unos 4 Å de la Arg82.

Es de suponer que en el intermediario O la cavidad que se forma en el entorno de la Arg82, y que es desfavorable energéticamente, sea la fuerza motora que lleve a la Arg82 a recuperar su posición inicial en el estado BR₅₇₀ (Chen et al., 2007). Una vez que esto sucede el Asp85 cede su protón al PRG y la cavidad se elimina mediante el retorno de la hélice F a su posición original.

En el mutante Loop5, debido al aumento de flexibilidad del bucle E-F, se pierde el mecanismo de cambio de accesibilidad de la proteína y ésta se encuentra más accesible al lado citoplasmático durante casi todo el fotociclo, favoreciendo así la acumulación del intermediario N, como demuestran los estudios de FTIR resuelto en el tiempo. Debido a que el intermediario M es más rápido y tiene un menor rendimiento podría suceder que algunos de los cambios estructurales que suceden durante este

intermediario no se den en el mutante. Es probable que el número y la disposición de las moléculas de agua que entran en el espacio citoplasmático sean diferentes respecto de la proteína nativa. La recuperación del estado basal en el mutante podría ser energéticamente más costosa, ya que implica una mayor reorganización estructural. Esto explicaría que la recuperación del estado basal sea más lenta como demuestran los estudios de fotólisis de destello.

Como consecuencia la eficiencia del transporte disminuye, siendo posible que la BS se reprotona antes de que el protón sea expulsado al medio extracelular. Es decir, en el mutante Loop5 el fotociclo sigue un camino ligeramente distinto del que tiene en la BR nativa y que es menos eficiente en relación al tiempo, siendo más largo en el mutante. Asimismo el transporte de protones es también menos eficiente reduciéndose a la mitad del transporte observado en la proteína nativa.

Cuando se bloquean las hélices F y G, que es el caso del mutante E166C/A228C oxidado, el fotociclo se altera pasando de M directamente a BR₅₇₀. Es decir, no es posible seguir el camino M→N→O→BR₅₇₀. Es posible que en este caso la proteína no pueda cambiar su accesibilidad del lado extracelular al citoplasmático, quedando orientada preferentemente hacia el lado extracelular. A pesar de que este mutante aún puede transportar protones, este transporte es mucho menos eficiente. La proteína podría encontrar otro camino para reprotonarse desde el lado citoplasmático, pero este camino alternativo sería mucho más costoso, en términos energéticos, y mucho menos eficiente. También es probable que el mutante, al tener una apertura preferente hacia el lado extracelular, recupere algún protón desde el medio extracelular lo que también provocaría una disminución en el transporte neto de protones.

La reducción del puente disulfuro en el mutante E166C/A228Cred permite recuperar un fotociclo prácticamente normal, salvo por las variaciones provocadas por la doble mutación de la BR, asignando inequívocamente el efecto observado en el mutante oxidado a la reducción de la flexibilidad de las hélices F y G.

Por tanto, estos resultados apoyan la teoría de que la reacción del fotociclo M₁→M₂ es totalmente dependiente de la flexibilidad de las hélices, y la apertura de estas hélices es la que desplaza la reacción hacia N y hace que sea irreversible.

El estudio de los cambios que tienen lugar en los intermediarios y en la función de la proteína en el mutante F153C/R175C es más complejo debido a la alteración que causan las mutaciones a cisteínas por sí mismas. Aún así, la comparación entre el mutante oxidado y el mutante reducido, así como con los mutantes simples ha permitido

determinar que el transporte se encuentra afectado de manera importante al unir las hélices E y F mediante un puente disulfuro y los cambios que se ven en el intermediario N en los espectros de diferencia de FTIR a nivel de la amida I y la BS son menos intensos.

Por otro lado el estudio de los mutantes simples F153C y R175C, y los dobles mutantes F153C/R175C y E166C/A228C ha permitido ver que la sustitución de residuos que se encuentran lejos del camino de transporte del protón puede influir en la reprotonación de la BR. Los residuos que no participan directamente en el transporte del protón, como son el retinal, la BS, el Asp85, el Asp96 y el PRG (grupo expulsor del protón), o los que no son elementos estructurales importantes para facilitar el transporte, como por ejemplo el T90A o el D115A (Peralvarez-Marin et al., 2004; 2007) parecen ser más “pasivos” en la función de la proteína. Pero estos resultados demuestran que pueden influir en la función de la proteína durante el transcurso del fotociclo. En un trabajo anterior se menciona el papel que tienen algunos residuos en la región citoplasmática en la transferencia del protón desde el Asp96 a la BS. Algunos residuos, como la Arg227, disminuyen la energía necesaria para este proceso mediante las interacciones que establecen con el Asp96, mientras que otros residuos, como la Thr46 ejercen un efecto contrario. Ambos efectos son compensatorios y reguladores del proceso de reprotonación de la BS (Brown et al., 1994). Por tanto, en esta zona se formaría un cluster de residuos interaccionando entre sí. Su papel podría ser el de estabilizar algún/os intermediario/s mediante interacciones de tipo polar y de Van der Waals. Sobre todo podrían influir en la entrada y ordenación de la red de aguas que se forma en la cavidad citoplasmática durante el intermediario N.

También cabe la posibilidad de que el residuo mutado no sea directamente el implicado pero su sustitución por otro aminoácido cambie ligeramente la conformación de la hélice en la que se encuentra, haciendo que se pierdan otras interacciones que sí son importantes durante la formación de esos intermediarios que están afectados. En este sentido se han descrito efectos a larga distancia en la proteína causados por una o varias mutaciones puntuales (Tanio et al., 1999a; Coleman et al., 1995; Lanyi et al., 2006).

En cualquier caso, el hecho de que estas mutaciones provoquen cambios en el fotociclo, sobre todo relacionados con la segunda parte del mismo, concuerda con que las hélices E, F y G tienen un papel importante en la reprotonación de la BR, no sólo en

cuanto a su apertura para facilitar la entrada de moléculas de agua, sino probablemente en cuanto a las interacciones nuevas que establecen al desplazarse.

En los mutantes oxidados la función de transporte no se elimina del todo sino que se reduce a la mitad. Esto puede ser debido a dos cosas, o bien se necesita bloquear completamente el movimiento de las hélices E, F y G a la vez para que el transporte quede del todo imposibilitado, o bien la BR puede buscar otro camino alternativo para reprotonarse que no implique un desplazamiento tan grande como el que tiene lugar cuando las hélices son libres.

De hecho existe una teoría sobre la imposibilidad de que los tres monómeros de BR que forman los trímeros en la MP puedan funcionar a la vez debido precisamente a que ese movimiento de las hélices en el lado citoplasmático implica un cambio muy grande para que pueda tener lugar en las tres moléculas del trímero a la vez (Vonck, 2000). Otros trabajos defienden que el transporte observado en una muestra de MP corresponde a un protón por molécula de BR en cada ciclo aproximadamente (Lozier et al., 1976; Grzesiek et al., 1988). El hecho de que al restringir el movimiento de las hélices el transporte pueda tener lugar de todas maneras podría ser debido a que todas las moléculas del trímero actúan en sinergia pero es una o dos de ellas la que en cada ciclo pueda ejercer ese movimiento aumentando así el rendimiento global del transporte. Asimismo explicaría porque en las estructuras cristalográficas de la proteína nativa no se detectan esos movimientos de hélices, que podrían estar impedidos por el entorno en el que están los cristales que es muy distinto del nativo, y sin embargo la proteína es capaz de realizar un fotociclo aparentemente normal cuando se ilumina.

La restricción de movimiento en las hélices F y G produce cambios más drásticos en el fotociclo que la restricción de las hélices E y F. Se ha de tener en cuenta que las hélices E y F están ya unidas por un bucle citoplasmático y que el puente disulfuro no produce un cambio tan importante, respecto a su movilidad, como el que se produce en las hélices F y G que, por el contrario, están unidas por un bucle extracelular. Aún así, basándose en trabajos anteriores (ver apartado 1.9) el movimiento de la parte superior de la hélice E parece más una consecuencia del movimiento de la hélice F, siendo arrastrada por ésta al moverse, que un desplazamiento similar al que se produce en F y G.

Por otro lado, el hecho de que se haya observado este movimiento en la Rodopsina a nivel de la hélice 6, con pequeños movimientos de la hélice 1 y 7 y la secuencia C-terminal, parece indicar que este desplazamiento de las últimas hélices en

el lado citoplasmático forma parte del mecanismo de funcionamiento de la BR y la Rho, y por extensión podría ser importante a nivel de otras GPCRs.

En el caso de la Rho se ha visto que la Pro267, un residuo altamente conservado en la familia de las GPCRs de la misma clase, podría actuar como una “bisagra” en el movimiento de la hélice TM6 inducido por un “*rotamer toggle switch*”.

En la BR existe una Pro homóloga (Pro186) localizada en la hélice F que sería la responsable de este cambio conformacional. De hecho la mutación de esta Pro a Ala afecta de forma importante la estabilidad térmica, el entorno del retinal y la función de la BR, reduciendo la efectividad del transporte al 60 % (Peralvarez-Marin et al., 2008; 2006). Además de la Pro186 en la hélice F existen otras dos prolinas, Pro50 y Pro91 localizadas en la hélice B y C respectivamente, que también parecen tener un papel dinámico en la proteína. Al igual que la Pro186 estos residuos puede que actúen también como bisagras o elementos transmisores de cambios conformacionales de las hélices B y C, permitiendo su movilidad en algún evento del fotociclo.

La hélice G tiene una Pro localizada justo al principio de la hélice, en el extremo extracelular, que podría actuar como “bisagra” en el movimiento de esta hélice durante la reprotonación de la BR.

Además de la Rho, el movimiento de la hélice TM6 se ha propuesto en otros receptores de la familia de GPCRs como por ejemplo el receptor β -adrenérgico (Shi et al., 2002).

El modelo de “*global toggle switch*” ha sido propuesto como un modelo general de activación de receptores que constan de 7 hélices transmembrana, en donde además del movimiento de TM6 en la superficie citoplasmática se produciría el movimiento concertado de otras hélices en el lado extracelular (Rayan et al., 2000).

6 CONCLUSIONES

- 1: La estrategia de introducir un puente disulfuro interhélice en la bacteriorodopsina, que no tiene ninguna cisteína, para restringir el movimiento de las hélice E-F y F-G ha demostrado ser una buena aproximación al estudio del papel de la flexibilidad de las hélices en la función y el fotociclo de la BR. De esta manera el diseño de los mutantes F153C/R175C y E166C/A228C ha permitido unir las hélices E-F y F-G respectivamente.

- 2: La posibilidad de poder tener el puente disulfuro o no en los mutantes doble cisteína mediante el uso del agente oxidante GSSG o el agente reductor DTT permitió ver cómo los efectos causados por la restricción de la movilidad, cuando estaba presente el enlace disulfuro interhélice, se revertían al reducirlo y permitir que las hélices se moviesen de nuevo. De esta manera se han podido asignar inequívocamente los cambios observados en los mutantes oxidados a la existencia del puente disulfuro, y por tanto, a la restricción de la movilidad interhélice.

- 3: El cambio de flexibilidad de las hélices E, F y G influye de forma importante en la compactación de la membrana púrpura como muestran los resultados de DSC para el mutante Loop5 y los mutantes doble cisteína. En el primer caso, en donde la flexibilidad y el volumen del bucle E-F es mayor que en la proteína nativa, se pierde el pico de la pre-transición relacionado con la estructura hexagonal ordenada de la MP. En el caso de los mutantes doble cisteína este proceso muestra una mayor entalpía cuando los mutantes están formando un puente disulfuro. Para el mutante E166C/A228Cox la estabilidad de la proteína es mayor incluso que en la BR nativa como demuestra la banda de la transición principal en el termograma situada por encima de los 100 °C.

- 4: Al aumentar la flexibilidad del bucle E-F en la bacteriorodopsina la segunda parte del fotociclo cambia su secuencia de $M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR_{570}$ a $M/N \rightarrow BR_{570}$ como demuestra el estudio del mutante Loop5. Se pierde el mecanismo de cambio de accesibilidad o “switch” entre el lado extracelular y el lado citoplasmático ya que la proteína tiene una apertura preferente hacia el lado citoplasmático. Como consecuencia el transporte se ve afectado de forma importante reduciéndose a la mitad.
- 5: En cambio, la restricción de la flexibilidad de las hélices F-G hace que M sea el intermediario favorecido, en detrimento de N que no puede formarse debido a que necesita de la apertura de esas hélices, como se ve en el estudio del fotociclo mediante espectroscopia en el visible y estudios de FTIR del mutante E166C/A228C en su estado oxidado.
- 6: El estudio del mutante F153C/R175C ha resultado ser más complejo debido a la influencia de las mutaciones en el fotociclo, pero ha permitido demostrar que la restricción de la flexibilidad de las hélices E y F afecta también de forma importante al transporte, y al igual que sucede cuando se restringe el movimiento de las hélices F y G, su efectividad se ve reducida a aproximadamente la mitad de la efectividad del transporte en la BR nativa. La función de transporte se recupera casi totalmente al reducir el puente disulfuro en los mutantes y permitir el movimiento de las hélices.
- 7: A partir de los resultados anteriores se puede decir que el movimiento de las hélices F y G y la flexibilidad del bucle E-F son necesarios para la reacción unidireccional del fotociclo $M_1 \rightarrow M_2/N$, haciendo que sea irreversible gracias a un cambio de accesibilidad de la proteína del lado extracelular al lado citoplasmático, regulado por la flexibilidad de esas hélices.
- 8: La flexibilidad de las hélices E, F y G es también relevante para el proceso de reprotonación de la BS y reisomerización de retinal al final del fotociclo, influyendo de manera muy importante en la efectividad de la función de la BR.

-
- 9: El estudio de los mutantes simples F153C, R175C y del doble mutante F153C/R175C ha revelado la implicación en el transporte de residuos que se encuentran distantes del camino que recorre el protón dentro de la proteína. La sustitución de la Phe153 por una Cys hace que el fotociclo sea más lento y que la acumulación de los intermediarios N y O esté menos favorecida, es decir, afecta a la reprotonación de la BR. Esto podría deberse a interacciones entre residuos localizados en la cavidad citoplasmática con la red de aguas que se forma durante la reprotonación de la BR.
- 10: El hecho de que tanto en la Rho como en la BR se produzca un desplazamiento de la hélice TM6 durante su función, así como otros desplazamientos más pequeños en otras hélices, sugiere un papel relevante de la movilidad de esas hélices en la función de las GPCRs.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdulaev, N. G., T. T. Strassmaier, T. Ngo, R. Chen, H. Luecke, D. D. Oprian and K. D. Ridge (2002). "Grafting segments from the extracellular surface of CCR5 onto a bacteriorhodopsin transmembrane scaffold confers HIV-1 coreceptor activity." *Structure (Camb)* **10**(4): 515-25.
- Ames, J. B. and R. A. Mathies (1990). "The role of back-reactions and proton uptake during the N⁺→O transition in bacteriorhodopsin's photocycle: a kinetic resonance Raman study." *Biochemistry* **29**(31): 7181-90.
- Balashov, S. P. (2000). "Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin." *Biochim Biophys Acta* **1460**(1): 75-94.
- Balashov, S. P., R. Govindjee and T. G. Ebrey (1991). "Red shift of the Purple Membrane absorption and the deprotonation of tyrosine residues at high pH." *Biophys J* **60**: 475-490.
- Balashov, S. P., R. Govindjee, E. S. Imasheva, S. Misra, T. G. Ebrey, Y. Feng, R. K. Crouch and D. R. Menick (1995). "The two pKa's of aspartate-85 and control of thermal isomerization and proton release in the arginine-82 to lysine mutant of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **34**(27): 8820-34.
- Balashov, S. P., R. Govindjee, M. Kono, E. Imasheva, E. Lukashev, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick and Y. Feng (1993). "Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle." *Biochemistry* **32**(39): 10331-43.
- Balashov, S. P., E. S. Imasheva, R. Govindjee and T. G. Ebrey (1996). "Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release." *Biophys J* **70**(1): 473-81.
- Belrhali, H., P. Nollert, A. Royant, C. Menzel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau and E. Pebay-Peyroula (1999). "Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution." *Structure Fold Des* **7**(8): 909-17.
- Bernado, P., R. Barbieri, E. Padros, C. Luchinat and M. Pons (2002). "Lanthanide modulation of the orientation of macromolecules induced by purple membrane." *J Am Chem Soc* **124**(3): 374-5.
- Birge, R. R. (1995). "Ordenadores de base proteómica." *Mayo*: 60-65.
- Birge, R. R., N. B. Gillespie, E. W. Izaguirre, A. Kusnetzow, A. F. Lawrence, D. Singh, Q. W. Song, E. Schimdt, J. A. Stuart, S. Seetharaman and K. J. Wise (1999). "Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memories." *J Phys Chem B* **103**: 10746-10766.
- Blaurock, A. E. and W. Stoeckenius (1971). "Structure of the purple membrane." *Nat New Biol* **233**(39): 152-5.
- Bousche, O., M. Braiman, Y. W. He, T. Marti, H. G. Khorana and K. J. Rothschild (1991). "Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants. Evidence that ASP-96 deprotonates during the M⁺→N transition." *J Biol Chem* **266**(17): 11063-7.
- Bousche, O., S. Sonar, M. P. Krebs, H. G. Khorana and K. J. Rothschild (1992). "Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the bacteriorhodopsin mutant Tyr-185→Phe: Asp-96 reprotonates during O formation; Asp-85 and Asp-212 deprotonate during O decay." *Photochem Photobiol* **56**(6): 1085-95.
- Braiman, M. S., P. L. Ahl and K. J. Rothschild (1987). "Millisecond Fourier-transform infrared difference spectra of bacteriorhodopsin's M412 photoproduct." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(15): 5221-5.

- Braiman, M. S., O. Bousche and K. J. Rothschild (1991). "Protein dynamics in the bacteriorhodopsin photocycle: submillisecond Fourier transform infrared spectra of the L, M, and N photointermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2388-92.
- Braiman, M. S., T. Mogi, T. Marti, L. J. Stern, H. G. Khorana and K. J. Rothschild (1988). "Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212." *Biochemistry* **27**(23): 8516-20.
- Brouillette, C. G., D. D. Muccio and T. K. Finney (1987). "pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding." *Biochemistry* **26**(23): 7431-8.
- Brown, L. S., A. K. Dioumaev, R. Needleman and J. K. Lanyi (1998). "Local-access model for proton transfer in bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **37**(11): 3982-93.
- Brown, L. S., R. Needleman and J. K. Lanyi (1999). "Functional roles of aspartic acid residues at the cytoplasmic surface of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **38**(21): 6855-61.
- Brown, L. S., R. Needleman and J. K. Lanyi (2002). "Conformational change of the E-F interhelical loop in the M photointermediate of bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **317**(3): 471-8.
- Brown, L. S., J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman and J. K. Lanyi (1995). "Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin." *J Biol Chem* **270**(45): 27122-6.
- Brown, L. S., Y. Yamazaki, A. Maeda, L. Sun, R. Needleman and J. K. Lanyi (1994). "The proton transfers in the cytoplasmic domain of bacteriorhodopsin are facilitated by a cluster of interacting residues." *J Mol Biol* **239**(3): 401-14.
- Butt, H. J., E. Bamberg and D. Oesterhelt (1989). "Absorption- and photocurrent-measurements of two aspartat mutants of bacteriorhodopsin." *J Protein Chem* **8**(3): 347-9.
- Cao, Y., G. Varo, M. Chang, B. F. Ni, R. Needleman and J. K. Lanyi (1991). "Water is required for proton transfer from aspartate-96 to the bacteriorhodopsin Schiff base." *Biochemistry* **30**(45): 10972-9.
- Cladera, J., M. L. Galisteo, M. Sabes, P. L. Mateo and E. Padros (1992). "The role of retinal in the thermal stability of the purple membrane." *Eur J Biochem* **207**(2): 581-5.
- Cladera, J., J. Torres and E. Padros (1996). "Analysis of conformational changes in bacteriorhodopsin upon retinal removal." *Biophys J* **70**(6): 2882-7.
- Coleman, M., A. Nilsson, T. S. Russell, P. Rath, R. Pandey and K. J. Rothschild (1995). "Asp 46 can substitute Asp 96 as the Schiff base proton donor in bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **34**(47): 15599-606.
- Chen, D., J. M. Wang and J. K. Lanyi (2007). "Electron paramagnetic resonance study of structural changes in the O photointermediate of bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **366**(3): 790-805.
- Dassarma, S., U. L. Rajbhandary and H. G. Khorana (1984). "Bacterio-opsin mRNA in wild-type and bacterio-opsin-deficient *Halobacterium halobium* strains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(1): 125-129.
- de Groot, B. L., J. B. Heymann, A. Engel, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi and H. Grubmuller (2000). "The fold of human aquaporin 1." *J Mol Biol* **300**(4): 987-94.
- Dencher, N. A., D. Dresselhaus, G. Zaccai and G. Buldt (1989). "Structural changes in bacteriorhodopsin during proton translocation revealed by neutron diffraction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20): 7876-9.

- Dencher, N. A. and M. P. Heyn (1979). "Bacteriorhodopsin monomers pump protons." *FEBS Lett* **108**(2): 307-10.
- Dioumaev, A. K., L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi (1999). "Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212." *Biochemistry* **38**(31): 10070-8.
- Dioumaev, A. K., L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi (2001). "Coupling of the reisomerization of the retinal, proton uptake, and reprotonation of Asp-96 in the N photointermediate of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **40**(38): 11308-17.
- Dioumaev, A. K., H. T. Richter, L. S. Brown, M. Tanio, S. Tuzi, H. Saito, Y. Kimura, R. Needleman and J. K. Lanyi (1998). "Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface." *Biochemistry* **37**(8): 2496-506.
- Dollinger, G., L. Eisenstein, S. L. Lin, K. Nakanishi, K. Odashima and J. Termini (1986). "Bacteriorhodopsin: fourier transform infrared methods for studies of protonation of carboxyl groups." *Methods Enzymol* **127**: 649-62.
- Drachev, L. A., A. A. Jasaitis, A. D. Kaulen, A. A. Kondrashin, E. A. Liberman, I. B. Nemecek, S. A. Ostroumov, A. Semenov and V. P. Skulachev (1974). "Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin." *Nature* **249**(455): 321-4.
- Druckmann, S., M. Ottolenghi, A. Pande, J. Pande and R. H. Callender (1982). "Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **21**(20): 4953-9.
- Dunn, R., J. McCoy, M. Simsek, A. Majumdar, S. H. Chang, U. L. Rajbhandary and H. G. Khorana (1981). "The bacteriorhodopsin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 6744-8.
- Earnest, T. N., P. Roepe, M. S. Braiman, J. Gillespie and K. J. Rothschild (1986). "Orientation of the bacteriorhodopsin chromophore probed by polarized Fourier transform infrared difference spectroscopy." *Biochemistry* **25**(24): 7793-8.
- Ebrey, T. G., B. Becher, B. Mao, P. Kilbride and B. Honig (1977). "Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane." *J Mol Biol* **112**(3): 377-97.
- Edman, K., P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze and E. M. Landau (1999). "High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle." *Nature* **401**(6755): 822-6.
- Ferrando, E., U. Schweiger and D. Oesterhelt (1993). "Homologous bacterio-opsin-encoding gene expression via site-specific vector integration." *Gene* **125**(1): 41-7.
- Fischer, W. B., S. Sonar, T. Marti, H. G. Khorana and K. J. Rothschild (1994). "Detection of a water molecule in the active-site of bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction." *Biochemistry* **33**(43): 12757-62.
- Fodor, S. P., J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg and R. A. Mathies (1988). "Chromophore structure in bacteriorhodopsin's N intermediate: implications for the proton-pumping mechanism." *Biochemistry* **27**(18): 7097-101.
- Friedman, N., Y. Gat, M. Sheves and M. Ottolenghi (1994). "On the heterogeneity of the M population in the photocycle of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **33**(49): 14758-67.

- Fujiyoshi, Y. (1999). "Molecular structure of proton pump revealed with electron crystallography." *Faseb J* **13 Suppl 2**: S191-4.
- Garczarek, F., L. S. Brown, J. K. Lanyi and K. Gerwert (2005). "Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3633-8.
- Garczarek, F. and K. Gerwert (2006). "Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy." *Nature* **439**(7072): 109-12.
- Geiser, A. H., M. K. Sievert, L. W. Guo, J. E. Grant, M. P. Krebs, D. Fotiadis, A. Engel and A. E. Ruoho (2006). "Bacteriorhodopsin chimeras containing the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin activate transducin for GTP/GDP exchange." *Protein Sci* **15**(7): 1679-90.
- Gennis, R. B. and T. G. Ebrey (1999). "Proton pump caught in the act." *Science* **286**(5438): 252-3.
- Govindjee, R., E. S. Imasheva, S. Misra, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, N. Chen, D. R. Menick and R. K. Crouch (1997). "Mutation of a surface residue, lysine-129, reverses the order of proton release and uptake in bacteriorhodopsin; guanidine hydrochloride restores it." *Biophys J* **72**(2 Pt 1): 886-98.
- Govindjee, R., S. Misra, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, R. K. Crouch and D. R. Menick (1996). "Arginine-82 regulates the pKa of the group responsible for the light-driven proton release in bacteriorhodopsin." *Biophys J* **71**(2): 1011-23.
- Grigorieff, N., T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson (1996). "Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **259**(3): 393-421.
- Grudinin, S., G. Buldt, V. Gordeliy and A. Baumgaertner (2005). "Water molecules and hydrogen-bonded networks in bacteriorhodopsin--molecular dynamics simulations of the ground state and the M-intermediate." *Biophys J* **88**(5): 3252-61.
- Grzesiek, S. and N. A. Dencher (1988). "Monomeric and aggregated bacteriorhodopsin: Single-turnover proton transport stoichiometry and photochemistry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9509-9513.
- Hampp, N. (2000). "Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories." *Chem Rev* **100**(5): 1755-1776.
- Hampp, N., C. Bräuchle and D. Oesterhelt (1990). "Bacteriorhodopsin wild type and variant aspartate-96 --> asparagine as reversible holographic media." *Biophys. J.* **58**: 83-93.
- Haupts, U., J. Tittor and D. Oesterhelt (1999). "Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 367-99.
- Hayashi, S., E. Tajkhorshid and K. Schulten (2002). "Structural changes during the formation of early intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biophys J* **83**(3): 1281-97.
- Henderson, R. (1975). "The structure of the purple membrane from Halobacterium halobium: analysis of the X-ray diffraction pattern." *J Mol Biol* **93**(2): 123-38.
- Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing (1990). "Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy." *J Mol Biol* **213**(4): 899-929.
- Henderson, R. and P. N. Unwin (1975). "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy." *Nature* **257**(5521): 28-32.
- Hendler, R. W. and S. Dracheva (2001). "Importance of lipids for bacteriorhodopsin structure, photocycle, and function." *Biochemistry (Mosc)* **66**(11): 1311-4.

- Hessling, B., J. Herbst, R. Rammelsberg and K. Gerwert (1997). "Fourier transform infrared double-flash experiments resolve bacteriorhodopsin's M1 to M2 transition." *Biophys J* **73**(4): 2071-80.
- Hessling, B., G. Souvignier and K. Gerwert (1993). "A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsin's intramolecular reactions to photocycle intermediates." *Biophys J* **65**(5): 1929-41.
- Heymann, J. B., M. Pfeiffer, V. Hildebrandt, H. R. Kaback, D. Fotiadis, B. Groot, A. Engel, D. Oesterhelt and D. J. Muller (2000). "Conformations of the rhodopsin third cytoplasmic loop grafted onto bacteriorhodopsin." *Structure Fold Des* **8**(6): 643-53.
- Heyn, M. P., B. Borucki and H. Otto (2000). "Chromophore reorientation during the photocycle of bacteriorhodopsin: experimental methods and functional significance." *Biochim Biophys Acta* **1460**(1): 60-74.
- Heyn, M. P., R. J. Cherry and U. Muller (1977). "Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore." *J Mol Biol* **117**(3): 607-20.
- Hirai, T. and S. Subramaniam (2003). "Structural insights into the mechanism of proton pumping by bacteriorhodopsin." *FEBS Lett* **545**(1): 2-8.
- Hoflack, J., S. Trumpp-Kallmeyer and M. Hibert (1994). "Re-evaluation of bacteriorhodopsin as a model for G protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* **15**(1): 7-9.
- Holz, M., L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. P. Skulachev and H. G. Khorana (1989). "Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7): 2167-71.
- Ihara, K., T. Umemura, I. Katagiri, T. Kitajima-Ihara, Y. Sugiyama, Y. Kimura and Y. Mukohata (1999). "Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation." *J Mol Biol* **285**(1): 163-74.
- Jackson, M. B. and J. M. Sturtevant (1978). "Phase transitions of the purple membranes of *Halobacterium halobium*." *Biochemistry* **17**(5): 911-5.
- Juncosa, M., Pons, J., Planas, A. and Querol, E. (1994). "Improved efficiency in site-directed mutagenesis by PCR using *Pyrococcus* sp GB-D polymerase." *Biotechniques* **16**: 820-821.
- Kamikubo, H., M. Kataoka, G. Varo, T. Oka, F. Tokunaga, R. Needleman and J. K. Lanyi (1996). "Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1386-90.
- Kamikubo, H., T. Oka, Y. Imamoto, F. Tokunaga, J. K. Lanyi and M. Kataoka (1997). "The last phase of the reprotonation switch in bacteriorhodopsin: the transition between the M-type and the N-type protein conformation depends on hydration." *Biochemistry* **36**(40): 12282-7.
- Kates, M. (1988). "Structure, physical properties, and function of archaeobacterial lipids." *Prog Clin Biol Res* **282**: 357-84.
- Kayushin, L. P. and V. P. Skulachev (1974). "Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH." *FEBS Lett* **39**(1): 39-42.
- Kimura, Y., D. G. Vassylyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai and Y. Fujiyoshi (1997). "Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography." *Nature* **389**(6647): 206-11.

- Koch, M. H., N. A. Dencher, D. Oesterhelt, H. J. Plohn, G. Rapp and G. Buldt (1991). "Time-resolved X-ray diffraction study of structural changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin." *Embo J* **10**(3): 521-6.
- Kolbe, M., H. Besir, L. O. Essen and D. Oesterhelt (2000). "Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution." *Science* **288**(5470): 1390-6.
- Kotting, C. and K. Gerwert (2005). "Proteins in action monitored by time-resolved FTIR spectroscopy." *Chemphyschem* **6**(5): 881-8.
- Krimm, S. and A. M. Dwivedi (1982). "Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism?" *Science* **216**(4544): 407-8.
- Kuhn, M., H. Janovjak, M. Hubain and D. J. Muller (2005). "Automated alignment and pattern recognition of single-molecule force spectroscopy data." *J Microsc* **218**(Pt 2): 125-32.
- Kushwaha, S. C., M. Kates and W. G. Martin (1975). "Characterization and composition of the purple and red membrane from *Halobacterium cutirubrum*." *Can J Biochem* **53**(3): 284-92.
- Kusnetzow, A., D. L. Singh, C. H. Martin, I. J. Barani and R. R. Birge (1999). "Nature of the chromophore binding site of bacteriorhodopsin: the potential role of Arg82 as a principal counterion." *Biophys J* **76**(5): 2370-89.
- Laemmli, U. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Landt, O., H. P. Grunert and U. Hahn (1990). "A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction." *Gene* **96**(1): 125-8.
- Lanyi, J. and B. Schobert (2002). "Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the Schiff base: the switch in the bacteriorhodopsin photocycle." *J Mol Biol* **321**(4): 727-37.
- Lanyi, J. K. (1979). "The role of Na⁺ in transport processes of bacterial membranes." *Biochim Biophys Acta* **559**(4): 377-97.
- Lanyi, J. K. (1999). "Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, bacteriorhodopsin." *FEBS Lett* **464**(3): 103-7.
- Lanyi, J. K. (2004). "Bacteriorhodopsin." *Annu Rev Physiol* **66**: 665-88.
- Lanyi, J. K. and A. Pohorille (2001). "Proton pumps: mechanism of action and applications." *Trends Biotechnol* **19**(4): 140-4.
- Lanyi, J. K. and B. Schobert (2006). "Propagating structural perturbation inside bacteriorhodopsin: crystal structures of the M state and the D96A and T46V mutants." *Biochemistry* **45**(39): 12003-10.
- Lazarova, T. and E. Padros (1996). "Helical and reverse turn changes in the BR- \rightarrow N transition of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **35**(25): 8354-8.
- Lazarova, T., C. Sanz, E. Querol and E. Padros (2000). "Fourier transform infrared evidence for early deprotonation of Asp(85) at alkaline pH in the photocycle of bacteriorhodopsin mutants containing E194Q." *Biophys J* **78**(4): 2022-30.
- Lazarova, T., C. Sanz, F. Sepulcre, E. Querol and E. Padros (2002). "Specific effects of chloride on the photocycle of E194Q and E204Q mutants of bacteriorhodopsin as measured by FTIR spectroscopy." *Biochemistry* **41**(25): 8176-83.
- Le Coutre, J., J. Tittor, D. Oesterhelt and K. Gerwert (1995). "Experimental evidence for hydrogen-bonded network proton transfer in bacteriorhodopsin shown by Fourier-transform infrared spectroscopy using azide as catalyst." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4962-6.
- Lewis, A., J. Spoonhower, R. A. Bogomolni, R. H. Lozier and W. Stoerkenius (1974). "Tunable laser resonance raman spectroscopy of bacteriorhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(11): 4462-6.

- Lorenz-Fonfria, V. A., Y. Furutani and H. Kandori (2008). "Active internal waters in the bacteriorhodopsin photocycle. A comparative study of the L and M intermediates at room and cryogenic temperatures by infrared spectroscopy." *Biochemistry* **47**(13): 4071-81.
- Lozier, R. H., R. A. Bogomolni and W. Stoeckenius (1975). "Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in Halobacterium Halobium." *Biophys J* **15**(9): 955-62.
- Lozier, R. H., W. Niederberger, R. A. Bogomolni, S. Hwang and W. Stoeckenius (1976). "Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, Halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane." *Biochim Biophys Acta* **440**(3): 545-56.
- Ludlam, G. J. and K. J. Rothschild (1997). "Similarity of bacteriorhodopsin structural changes triggered by chromophore removal and light-driven proton transport." *FEBS Lett* **407**(3): 285-8.
- Luecke, H., H. T. Richter and J. K. Lanyi (1998). "Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution." *Science* **280**(5371): 1934-7.
- Luecke, H., B. Schobert, J. P. Cartailler, H. T. Richter, A. Rosengarth, R. Needleman and J. K. Lanyi (2000). "Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **300**(5): 1237-55.
- Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler and J. K. Lanyi (1999a). "Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution." *Science* **286**(5438): 255-61.
- Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler and J. K. Lanyi (1999b). "Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution." *J Mol Biol* **291**(4): 899-911.
- Maeda, A., J. Sasaki, Y. Shichida, T. Yoshizawa, M. Chang, B. Ni, R. Needleman and J. K. Lanyi (1992). "Structures of aspartic acid-96 in the L and N intermediates of bacteriorhodopsin: analysis by Fourier transform infrared spectroscopy." *Biochemistry* **31**(19): 4684-90.
- Mateo, P., Baron, C., Lopez-Mayorga, O., Jimenez, JS, Cortijo, M (1984). "AMP and IMP binding to glycogen phosphorylase b. A calorimetric and equilibrium dialysis study." *J Biol Chem* **259**(15): 9384-9.
- Mathies, R. A., S. W. Lin, J. B. Ames and W. T. Pollard (1991). "From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**: 491-518.
- Mendelsohn, R. (1976). "Thermal denaturation and photochemistry of bacteriorhodopsin from Halobacterium cutirubrum as monitored by resonance Raman spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* **427**(1): 295-301.
- Metz, G., F. Siebert and M. Engelhard (1992). "Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. A solid-state ¹³C CP-MAS NMR investigation." *FEBS Lett* **303**(2-3): 237-41.
- Mitsuoka, K., T. Hirai, K. Murata, A. Miyazawa, A. Kidera, Y. Kimura and Y. Fujiyoshi (1999). "The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution." *J Mol Biol* **286**(3): 861-82.
- Mowery, P. C., R. H. Lozier, Q. Chae, Y. W. Tseng, M. Taylor and W. Stoeckenius (1979). "Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **18**(19): 4100-7.

- Muccio, D. D. and J. Y. Cassim (1979). "Interpretations of the effects of pH on the spectra of purple membrane." *J Mol Biol* **135**(3): 595-609.
- Neumuller, M. and F. Jahnig (1996). "Modeling of halorhodopsin and rhodopsin based on bacteriorhodopsin." *Proteins* **26**(2): 146-56.
- Ni, B. F., M. Chang, A. Duschl, J. Lanyi and R. Needleman (1990). "An efficient system for the synthesis of bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium*." *Gene* **90**(1): 169-72.
- Oesterhelt, D. (1976). "Bacteriorhodopsin as a light-driven ion exchanger?" *FEBS Lett* **64**(1): 20-2.
- Oesterhelt, D. (1998). "The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea." *Curr Opin Struct Biol* **8**(4): 489-500.
- Oesterhelt, D., and W., Stoeckenius (1974). "Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into Red and Purple Membrane." *Methods in Enzymology* **31**: 667-678.
- Oesterhelt, D., M. Meentzen and L. Schuhmann (1973). "Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores." *Eur J Biochem* **40**(2): 453-63.
- Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1971). "Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*." *Nat New Biol* **233**(39): 149-52.
- Ohno, K., Y. Takeuchi and M. Yoshida (1977). "Effect of light-adaptation on the photoreaction of bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*." *Biochim Biophys Acta* **462**(3): 575-82.
- Oka, T., N. Yagi, T. Fujisawa, H. Kamikubo, F. Tokunaga and M. Kataoka (2000). "Time-resolved x-ray diffraction reveals multiple conformations in the M-N transition of the bacteriorhodopsin photocycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14278-82.
- Oka, T., N. Yagi, F. Tokunaga and M. Kataoka (2002). "Time-resolved X-ray diffraction reveals movement of F helix of D96N bacteriorhodopsin during M-MN transition at neutral pH." *Biophys J* **82**(5): 2610-6.
- Ormos, P., K. Chu and J. Mourant (1992). "Infrared study of the L, M, and N intermediates of bacteriorhodopsin using the photoreaction of M." *Biochemistry* **31**(30): 6933-7.
- Otto, H., T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana and M. P. Heyn (1989). "Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9228-32.
- Ovchinnikov, Y. A., N. G. Abdulaev, M. Y. Feigina, A. V. Kiselev and N. A. Lobanov (1979). "The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview." *FEBS Lett* **100**(2): 219-24.
- Padros, E., C. Sanz, T. Lazarova, M. Márquez, F. Sepulcre, X. Trapote, F. X. Muñoz, R. Gonzalez-Moreno, J. L. Bourdelande and E. Querol (2001). Extracellular mutants of Bacteriorhodopsin as possible materials for bioelectronic applications. Bioelectronic applications of photochromic pigments NATO Science Series. **335**: 120-136.
- Papadopoulos, G., N. A. Dencher, G. Zaccai and G. Buldt (1990). "Water molecules and exchangeable hydrogen ions at the active centre of bacteriorhodopsin localized by neutron diffraction. Elements of the proton pathway?" *J Mol Biol* **214**(1): 15-9.
- Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, J. P. Rosenbusch and E. M. Landau (1997). "X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases." *Science* **277**(5332): 1676-81.

- Peck, R. F., C. Echavarri-Erasun, E. A. Johnson, W. V. Ng, S. P. Kennedy, L. Hood, S. DasSarma and M. P. Krebs (2001). "brp and blh are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*." *J Biol Chem* **276**(8): 5739-44.
- Peralvarez-Marín, A., J. L. Bourdelande, E. Querol and E. Padros (2006). "The role of proline residues in the dynamics of transmembrane helices: the case of bacteriorhodopsin." *Mol Membr Biol* **23**(2): 127-35.
- Peralvarez-Marín, A., V. A. Lorenz-Fonfria, J. L. Bourdelande, E. Querol, H. Kandori and E. Padros (2007). "Inter-helical hydrogen bonds are essential elements for intra-protein signal transduction: the role of Asp115 in bacteriorhodopsin transport function." *J Mol Biol* **368**(3): 666-76.
- Peralvarez-Marín, A., V. A. Lorenz-Fonfria, R. Simon-Vazquez, M. Gomariz, I. Meseguer, E. Querol and E. Padros (2008). "Influence of proline on the thermostability of the active site and membrane arrangement of transmembrane proteins." *Biophys J*.
- Peralvarez-Marín, A., M. Marquez, J. L. Bourdelande, E. Querol and E. Padros (2004). "Thr-90 plays a vital role in the structure and function of bacteriorhodopsin." *J Biol Chem* **279**(16): 16403-9.
- Pfeifer, F., J. Friedman, H. W. Boyer and M. Betlach (1984). "Characterization of insertions affecting the expression of the bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium*." *Nucleic Acids Res* **12**(5): 2489-97.
- Pohorille, A. and D. Deamer (2002). "Artificial cells: prospects for biotechnology." *Trends Biotechnol* **20**: 123-128.
- Radionov, A. N. and A. D. Kaulen (1996). "Two bacteriorhodopsin M intermediates differing in accessibility of the Schiff base for azide." *FEBS Lett* **387**(2-3): 122-6.
- Radionov, A. N. and A. D. Kaulen (1997). "Inhibition of the M1 \rightarrow M2 (M(closed) \rightarrow M(open)) transition in the D96N mutant photocycle and its relation to the corresponding transition in wild-type bacteriorhodopsin." *FEBS Lett* **409**(2): 137-40.
- Radzwill, N., K. Gerwert and H. J. Steinhoff (2001). "Time-resolved detection of transient movement of helices F and G in doubly spin-labeled bacteriorhodopsin." *Biophys J* **80**(6): 2856-66.
- Rammelsberg, R., G. Huhn, M. Lubben and K. Gerwert (1998). "Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network." *Biochemistry* **37**(14): 5001-9.
- Rayan, A., N. Siew, S. Chernov-Schwartz, Y. Matzner, W. Bautsch and A. Goldblum (2000). "A novel computational method for predicting the transmembrane structure of G-protein coupled receptors: application to human C5aR and C3aR." *Receptors Channels* **7**(2): 121-37.
- Rehorek, M. and M. P. Heyn (1979). "Binding of all-trans-retinal to the purple membrane. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient." *Biochemistry* **18**(22): 4977-83.
- Richter, H. T., L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi (1996). "A linkage of the pKa's of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **35**(13): 4054-62.
- Riek, R. P., I. Rigoutsos, J. Novotny and R. M. Graham (2001). "Non-alpha-helical elements modulate polytopic membrane protein architecture." *J Mol Biol* **306**(2): 349-62.

- Riesle, J., D. Oesterhelt, N. A. Dencher and J. Heberle (1996). "D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **35**(21): 6635-43.
- Rothschild, K. J. (1992). "FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model." *J Bioenerg Biomembr* **24**(2): 147-67.
- Rothschild, K. J. and N. A. Clark (1979). "Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane." *Biophys J* **25**(3): 473-87.
- Rothschild, K. J., T. Marti, S. Sonar, Y. W. He, P. Rath, W. Fischer and H. G. Khorana (1993). "Asp96 deprotonation and transmembrane alpha-helical structural changes in bacteriorhodopsin." *J Biol Chem* **268**(36): 27046-52.
- Rouhani, S., J. P. Cartailier, M. T. Facciotti, P. Walian, R. Needleman, J. K. Lanyi, R. M. Glaeser and H. Luecke (2001). "Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: model of an O-like photocycle intermediate." *J Mol Biol* **313**(3): 615-28.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and M. T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanz, C., T. Lazarova, F. Sepulcre, R. Gonzalez-Moreno, J. L. Bourdelande, E. Querol and E. Padros (1999). "Opening the Schiff base moiety of bacteriorhodopsin by mutation of the four extracellular Glu side chains." *FEBS Lett* **456**(1): 191-5.
- Sass, H. J., G. Buldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen and P. Ormos (2000). "Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin." *Nature* **406**(6796): 649-53.
- Schafmeister, C. E., L. J. Miercke and R. M. Stroud (1993). "Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins." *Science* **262**(5134): 734-8.
- Scherrer, P., M. K. Mathew, W. Sperling and W. Stoeckenius (1989). "Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers." *Biochemistry* **28**(2): 829-34.
- Scheuring, S., D. J. Muller, H. Stahlberg, H. A. Engel and A. Engel (2002). "Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM." *Eur Biophys J* **31**(3): 172-8.
- Schobert, B., L. S. Brown and J. K. Lanyi (2003). "Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp-96 and the retinal Schiff base." *J Mol Biol* **330**(3): 553-70.
- Schobert, B., J. Cupp-Vickery, V. Hornak, S. Smith and J. Lanyi (2002). "Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal." *J Mol Biol* **321**(4): 715-26.
- Seiff, F., I. Wallat, P. Ermann and M. P. Heyn (1985). "A neutron diffraction study on the location of the polyene chain of retinal in bacteriorhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(10): 3227-31.
- Shi, L., G. Liapakis, R. Xu, F. Guarnieri, J. A. Ballesteros and J. A. Javitch (2002). "Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch." *J Biol Chem* **277**(43): 40989-96.
- Siebert, F. and W. Mantele (1983). "Investigation of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin by low-temperature Fourier-transform infrared spectroscopy." *Eur J Biochem* **130**(3): 565-73.

- Smith, S. O., A. B. Myers, R. A. Mathies, J. A. Pardo, C. Winkel, E. M. van den Berg and J. Lugtenburg (1985). "Vibrational analysis of the all-trans retinal protonated Schiff base." *Biophys J* **47**(5): 653-64.
- Spassov, V. Z., H. Luecke, K. Gerwert and D. Bashford (2001). "pK(a) Calculations suggest storage of an excess proton in a hydrogen-bonded water network in bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **312**(1): 203-19.
- Spudich, J. L. (1994). "Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor." *Cell* **79**(5): 747-50.
- Spudich, J. L. and R. A. Bogomolni (1988). "Sensory rhodopsins of halobacteria." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **17**: 193-215.
- Steinhoff, H., A. Savitsky, C. Wegener, M. Pfeiffer, M. Plato and K. Mobius (2000). "High-field EPR studies of the structure and conformational changes of site-directed spin labeled bacteriorhodopsin." *Biochim Biophys Acta* **1457**(3): 253-62.
- Steinhoff, H. J., R. Mollaaghababa, C. Altenbach, K. Hideg, M. Krebs, H. G. Khorana and W. L. Hubbell (1994). "Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin." *Science* **266**(5182): 105-7.
- Stern, L. J., P. L. Ahl, T. Marti, T. Mogi, M. Dunach, S. Berkowitz, K. J. Rothschild and H. G. Khorana (1989). "Substitution of membrane-embedded aspartic acids in bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle." *Biochemistry* **28**(26): 10035-42.
- Stoeckenius, W. (1999). "Bacterial rhodopsins: evolution of a mechanistic model for the ion pumps." *Protein Sci* **8**(2): 447-59.
- Stoeckenius, W. and R. A. Bogomolni (1982). "Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria." *Annu Rev Biochem* **51**: 587-616.
- Subramaniam, S., M. Gerstein, D. Oesterhelt and R. Henderson (1993). "Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin." *Embo J* **12**(1): 1-8.
- Subramaniam, S., M. Lindahl, P. Bullough, A. R. Faruqi, J. Tittor, D. Oesterhelt, L. Brown, J. Lanyi and R. Henderson (1999). "Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle." *J Mol Biol* **287**(1): 145-61.
- Subramaniam, S., T. Marti, S. J. Rosselet, K. J. Rothschild and H. G. Khorana (1991). "The reaction of hydroxylamine with bacteriorhodopsin studied with mutants that have altered photocycles: selective reactivity of different photointermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2583-7.
- Sumper, M. and G. Herrmann (1976). "Biogenesis of purple membrane: regulation of bacterio-opsin synthesis." *FEBS Lett* **69**(1): 149-52.
- Takahashi, K. and J. M. Sturtevant (1981). "Thermal denaturation of streptomyces subtilisin inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex." *Biochemistry* **20**(21): 6185-90.
- Tanio, M., S. Inoue, K. Yokota, T. Seki, S. Tuzi, R. Needleman, J. K. Lanyi, A. Naito and H. Saito (1999a). "Long-distance effects of site-directed mutations on backbone conformation in bacteriorhodopsin from solid state NMR of [1-¹³C]Val-labeled proteins." *Biophys J* **77**(1): 431-42.
- Tanio, M., S. Tuzi, S. Yamaguchi, R. Kawaminami, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi and H. Saito (1999b). "Conformational changes of bacteriorhodopsin along the proton-conduction chain as studied with (¹³C) NMR of [3-(¹³C)Ala-labeled protein: arg(82) may function as an information mediator." *Biophys J* **77**(3): 1577-84.

- Terpugov, E. L. and O. V. Degtyareva (2001). "FTIR emission spectra of bacteriorhodopsin in a vibrational excited state." *Biochemistry (Mosc)* **66**(11): 1315-22.
- Thorgeirsson, T. E., W. Xiao, L. S. Brown, R. Needleman, J. K. Lanyi and Y. K. Shin (1997). "Transient channel-opening in bacteriorhodopsin: an EPR study." *J Mol Biol* **273**(5): 951-7.
- Turner, G. J., S. Chittiboyina, L. Pohren, K. G. Hines, J. J. Correia and D. C. Mitchell (2009). "The Bacteriorhodopsin Carboxyl-Terminus Contributes to Proton Recruitment and Protein Stability (dagger)." *Biochemistry*.
- Unwin, P. N. and R. Henderson (1975). "Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens." *J Mol Biol* **94**(3): 425-40.
- van de Vossenberg, J. L., A. J. Driessen, W. D. Grant and W. N. Konings (1999). "Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration." *Extremophiles* **3**(4): 253-7.
- Varo, G. and J. K. Lanyi (1990). "Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **29**(9): 2241-50.
- Varo, G. and J. K. Lanyi (1991a). "Kinetic and spectroscopic evidence for an irreversible step between deprotonation and reprotonation of the Schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biochemistry* **30**(20): 5008-15.
- Varo, G. and J. K. Lanyi (1991b). "Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biochemistry* **30**(20): 5016-22.
- Varo, G. and J. K. Lanyi (1995). "Effects of hydrostatic pressure on the kinetics reveal a volume increase during the bacteriorhodopsin photocycle." *Biochemistry* **34**(38): 12161-9.
- Vonck, J. (2000). "Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography." *Embo J* **19**(10): 2152-60.
- Weidlich, O., L. Ujj, F. Jager and G. H. Atkinson (1997). "Nanosecond retinal structure changes in K-590 during the room-temperature bacteriorhodopsin photocycle: picosecond time-resolved coherent anti-stokes Raman spectroscopy." *Biophys J* **72**(5): 2329-41.
- Xiao, W., L. S. Brown, R. Needleman, J. K. Lanyi and Y. K. Shin (2000). "Light-induced rotation of a transmembrane alpha-helix in bacteriorhodopsin." *J Mol Biol* **304**(5): 715-21.
- Xu, Z. J., D. B. Moffett, T. R. Peters, L. D. Smith, B. P. Perry, J. Whitmer, S. A. Stokke and M. Teintze (1995). "The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of bacteriorhodopsin." *J Biol Chem* **270**(42): 24858-63.
- Yamazaki, Y., M. Hatanaka, H. Kandori, J. Sasaki, W. F. Karstens, J. Raap, J. Lugtenburg, M. Bizounok, J. Herzfeld, R. Needleman and et al. (1995). "Water structural changes at the proton uptake site (the Thr46-Asp96 domain) in the L intermediate of bacteriorhodopsin." *Biochemistry* **34**(21): 7088-93.
- Yan, B., S. W. Cline, W. F. Doolittle and J. L. Spudich (1992). "Transformation of a bop-hop-sop-I-sop-II-Halobacterium halobium mutant to bop+: effects of bacteriorhodopsin photoactivation on cellular proton fluxes and swimming behavior." *Photochem Photobiol* **56**(4): 553-61.
- Zimanyi, L., Y. Cao, M. Chang, B. Ni, R. Needleman and J. K. Lanyi (1992a). "The two consecutive M substates in the photocycle of bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue replacements." *Photochem Photobiol* **56**(6): 1049-55.

- Zimanyi, L., Y. Cao, R. Needleman, M. Ottolenghi and J. K. Lanyi (1993). "Pathway of proton uptake in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biochemistry* **32**(30): 7669-78.
- Zimanyi, L., G. Varo, M. Chang, B. Ni, R. Needleman and J. K. Lanyi (1992b). "Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biochemistry* **31**(36): 8535-43.
- Zscherp, C. and J. Heberle (1997). "Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N and O of the Bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy." *J phys Chem B* **101**: 10542-47.
- Zscherp, C., R. Schlesinger and J. Heberle (2001). "Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin." *Biochem Biophys Res Commun* **283**(1): 57-63.
- Zscherp, C., R. Schlesinger, J. Tittor, D. Oesterhelt and J. Heberle (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**(10): 5498-503.