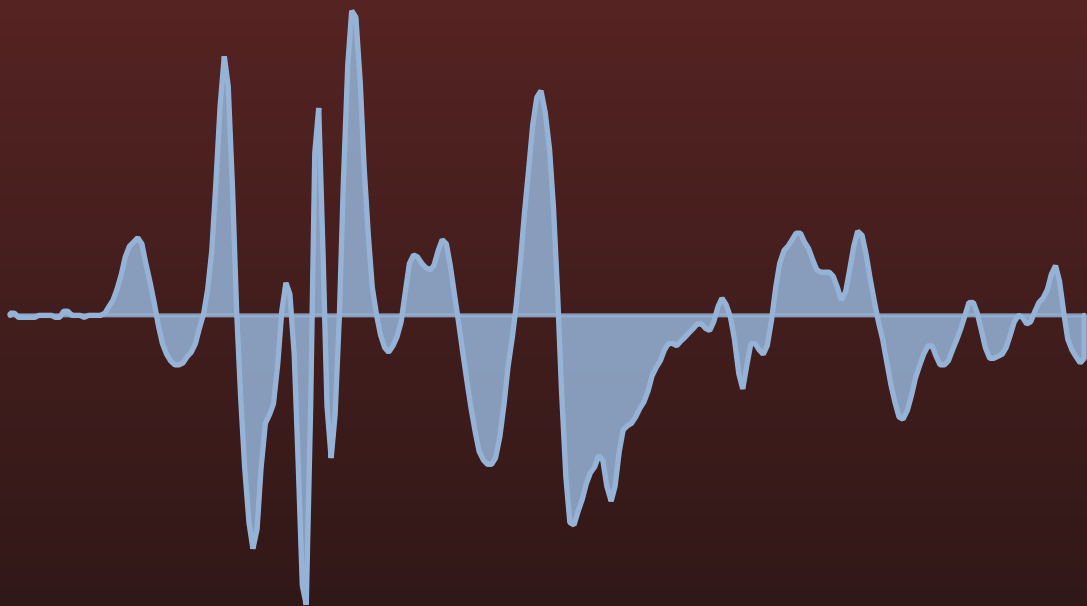


Estudi del lloc d'unió del sodi de  
la permeasa de melibiosa  
d'*Escherichia coli*



Meritxell Granell Puig  
CEB-Unitat de Biofísica  
UAB 2009

# Estudi del lloc d'unió del sodi de la permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli*

Memòria presentada per Meritxell Granell Puig per optar al grau de doctor.

Aquest treball ha estat realitzat en la CEB-Unitat de Biofísica del departament de Bioquímica i de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Esteve Padrós Morell i Dr. Víctor A. Lórenz Fonfría.

Vist i plau dels directors de la tesi:

Dr. Esteve Padrós Morell

Víctor A. Lórenz Fonfría

Bellaterra, Juny 2009

Si avancem amb confiança  
en la direcció dels nostres somnis  
i ens esforcem per viure la vida  
que sempre hem imaginat,  
ens trobarem amb un èxit inesperat  
en qualsevol moment.

*Henry David Thoreau*

La gent sovint diu que la motivació no és duradora.  
Bé, tampoc ho és la dutxa que prenem cada matí,  
per això es recomanable repetir-la cada dia.

*Zig Ziglar*

# Índex

<b>1. Introducció .....</b>	<b>1</b>
1.1 Transport a través de les membranes cel·lulars .....	1
1.2 Transportadors secundaris.....	5
1.2.1 La família GPH (galactòsids-pentoses-hexurònids) .....	5
1.3 Permeasa de Melibiosa .....	7
1.3.1 Funció de la MelB .....	8
1.3.2 Lloc d'unió dels cations.....	12
1.3.3 Lloc d'unió del sucre .....	15
1.3.4 Connexió del lloc d'unió del catió amb el lloc d'unió del sucre.....	16
1.3.5 El llaç 10-11 .....	17
1.3.6 El llaç 4-5. ....	18
1.4 Estructura de la MelB .....	21
1.4.1 Estructures 2D i 3D de la MelB .....	23
1.5 Estructures 3D dels transportadors de membrana .....	26
1.5.1 Estructures 3D dels transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana.....	26
1.5.2 Estructures 3D de transportadors que uneixen Na <sup>+</sup> .....	30
1.6 Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia d'infraroig.....	33
1.6.1 Espectres d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de la MelB salvatge en H <sub>2</sub> O i D <sub>2</sub> O .....	33
1.6.2 Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats.....	34
1.6.3 Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR .....	34
1.6.4 Estudi de l'orientació de la MelB salvatge i del mutant R141C per ATR-FTIR.....	36

1.6.5 Estudi de la MelB i R141C mitjançant espectres de diferència induïts pels substrats per ATR-IR .....	37
1.7 Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia de fluorescència .....	44
<b>2. Objectius .....</b>	<b>47</b>
<b>3. Materials i mètodes.....</b>	<b>49</b>
3.1 Productes utilitzats .....	49
3.1.1 Cultiu bacterià i formació de vesícules.....	49
3.1.2 Purificació i reconstitució de la permeasa de melibiosa.....	49
3.2 Soca bacteriana i plasmidis utilitzats .....	51
3.3 Cultiu dels bacteris transformats amb el gen de la permeasa de melibiosa .....	51
3.3.1 Transformació i selecció .....	51
3.3.2 Estudi del transport de la permeasa de melibiosa mitjançant el medi MacConkey .....	52
3.3.3 Cultiu bacterià .....	52
3.3.4 Rentats, centrifugació i emmagatzematge dels cultius .....	53
3.4 Purificació i reconstitució de la permeasa de melibiosa .....	54
3.4.1 Formació de les vesícules invertides .....	54
3.4.2 Solubilització i purificació de la permeasa de melibiosa .....	55
3.4.3 Formació de proteoliposomes.....	56
3.5 Determinació de la puresa dels proteoliposomes i quantificació .....	58
3.6 Espectroscòpia d'infraroig .....	59
3.6.1 Adquisició dels espectres i funcionament d'un espectròmetre amb transformada de Fourier.....	59
3.6.2 Tècnica d'espectroscòpia d'infraroig per reflexió total atenuada.....	62

3.6.3	Vibracions moleculars de les proteïnes .....	65
3.6.4	Estudi per espectroscòpia d'infraroig de l'estat de la permeasa de melibiosa reconstituïda .....	67
3.6.5	Estudi per espectroscòpia d'infraroig de la interacció dels substrats i els cations amb la permeasa de melibiosa.....	68
3.6.6	Disseny dels experiments per realitzar els espectres de diferència.....	69
3.6.7	Correcció dels espectres de diferència .....	71
3.6.8	Desconvolució pel mètode de màxima entropia .....	74
3.6.9	Comparació quantitativa de la intensitat i semblança dels espectres de diferència dels mutant respecte al 3SV .....	75
3.7	Espectroscòpia de fluorescència .....	78
3.7.1	Fluorescència dels triptòfans .....	79
3.7.2	Mesures de la fluorescència intrínseca de la MelB .....	80
3.7.3	Mesura del FRET entre els Trp i el dansil-galactosid.....	81
3.7.4	Marcatge dels proteoliposomes amb MIANS .....	82
<b>4.</b>	<b>Resultats i discussió.....</b>	<b>85</b>
4.1	Cultiu i purificació dels mutants de la permeasa de melibiosa .....	85
4.2	Comprovació de l'estat dels proteoliposomes per espectroscòpia d'infraroig.....	89
4.3	Estudi per espectroscòpia d'infraroig de la MelB mutada mitjançant espectres de diferència .....	92
4.3.1	Anàlisi dels espectres de diferència induïts per sodi.....	94
4.3.2	Anàlisi dels espectres de diferència induïts per melibiosa en presència del protó com a catió.....	102
4.3.3	Anàlisi dels espectres de diferència induïts per melibiosa en presència de sodi .....	118
4.4	Estudi dels mutants de la MelB per espectroscòpia de fluorescència .....	130

4.4.1 Estudi de les mutacions puntuals de la MelB per fluorescència intrínseca de la proteïna .....	130
4.4.2 Estudi de les mutacions puntuals de la MelB per FRET entre els Trp de la MelB i el sucre fluorescent dansil-galactòsid .....	136
4.4.3 Marcatge de les Cys dels mutants mitjançant MIANS .....	148
<b>5. Discussió general .....</b>	<b>155</b>
5.1 L'Asp 19 no és necessari per la unió del sodi, però sí per a la unió de melibiosa.....	158
5.2 L'Asp 124 no essencial per a la unió del sodi però és important per l'acoblament entre el transport del sodi i de la melibiosa. ....	161
5.3 Els Asp 55 i 59 són essencials per la unió del sodi.....	163
5.4 L'Asn 58 és essencial per la unió del sodi.....	167
5.5 Model del lloc de unió del catió .....	169
<b>6. Conclusions .....</b>	<b>173</b>
<b>7. Referències .....</b>	<b>175</b>

# Abreviatures

A, Ala, alanina	N, Asn, asparragina
C, Cys, cisteïna	P, Pro, prolina
D, Asp, aspàrtic	Q, Gln, glutamina
E, Glu, glutàmic	R, Arg, arginina
F, Phe, fenilalanina	S, Ser, serina
H, His, histidina	V, Val, valina
K, Lys, lisina	W, Trp, triptòfan
L, Leu, leucina	X, qualsevol aminoàcid
M, Met, metionina	Y, Tyr, tirosina

A, Archaea

Ara, L-Arabinosa

ATR-FTIR, reflexió total atenuada-infraroig amb transformada de Fourier

B, bacteris

BSA, "bovine serum albumin"

Cel, Cel lobiosa

DDM, dodecil maltòsid

DMSO "dimethyl sulfoxide"

Dns2-S-Gal, "2'-(N-dansyl) aminoethyl-1-thio-β-D-galactopyranoside"

dp, profunditat de penetració de l'ona evanescent

DTT, "1,4-dithio-threitol"

E, Eucariota

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

FRET, transferència d'energia per ressonància de fluorescència

Fru, Fructosa

Fuc, Fucosa

Gal, Galactosa

GalP, galactose/H<sup>+</sup> transportador

Ge, germani

Glc, glucosa

GlpT, "glycerol-3-phosphate transporter"

GPH, família galactòsids-pentoses-hexurònids

Gus<sub>BEC</sub>, transportador de glucurònid d'*Escherichi coli*

H/D, hidrogen/deuteri

IMV, vesícules de membrana invertides



IPTG, isopropyltio- $\beta$ -galactòsid  
IRE, element de reflexió interna  
ISO, vesícules amb orientació contrària a la fisiològica (inside out)  
IUBMB International Union of Biochemistry and Molecular Biology  
Kan Kanamicina  
KPi, "potassium phosphate buffer" ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
Lac, Lactosa  
Lac<sub>ST</sub>, permeasa de lactosa d'*Streptococcus thermophilus*  
lactosa, 4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-glucosa  
LacY, transportador de lactosa d'*Escherichia coli*  
LAPAO, "(3-lauryl-amido)-N,N'-(dimethylamino) propylamine oxide"  
LB, "Luria Broth"  
Mal, Maltosa  
Man, Manosa  
Mel, Melibiosa  
MelA  $\alpha$ -galactosidasa  
MelB, transportador de melibiosa d'*Escherichia coli*  
MelB<sub>EC</sub>, permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli*  
MelB<sub>KP</sub>, permeasa de melibiosa de *Klebsiella pneumoniae*  
MelB-NEM, permeasa de melibiosa reaccionada amb *N-ethylmaleimide*  
MelB<sub>SY</sub>, permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium*  
Melibiosa 6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-D-glucose  
melibiosa 6-O- $\alpha$ -galactopiranosil-D-glucosa  
MES  
MFS, superfamília de facilitadors majors  
MIANS, 2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6- sulfonic acid  
N. STM, número de segments transmembrana  
N. TC, Número de la classificació de transportadors  
NEM, N-ethylmaleimide  
Ni-NTA, àcid nitriloacètic recobert de ions níquel  
O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -galactopiranosil- $\beta$ -D-fructofuranòsid  
R141C, mutant de la MelB Arg141Cys  
Raf, Rafinosa  
Rib, Ribosa  
RSO, vesícules amb orientació fisiològica (right side out)  
Scr, sacarosa  
Strep, estreptomicina  
TC, "transporter classification"  
TDG,  $\beta$ -D-galactopiranosil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosid

TMG metil- $\beta$ -D-tiogalactòsid  
transportador de Leucina depenent de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (LeuTAA)  
Tre, Trealosa  
Xyl, xilosa  
ZnSe, selenur de zinc  
 $\alpha$ -Glc,  $\alpha$ -glucòsids  
 $\alpha$ -NPG, p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranòsid  
 $\Delta\Psi$ , potencial elèctric transmembrana  
(3H) $\alpha$ -NPG, p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-(6-3H)galactopiranòsid  
3SV, mutant de la MelB sense cisteïnes

# Introducció

# 1. Introducció

## 1.1 Transport a través de les membranes cel·lulars

La membrana plasmàtica és una barrera de permeabilitat selectiva que es troba protegint la cèl·lula del medi extern. La seva permeabilitat permet l'intercanvi de substàncies amb el medi exterior, i en particular l'entrada dins la cèl·lula i dins els compartiments cel·lulars de tots els components essencials (com els sucres, els aminoàcids i els lípids). Podem dir que la membrana és l'encarregada de mantenir el medi intern constant o en equilibri. Aquesta situació rep el nom d'homeòstasi.

La membrana es troba formada per una bicapa de fosfolípids, que la fa impermeable a la majoria de molècules. Aquestes molècules, per tant, han de ser transportades mitjançant unes proteïnes transportadores que formen part de la membrana, o han de difondre a través de canals específics.

Així, algunes molècules petites poden difondre a través de la membrana a favor de gradient sense cap aportació energètica, és a dir, per difusió passiva. Aquest transport espontani ve donat per la tendència a assolir l'equilibri electroquímic entre els dos costats de la membrana. Només les molècules petites (com l'oxigen o el nitrogen) poden difondre prou ràpid per mantenir les necessitats de les cèl·lules. La resta de transport es realitza mitjançant les proteïnes transportadores.

El grup de Saier i col·laboradors (SAIER 1998, 1999, 2000b) ha desenvolupat un sistema de classificació dels transportadors anomenat sistema TC ("transporter classification"), el qual ha estat formalment adoptat per "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUBMB). Aquest sistema ajuda a tenir una visió general del transport, tant des del punt de vista estructural, funcional o evolutiu (SAIER 1999, 2000c, 2001).

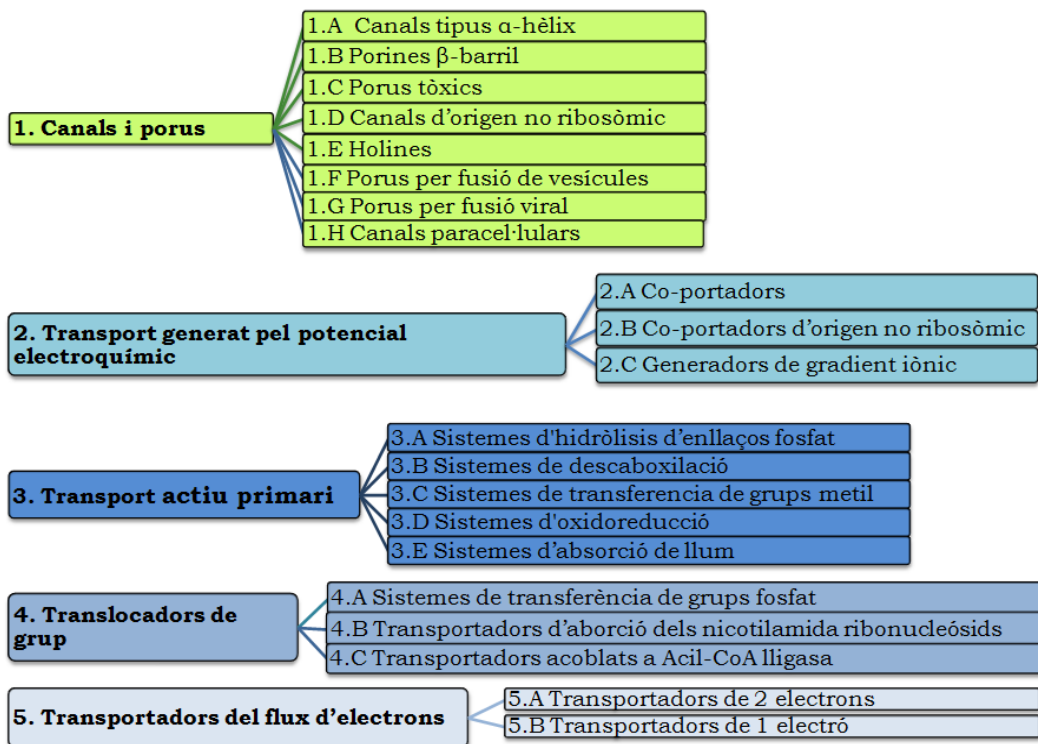
Segons aquest sistema, a cada transportador se li assigna un número TC, seria un número anàleg al sistema de classificació dels enzims EC. Aquest

número TC està compost per 5 caràcters que ens indiquen el seu lloc en la classificació jeràrquica de les molècules transportadores.

Aquesta jerarquia comprèn 5 nivells:

1. **Classe.** Correspon al mecanisme del procés de transport.
2. **Subclasse.** Pel tipus d'estructura del transportador o la font d'energia utilitzada.
3. **Família.** Per l'estructura primària del transportador.
4. **Tipus.** Per l'estructura primària, dins d'una família.
5. **Transportador.**

En la figura 1.1 podem veure un esquema d'aquest sistema TC, per als 2 primers nivells.

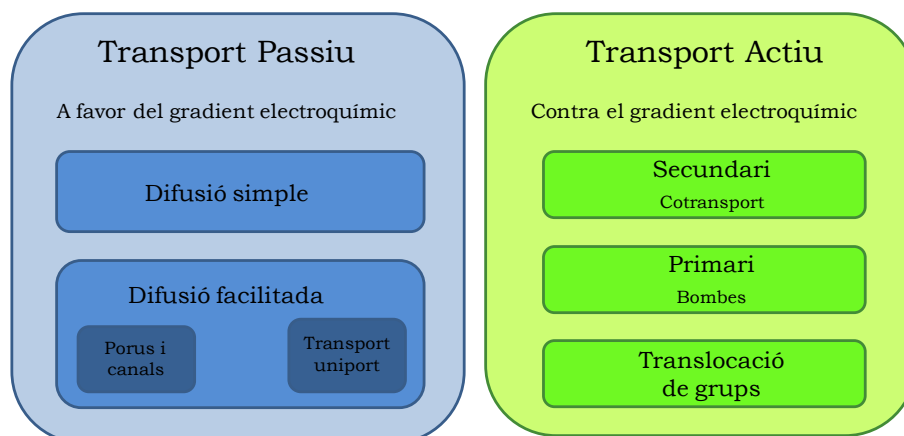


**Figura 1.1** Representació esquemàtica del sistema jeràrquic per la classificació de les famílies de transportadors de funció definida en el sistema TC.

El primer tipus de transport o classe és el pas de soluts a través de proteïnes inserides en la membrana que presenten estructures de  $\alpha$ -hèlix o

de barrils  $\beta$  transmembrana. Aquestes proteïnes integrals de la membrana són anomenades canals o porus. El transport a través d'aquestes proteïnes es dona per difusió passiva, per tant, sense cap aportació energètica i a favor de gradient. Per aquesta raó aquest transport s'anomena difusió facilitada.

El transport actiu es produeix mitjançant una aportació energètica, que pot ser una reacció química (hidròlisis de l'enllaç de pirofosfat de l'ATP), absorció de llum o flux d'electrons. Si el transport està acoblat directament a aquesta font d'energia l'anomenem transport actiu primari, si en canvi, el transport es troba acoblat a una font d'energia secundària com el gradient electroquímic, el qual és generat per un sistema de transport actiu primari, s'anomena transport actiu secundari (veure figura 1.2).



**Figura 1.2** Esquema dels diferents tipus de transport segons el mecanisme de transport utilitzat.

La segona classe és el transport generat pel potencial electroquímic o transport secundari. Presenten una elevada estereoespecificitat i es poden classificar, segons la direcció del moviment dels substrats:

1. Uniport: on només es transporta un únic solut, tant per difusió facilitada, com per un procés depenent del potencial de membrana si el solut està carregat. Aquest transport no és actiu, sinó que funciona per difusió facilitada. A diferència dels canals no es troben sempre

oberts, presenten una alta especificitat i la seva velocitat de transport és menor que els canals.

2. Simport: es transporta dues o més molècules en la mateixa direcció.
3. Antiport: es transporta dues o més molècules en direccions oposades. Aquest es divideix en dos tipus.

- a. solut-solut antiport

- b. solut-catió antiport

La tercera classe és el transport actiu primari que es troba acoblat directament a una font d'energia.

A la quarta classe hi tenim els translocadors de grup, els quals fosforilen el solut al transportar-lo.

El cinquè catalitza el flux d'electrons a través de la membrana. Els electrons són transferits des d'uns donadors d'un costat a uns acceptors d'electrons a l'altre costat de la membrana.

## 1.2 Transportadors secundaris

El metabolisme de carbohidrats ha estat estudiat intensivament i la majoria de vies metabòliques són ben conegudes. La majoria de bacteris tenen la capacitat d'utilitzar diferents carbohidrats com a font de carboni i font d'energia. Per això tenen una gran diversitat de proteïnes transportadores i enzims catabòlics. En la Taula 1.1 es descriuen els transportadors secundaris per als que el seu substrat és un sucre.

Taula 1.1: Les famílies de transportadors secundaris específics de sucres					
N. TC	Família	N. STM	Espècies	N. prot.	Substrats
<b>2.A.1 Superfamília de facilitadors majors</b>					
2.A.1.1	Família portadora de sucre	12	B, A, E	>200	Glc, Fru, Man, Ara, Xyl, Lac, $\alpha$ -Glc
2.A.1.5	Família simport oligosacàrid:H <sup>+</sup>	12	B	>20	Lac, Scr, Raf
2.A.1.7	Família simport fucosa: H <sup>+</sup>	12	B	>10	L-fucosa, Glc, Man, Gal
2.A.1.12	Família simport sialat: H <sup>+</sup>	14	B,E	>10	Sialat, Lac, Pyr
2.A.1.18	Família permeasa de poliols	12	B	>4	D-Arabinitol, Ribitol
2.A.1.20	Família transportadora d'eflux de sucre	12	B	>10	Lac, Glc, Cel, Mal, $\alpha$ MG, IPTG, Kan, Strep, etc
2.A.2	<b>Família simport galactòsids-pentoses-hexurònids</b>	12	B, A, E	>50	Mel, Lac, Scr, Raf, glucurònids, pentòsids

**N. TC**, Número de la classificació de transportadors; **N. STM**, Número de segments transmembrana; **B**, Bacteris; **A**, Archaea i **E**, Eucariota.

Abreviatures pels sucres (tots tenen la configuració D-sucres, si no s'indica el contrari): **Ara**, L-Arabinosa; **Cel**, Cel·lobiosa; **Fru**, Fructosa; **Fuc**, Fucosa; **Gal**, Galactosa; **Glc**, Glucosa;  **$\alpha$ -Glc**,  $\alpha$ -Glucòsids; **IPTG**, Isopropyltio- $\beta$ -galactòsid; **Kan**, Kanamicina; **Lac**, Lactosa; **Mal**, Maltosa; **Man**, Manosa;  **$\alpha$ MG**,  $\alpha$ -Metilglucòsids; **Mel**, Melibiosa; **Pyr**, Piruvat; **Raf**, Rafinosa; **Rib**, Ribosa; **Scr**, Sacarosa; **Strep**, Estreptomina; **Tre**, Trealosa; **Xyl**, Xilosa.

### 1.2.1 La família GPH (galactòsids-pentoses-hexurònids)

La família de transportadors de galactòsids-pentoses-hexurònids (GPH) transporta específicament galactòsids, pentoses i hexurònids mitjançant diversos cations que poden ser Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, o H<sup>+</sup>. Dins aquesta família trobem les permeases de melibiosa d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium* (que són les que comparteixen més homologia en la seva seqüència) i la permeasa de lactosa de *Streptococcus thermophilus* que



és la que té menys homologia amb la permease de melibiosa d'*E. coli* (MelB). Basant-se en prediccions d'estructura topològica i d'estructura secundària, es preveu que tots els membres de la GPH consten de 12 hèlixs transmembrana (HENDERSON 1993). Dintre de les hèlixs transmembrana es troben aminoàcids carregats que estan conservats, sobretot aquells que es troben en l'hèlix II. Aquests aminoàcids estarien involucrats en la unió dels cations, de forma que llur presència o absència en alguns transportadors dona lloc a la diferència de selectivitat entre les permeases a l'hora d'utilitzar Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o H<sup>+</sup> (veure taula 1.2).

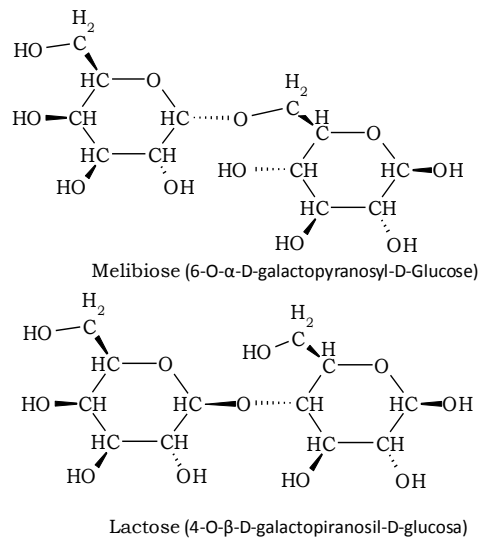
<b>Taula 1.2: Classificació dels diferents cations utilitzats per la subfamília GPH</b>					
Substrats	MelB <sub>EC</sub>	MelB <sub>SY</sub>	MelB <sub>KP</sub>	LacS <sub>ST</sub>	GusB <sub>EC</sub>
α-galactòsids (melibiosa)	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	H <sup>+</sup>	H <sup>+</sup>	NT
β-galactòsids (TMG)	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , (H <sup>+</sup> )	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	H <sup>+</sup>	NT
Monosacàrids (D-galactosa)	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , (Li <sup>+</sup> )	nd	nd	H <sup>+</sup>	NT
α/β-glucurònids	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>	nd	nd	nd	H <sup>+</sup>

**MelB<sub>EC</sub>**, Permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli*; **MelB<sub>SY</sub>**, Permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium*; **MelB<sub>KP</sub>**, Permeasa de melibiosa de *Klebsiella pneumoniae*; **LacS<sub>ST</sub>**, Permeasa de lactosa d'*Streptococcus thermophilus*; **GusB<sub>EC</sub>**, Transportador de glucurònid d'*Escherichia coli*. **nd**, No determinat i **NT**, No transporta. Els cations entre parèntesis volen dir que l'activació per ells és molt pobre. Les dades de la taula es troben descrites a Poolman et al. (1996).

Per exemple, s'ha vist que la presència de l'Asn 58 de la MelB d'*E. coli* i l'Asn en posició equivalent en els transportadors dels altres organismes, fa que el transportador tingui una especificitat pel catió Na<sup>+</sup>. Una altra característica de la família GPH és l'alt grau de conservació del llaç 10-11 (i de l'hèlix XI). Fins i tot alguns dels aminoàcids del llaç 10-11 també es troben conservats en la permeasa de lactosa d'*Escherichia coli* (que no forma part d'aquesta família).

### 1.3 Permeasa de Melibiosa

La MelB (TC 2.A.2.1.1) és un transportador simport de membrana d'*E. Coli* que catalitza l'acumulació d' $\alpha$ - o  $\beta$ -galactòsids (figura 1.3) dins el citoplasma bacterià mitjançant un gradient transmembrana de  $H^+$ ,  $Na^+$  o  $Li^+$ , cations que actuen com a cotransportadors. Aquests ions competeixen pel mateix lloc d'unió i augmenten l'afinitat del sucre cotransportat, essent el  $Na^+$  i el  $Li^+$  millors activadors que el  $H^+$  (DAMIANO-FORANO *et al.* 1986; BASSILANA *et al.* 1988).

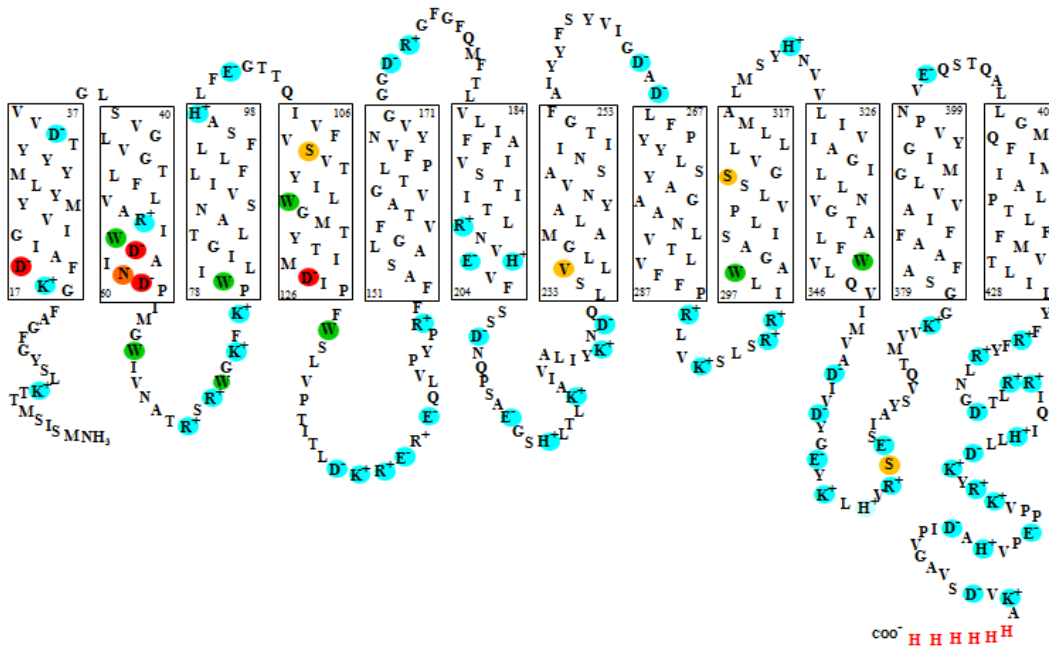


**Figura 1.3** Estructura de la melibiosa ( $\alpha$ -galactosid) i la lactosa ( $\beta$ -galactòsid).

La MelB és una proteïna molt hidrofòbica (70% dels residus són apolars) de 473 aminoàcids i està codificada pel gen *melB* (YAZYU *et al.* 1984). Estudis immunològics (BOTFIELD i WILSON 1989; POURCHER *et al.* 1996), de fusió de *melB-phoA* (BOTFIELD *et al.* 1992; POURCHER *et al.* 1996), de proteòlisi (GWIZDEK *et al.* 1997) i d'espectroscòpia d'infrarroig (DAVE *et al.* 2000), prediuen o recolzen un model topològic de 12 hèlixs transmembrana amb el costat N- i C-terminal a la cara citoplasmàtica (veure figura 1.4). A més a més, cristalls bidimensionals de la MelB (HACKSELL *et al.* 2002) i l'estructura de proteïnes de famílies pròximes com la permeasa de lactosa (ABRAMSON *et al.* 2003) corroboren aquesta predicció.

Estudis de foto-marcatge (AMBROISE *et al.* 2000) i de mutagènesi conjuntament amb fluorescència (CORDAT *et al.* 1998) remarquen la

importància del domini hèlix IV/llaç 4-5/hèlix V per a la funció de transport de la MelB. A més, varis residus acídics i polars de les hèlixs I, II i IV semblen jugar un paper molt important en el reconeixement de l'ió (WILSON i WILSON 1992; HAMA i WILSON 1993; POURCHER *et al.* 1993). També hi ha evidències que les hèlixs del costat C-terminal delimiten el lloc d'unió del sucre (MUS-VETEAU i LEBLANC 1996; CORDAT *et al.* 1998; DING *et al.* 2000).



**Figura 1.4** Model d'estructura secundària de la MelB (POURCHER *et al.* 1996). Les hèlixs transmembrana estan representades amb rectangles. En groc, les 4 Cys natives de la MelB que s'han substituït en el mutant 3SV per 3 Ser i una Val. En vermell, els 4 Asp que es proposa que formen el lloc d'unió dels cations. En taronja, l'Asn 58 que també intervé en la unió dels cations. En blau, els aminoàcids amb càrrega. En verd, els Trp.

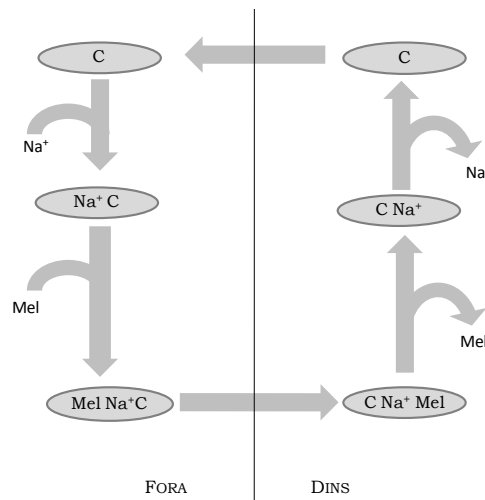
Una altra propietat estructural és la modificació cooperativa de l'estructura de la MelB per efecte del ió o del sucre mesurat per mètodes espectroscòpics com l'infraroig i la fluorescència, i per mètodes bioquímics (MUS-VETEAU *et al.* 1995; MUS-VETEAU i LEBLANC 1996; GWIZDEK *et al.* 1997; DAVE *et al.* 2000; DAVE *et al.* 2002)

### 1.3.1 Funció de la MelB

Tsuchiya i Wilson (TSUCHIYA i WILSON 1978) van ser els primers en demostrar, mitjançant elèctrodes específics per a cada catió, que la MelB

podia co-transportar tant amb  $H^+$ ,  $Na^+$  com amb  $Li^+$ . Posteriorment Wilson i Wilson (WILSON i WILSON 1987) van observar que la selectivitat pel catió varia depenent si el galactòsid transportat era  $\alpha$  o  $\beta$ . La MelB pot transportar una gran varietat de  $\beta$ -galactòsids com la lactosa (4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-glucosa), el metil- $\beta$ -galactòsid i el TMG (metil- $\beta$ -D-tiogalactòsid) juntament amb el catió  $Na^+$  o  $Li^+$ . Per altra banda, els  $\alpha$ -galactòsids com la melibiosa (6-O- $\alpha$ -galactopiranosil-D-glucosa), la raffinosa (O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -galactopiranosil- $\beta$ -D-fructofuranòsid) i el  $\alpha$ -NPG (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactòsid) fan servir qualsevol dels tres cations,  $H^+$ ,  $Na^+$  o  $Li^+$  (WILSON i WILSON 1987).

El  $Na^+$ , igual que el  $Li^+$ , augmenta l'afinitat del transportador pel sucre,  $\alpha$ -NPG, passant d'una  $K_d$  de 15  $\mu M$  ( $H^+$ ) a 0,7  $\mu M$  ( $Na^+$ ). Per tant, això fa que el  $Na^+$  sigui millor activador de la unió del sucre que el  $H^+$  (DAMIANO-FORANO *et al.* 1986). A més, degut a que el  $H^+$  inhibeix la unió de  $Na^+$ , els dos cations deuen competir pel mateix lloc d'unió (DAMIANO-FORANO *et al.* 1986).



**Figura 1.5** Model de transport dels substrats de la MelB en sis estats. C correspon a la MelB (Bassilana *et al.*, 1988).

Bassilana i cols (BASSILANA *et al.* 1987, 1988) van estudiar el transport de la melibiosa i el seus co-substrats en membranes i van proposar un transport de substrats dividit en sis etapes (figura 1.5), on el pas limitant del transport és l'alliberament del catió, que depèn de quin complex terciari estiguin formant el catió, el sucre i la MelB. L'estabilitat del complex terciari, que varia per cada catió (l'ordre d'estabilitat seria  $Li^+ > Na^+ > H^+$ ) causen les

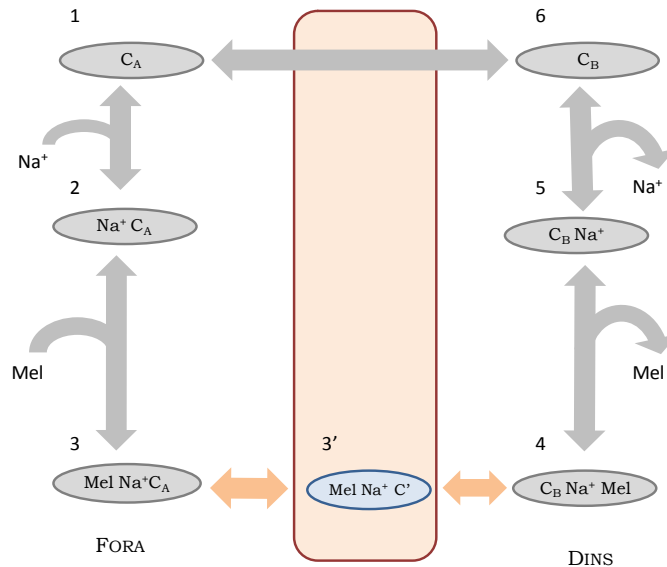
diferències en el transport de melibiosa, en presència dels diferents substrats (POURCHER *et al.* 1990). Aquest mecanisme proposat indica un alliberament seqüencial dels substrats on el sucre és alliberat primer en l'interior de la membrana i en el medi exterior és l'últim en unir-se per formar el complex terciari. Aquest model de transport, anomenat tipus mirall, permet el intercanvi de melibiosa entre el medi exterior i l'interior sense la necessitat d'un flux net del catió.

A més a més de tots aquests estudis de transport de melibiosa, també es va mesurar el transport de  $\text{Na}^+$ , trobant-se que l'estequiometria del transport catió/melibiosa és 1 a 1 (BASSILANA *et al.* 1987). Però hi havia un altre factor que podia modificar les propietats cinètiques del transport de la MelB, el potencial elèctric de membrana ( $\Delta\Psi$ ). L'efecte principal del  $\Delta\Psi$  seria la de disminuir l'estabilitat del complex terciari encarat cap al citoplasma (POURCHER *et al.* 1990).

Recentment, una anàlisi més aprofundida utilitzant mutants, tècniques de detecció del moviment de càrregues elèctriques (SSM), i fluorescència, ha permès establir un model ampliat (MEYER-LIPP *et al.* 2006). Per una banda, mesures dels canvis en el senyal d'emissió dels Trp mitjançant espectroscòpia de fluorescència resolta en el temps mostren que l'addició de melibiosa en presència de  $\text{Na}^+$  ( $\Delta\text{mel}(\text{Na}^+)$ ) dóna lloc a un augment del senyal de fluorescència que pot ser dividit en dues etapes. Una primera amb una constant de temps ràpida i una segona amb una de més lenta. Aquests valors són del mateix ordre que els observats amb la tècnica de SSM i per tant, es dedueix que els canvis conformacionals que indueixen aquests senyals deuen ser els mateixos.

El procés ràpid seria la unió del substrat i el lent la translocació del complex (MEYER-LIPP *et al.* 2004). Per altra banda, es van poder estudiar les etapes del transport mitjançant el seguiment del senyal d'una sonda fluorescent (MIANS) col·locada en el llaç 10-11. A part del procés ràpid (unió) i lent (translocació) observat prèviament amb SSM i amb la fluorescència resolta en el temps, es va trobar que hi ha un altre procés lent i electroneutre, amb una constant de temps de  $20 \text{ s}^{-1}$ . Aquest procés intermediari deu correspondre a la reorientació de la permeasa amb els

substrats units (MEYER-LIPP 2005). A partir de totes aquestes dades es va proposar un model de transport (figura 1.6) que ampliava el model de 6 estats proposat anteriorment per Bassilana i cols. (figura 1.5).



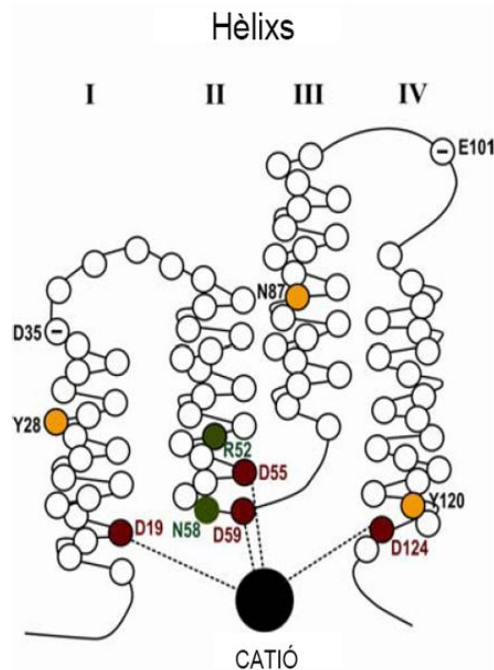
**Figura 1.6** Extensió del model de transport de 6 estats del transportador MelB. L'etapa 1 correspon al transportador buid exposat cap a l'interior cel·lular (CA) que en el nostre cas es troba a l'exterior dels proteoliposomes. La unió de sodi i melibiosa és seqüencial, on primer s'uneix el Na<sup>+</sup> (etapa 2) i després la melibiosa (etapa 3). L'etapa 3' es dona just després de la unió del sucre i són canvis conformacionals electrogènics (MEYER-LIPP *et al.* 2004). Després d'aquesta etapa tenim la reorientació del transportador i després l'alliberament del sucre (etapa 4) i catió (etapa 5) seqüencialment. El cicle de la MelB acaba amb la reorientació del transportador buid cap a l'exterior del liposoma.

En el model mostrat en la figura 1.6 s'observa que les etapes són reversibles, a més a més hi pot haver un intercanvi de catió tant si hi ha el sucre unit com si no està unit. A més, la unió del sucre augmenta l'afinitat de la MelB pel sodi, afavorint aquest intercanvi. Es va observar mitjançant la tècnica SSM que l'afinitat del sodi augmentava de  $K_{1/2}^{Na^+} = 2,1 \text{ mM}$  a  $K_{1/2}^{Na^+} = 0,6 \text{ mM}$ . A l'inversa també s'observa que l'afinitat de la melibiosa passa  $K_{1/2}^{Mel} = 22 \text{ mM}$  a  $K_{1/2}^{Mel} = 3 \text{ mM}$  (GANEVA *et al.* 2001). Després de la formació del complex terciari, hi ha una etapa de canvis conformacionals abans d'alliberar el sucre a l'espai citoplasmàtic (etapa 3').

### 1.3.2 Lloc d'unió dels cations

Un cop s'han identificat els substrats de la proteïna, el següent pas és esbrinar el lloc d'unió d'aquests substrats. Encara que la comparació amb permeases d'altres organismes ha permès també obtenir informació d'aquests llocs d'unió, una de les tècniques més potents i versàtils és la mutagènesi dirigida combinada amb altres tècniques, com la fluorescència. Com la unió dels substrats pot induir un canvi en la fluorescència (al pertorbar l'entorn dels Trp o de les sondes fluorescents utilitzades) es pot deduir quins aminoàcids són essencials per a la unió dels substrats com aquells que inhibeixen aquests canvis. També l'efecte de mutacions en la capacitat de transport, mesurada normalment amb sucre marcat radioactivament, s'ha utilitzat per identificar aminoàcids implicats en la unió, encara que s'ha de tenir en compte que alguns aminoàcids poden ser essencials per al transport i no per a la unió de substrats.

Leblanc i col·laboradors van mostrar que la MelB amb mutacions individuals a l'Asp 55 (hèlix II), l'Asp 59 (hèlix II) o l'Asp 124 (hèlix IV) a Cys no acumulen activament el sucre en presència d'un gradient de Na<sup>+</sup>. En canvi, els mutants continuen tenint l'habilitat d'unir  $\alpha$ -NPG però independentment de Na<sup>+</sup>. A més, els mutants Asp 59 i Asp 124 també perden l'habilitat d'acumular melibiosa amb el cotransport de H<sup>+</sup> (POURCHER *et al.* 1991; POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993). El mateix efecte sobre la unió de Na<sup>+</sup> i de melibiosa s'observa en l'Asp 19 (hèlix I) (POOLMAN *et al.* 1996). Cal dir que la substitució d'aquestes càrregues negatives d'Asp per altres de Glu o de reactius sulfhídrics carregats negativament no retornen completament l'activitat del WT i per tant, no només la càrrega és important, si no que també ho és la disposició de les cadenes laterals (ZANI *et al.* 1994; DING i WILSON 2001b). La suposició inicial de què l'Asp 35 formava part del lloc d'unió dels cations (POURCHER *et al.* 1996) va ser refusada més tard (POOLMAN *et al.* 1996).



**Figura 1.7** Possible lloc d'unió dels cations. L'Asp19 (hèlix I), Asp55 i 59 (hèlix II) i Asp124 (hèlix IV) se suposa que formen un lloc de coordinació pels cations (en vermell). L'Asn58 i l'Arg52 són importants per a la unió de Na<sup>+</sup> (en verd). Els aminoàcids polars que es consideren importants per l'estructura es mostren en groc (POOLMAN *et al.* 1996).

Es va obtenir més informació sobre els aminoàcids involucrats en la unió dels cations mitjançant quimeres de MelB entre dos organismes diferents (HAMA i WILSON 1993), on es va poder observar que l'extrem N-terminal és essencial per l'especificitat pel Na<sup>+</sup>. Posteriorment, mitjançant mutagènesi dirigida es va demostrar que l'Asn 58 és important per la unió de Na<sup>+</sup> (HAMA i WILSON 1994; FRANCO i WILSON 1996). És important remarcar que només els transportadors de la família dels GPH que tenen una Asn a la posició 58 poden fer servir Na<sup>+</sup> a l'hora del cotransport (POOLMAN i KONINGS 1993; POOLMAN *et al.* 1996).

A més dels Asp de les hèlixs transmembrana de l'extrem N-terminal, Zani i col·laboradors (ZANI *et al.* 1994) van estudiar els residus polars que es troben al voltant d'aquests Asp, i van observar que els mutants Y28F, N87A i Y120F tenen una afinitat menor pel Na<sup>+</sup> i pel sucre. A més de la disminució de l'afinitat pel sucre, també hi ha una variació en l'especificitat d'aquest. En canvi, aquests mutants mantenen la mateixa especificitat pels



cations respecte la MelB salvatge. A més, l'Arg 52 és important per l'acoblament entre el lloc d'unió del Na<sup>+</sup> i el sucre (FRANCO i WILSON 1999).

La localització de tots aquests aminoàcids involucrats en la unió dels cations està amb concordança amb el fet que els canvis de fluorescència deguts a la unió de Na<sup>+</sup> els produeixen els Trp que es troben localitzats en el N-terminal (MUS-VETEAU i LEBLANC 1996; CORDAT *et al.* 2000).

Tots aquests resultats van fer que es proposés un lloc comú d'unió per a tots els cations, format principalment pels Asp19, 55, 59 i 124 (POOLMAN *et al.* 1996), on l'Asn 58 seria necessària per a la coordinació del Na<sup>+</sup> (figura 1.7). Aquesta hipòtesi està refermada per la relació existent entre el radi iònic del Na<sup>+</sup> i el Li<sup>+</sup> (0,95 i 0,65 Å, respectivament) i la longitud de l'enllaç O-H del H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> (0,90 Å), que seria coherent amb el fet que en Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> i el H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> s'uneixen al mateix lloc d'unió. Aquest lloc d'unió tindria un número diferent d'àtoms coordinant segons el catió.

#### 1.3.2.1 Formació de ponts salins entre Asp i Arg/Lys

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

S'ha proposat que l'Arg 52 forma ponts salins amb els Asp19 i Asp55, amb un mecanisme que permetria que l'Arg formés les interaccions amb els dos Asp per separat en diferents estats del transport (FRANCO i WILSON 1999).

També podrien formar ponts salins la Lys 377 amb els Asp124, Asp 55 (HASTINGS WILSON i WILSON 1998; DING i WILSON 2001b) i/o Asp59 (DING i WILSON 2000; FRANCO *et al.* 2001).

### 1.3.3 Lloc d'unió del sucre

Un cop el sucre s'uneix a la proteïna canvia les seves aigües de solvatació per ponts d'hidrogen amb residus polars com Asn, Gln, Glu i Asp. Per altra banda, també són importants les interaccions hidrofòbiques amb residus aromàtics. Els grups hidroxils poden actuar simultàniament com a donadors i acceptors de ponts d'hidrogen.

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

Mitjançant espectroscòpia de fluorescència i mutants es va proposar, com s'ha comentat abans, un lloc d'unió pel sucre i pel catió en la MelB. Es va arribar a la conclusió que el lloc d'unió del sucre es troba en el C-terminal, concretament a prop de les hèlixs X i XI i que el N-terminal també contribueix en aquesta unió (MUS-VETEAU i LEBLANC 1996). A continuació es va veure que els Trp responsables de la transferència d'energia de fluorescència entre els Trp i el sucre fluorescent són els Trp 64 (llaç 2-3, N-terminal) i Trp 299 (hèlix IX, C-terminal), i es va poder calcular que la distància entre el sucre fluorescent i els Trp 64 i 299 és de 20 i 14 Å respectivament (CORDAT *et al.* 1998). A més, la mutació del Trp 342 fa que el sucre es trobi en un entorn molt més hidrofílic i per tant, les hèlixs IX i X deuen estar pròximes o en el lloc d'unió del sucre. Concloïen que el lloc d'unió del sucre està preferentment en el C-terminal i proper al llaç 2-3 (CORDAT *et al.* 1998).

Per altra banda, amb el foto-marcatge de la MelB amb el sucre p-azidofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosid es va veure que el sucre s'uneix a les hèlixs

X, XI i al llaç 4-5. L'únic aminoàcid marcat d'aquest llaç va ser l'Arg 141 (AMBROISE *et al.* 2000). Estudis del transport del mutant R141C van demostrar que aquesta permeasa no acumula melibiosa, però sí que l'uneix i a més depenent de  $\text{Na}^+$ . El mutant R149C no transporta melibiosa ni pot unir l'anàleg de melibiosa, NPG (AMBROISE *et al.* 2000) i podria correspondre a l'Arg 144 de la permeasa de lactosa.

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

#### **1.3.4 Connexió del lloc d'unió del catió amb el lloc d'unió del sucre**

En molts d'aquests estudis que s'anaven fent per esbrinar el lloc d'unió del sucre, es van anar trobant indicis que aquest es troba pròxim en l'espai al lloc d'unió del catió. La mutació en l'Arg 52 va donar lloc a una disminució en el transport de la melibiosa acoblat a  $\text{Na}^+$  i una absència de transport acoblat a  $\text{H}^+$ , i per tant es va proposar com un aminoàcid clau a l'hora de connectar el lloc d'unió del catió i del sucre (FRANCO i WILSON 1999). A més, altres mutants del llaç 10-11 presentaven canvis en l'afinitat pel catió (DING 2004). En concret, el doble mutant D59K/K377D (D59 es troba implicat en el lloc d'unió del catió i K377 es troba implicat en la unió del sucre) acumula melibiosa acoblada a  $\text{H}^+$  però no acoblada a  $\text{Li}^+$  o  $\text{Na}^+$  (FRANCO *et al.* 2001).

Cordat i col·laboradors (CORDAT *et al.* 2000) van veure que el senyal de fluorescència induït en l'extrem N-terminal per la unió del sucre prové dels Trp116 i 128. A més, la mutació d'aquests Trp a Phe dona lloc a una acumulació baixa de  $\beta$ -galactòsids i canvis en la selectivitat pel catió. Per tant, el Trp116, però sobretot el Trp128 tenen una funció important en el cotransport sodi/sucres, on els dos estan involucrats en la selectivitat pel sucre i pel catió. A més d'aquests mutants, s'ha de tenir en compte que l'hèlix IV té altres aminoàcids que s'han vist que són importants a l'hora de

connectar el lloc d'unió del catió i del sucre: Tyr 120, Asp124 (ZANI *et al.* 1994), Met123 (BOTFIELD i WILSON 1988) i Pro126 (YAZYU *et al.* 1985; BOTFIELD i WILSON 1988). Conjuntament amb això s'ha de tenir en compte que la protecció de l'hèlix IV (i del llaç 4-5) a la proteòlisi degut a la unió del Na<sup>+</sup> per sí sol i de la melibiosa en presència de Na<sup>+</sup> corroboren la predicció de què aquesta hèlix connecta el lloc d'unió del catió i del sucre (GWIZDEK *et al.* 1997).

### 1.3.5 El llaç 10-11

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

La Lys 377, junt amb altres aminoàcids amb càrrega situats al llaç 10-11 de la MelB, es van mutar i caracteritzar (SÉRY 2002), amb les següents conclusions:

- Els residus K359, H361, E365 no semblen ser essencials en la funció del cotransport sucre-catió.
- El residu Glu 357 tampoc és essencial, però la introducció d'un residu neutre en la posició 357 presenta baixa expressió i transport reduït. Per tant deu provocar una inestabilitat de la proteïna dins la membrana. A més, el mutant E357C deixa de reconèixer els sucres amb conformació  $\beta$ .
- La mutació D354C modifica l'eficiència de l'acoblament ió-sucre (SÉRY 2002; DING 2003).
- La R363 deu estar implicat en l'etapa de translocació dels substrats (SÉRY 2002; DING 2003).
- Els residus D351 (SÉRY 2002; DING 2003) i K377 deuen participar en el lloc d'unió del sucre o en la translocació. En el cas del mutant

K377C la reintroducció d'una càrrega positiva recobra parcialment l'acumulació de melibiosa. Val a dir que justament aquests dos residus, D351 i K377, es troben en la zona d'unió del llaç 10-11 amb les hèlixs X i XI. Per tant, podrien tenir un rol d'estabilització d'aquestes hèlixs, que s'ha vist que són importants per a la unió del sucre (MUS-VETEAU i LEBLANC 1996; CORDAT *et al.* 1998; DING *et al.* 2000).

Tots aquests resultats fan pensar que el llaç 10-11 té una funció en l'acoblament entre el catió i el sucre, induint canvis conformacionals a altres parts de la MelB. A conclusions similars arribava (DING 2003, 2004), qui a més va proposar que aquest llaç deu ser un llaç funcional mòbil.

### 1.3.6 El llaç 4-5.

Estudis de proteòlisi van mostrar que l'addició de sodi protegeix aquest llaç de la digestió de les proteases. La presència de melibiosa incrementa l'efecte protector del sodi (GWIZDEK *et al.* 1997). El fotomarcatge de l'Arg141 corrobora la importància d'aquest llaç en la funció de la MelB (AMBROISE *et al.* 2000).

Els residus acídics del llaç 4-5 es troben molt conservats entre els diferents transportadors de la família GPH. Aquests residus es van mutar a Cys i van ser caracteritzats (SÉRY 2002). Encara que els mutants D137C i E140C essencialment no presenten modificacions en el seu transport, el mutant E142C presenta unes propietats semblants al R141C, però en aquest cas conserva un 10% del transport del 3SV. Aquest 10% queda inhibit al reaccionar el mutant amb NEM, indicant l'accessibilitat d'aquest residu al medi aquós. El E142C té una mutació compensatòria I22S. Aquesta mutació compensatòria és la mateixa que es troba pel mutant K377C del llaç 10-11 (DING i WILSON 2000) i per tant indica una proximitat del llaç 10-11 amb el llaç 4-5 i l'hèlix I.

Posteriorment es van mutar els aminoàcids carregats positivament i s'observà que només els mutants R141C i R149C perden la capacitat d'acumular melibiosa (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003). S'ha de tenir en compte que aquests residus es troben molt conservats entre els diferents

organismes de la família GPH. En concret, el mutant R141C presenta unió dependent de  $\text{Na}^+$  d' $\alpha$ - i  $\beta$ -galactòsids, però no és capaç d'acumular melibiosa i a més la melibiosa no augmenta l'afinitat de la MelB pel sodi (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003; MEYER-LIPP 2005). Per tant, el defecte en el transport d'aquest mutant, deu estar en la translocació amb els substrats units o deu tenir una reducció de l'alliberament dels sucres en el compartiment interior (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003). Al no tenir mutacions compensatòries no se li pot donar una funció estructural, i deu participar directament en l'orientació del sucre a l'hora de ser alliberat (SÉRY 2002). A més, el fet que tant el mutant R141K com el mutant R141C al reaccionat amb reactius sulfhídrics carregats positivament recuperen el transport de melibiosa subratlla la importància d'una càrrega positiva en aquesta posició (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003). Tenint en compte que aquests aminoàcids es troben en el llaç 4-5, aquesta estructura deu ser un llaç mòbil que es troba accessible al citoplasma quan no hi ha substrats units, i inaccessible quan el transportador els té units (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003).

En el cas de l'Arg149 es va observar que el mutant R149C no uneix el sucre NPG i que els mutants R149K i R149Q, encara que transporten sucre de forma  $\text{Na}^+$  dependent, tenen una forta reducció per l'afinitat pels  $\alpha$ -galactòsids i no catalitzen l'acumulació de  $\beta$ -galactòsids. Per tant, és possible que l'Arg149 participi directament en la unió de melibiosa a través de ponts d'hidrogen (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003).

S'han fet mesures dels canvis en el senyal elèctric en afegir substrats i s'han relacionat amb resultats de fluorescència i de transferència d'energia (FRET) per treure informació sobre els mecanismes que es troben afectats en el transport dels mutants R141C i E142C respecte 3SV (mutant sense Cys) i el WT-NEM. El N-etil-maleimida (NEM) és un reactiu de grups tiol que ens permet obtenir informació de l'accessibilitat i funcionalitat de les Cys. En la MelB s'ha descrit que el NEM reacciona amb la Cys 364 (WEISSBORN *et al.* 1997). La MelB-NEM mostra el senyal elèctric degut als substrats en totes les condicions. En estudis previs s'havia descrit que la unió del NEM no impedeix la unió dels substrats, encara que no es produeix el transport. En canvi, en els mutants R141C i E142C, no s'observa pràcticament senyal

degut a la unió de melibiosa i pràcticament tot el senyal observat és induït pel sodi (MEYER-LIPP 2005). La reacció del R141C amb un reactiu sulfidric carregat positivament (MTSEA<sup>+</sup>) fa que aquest mutant recobri el 20% del senyal induït per la melibiosa (MEYER-LIPP 2005). Per tant, encara que aquestes permeases mutades no presentin transport de la melibiosa deuen estar inhibides en diferents etapes del transport (MEYER-LIPP 2005).

Aquesta conclusió també l'extreuen d'experiments de fluorescència dels mutants R141C i E142C on, al contrari que el WT, l'addició de melibiosa només fa augmentar lleugerament el senyal de fluorescència (MEYER-LIPP 2005). En canvi, el WT-NEM presenta un augment de fluorescència semblant al de la MelB salvatge. Per tant, tenint en compte que els Trp responsables dels canvis de fluorescència induïts per la unió del sucre es troben en les hèlixs X i XI, es va proposar que les mutacions deuen provocar una incorrecta organització estructural del complex terciari i/o impedir algunes de les interaccions amb el lloc d'unió dels substrats, que deuen ser necessaris per a la translocació i alliberament d'aquests (MEYER-LIPP 2005).

Els mutants R141C i E142C tot i no presentar canvis en la fluorescència del Trp induïts per la melibiosa, sí que s'observen fenòmens de FRET entre el sucre fluorescent (*2'-(N-dansyl) aminoethyl-1-thio-β-D-galactopyranoside*) i els Trp. Per tant es produeix un canvi en l'entorn del sucre degut a la unió de Na<sup>+</sup> (MEYER-LIPP 2005). Més evidències de que hi ha canvis conformacionals defectius en la unió de melibiosa en el R141C s'obtenen mitjançant experiments de proteòlisis. La unió de Na<sup>+</sup> continua protegint, com el WT, el llaç 4-5 de les proteases. Mentre la unió de melibiosa no incrementa l'efecte protector del sodi, al contrari del que s'observa amb el WT (MEYER-LIPP 2005). Tots aquests resultats van dur a la conclusió que els mutants R141C i E142C tenen aturat el seu transport en un estat anterior (3 ↔ 3', veure figura 1.6) en comparació amb la MelB reaccionada amb NEM (3' ↔ 4, veure figura 1.6) (MEYER-LIPP 2005), on l'estat 3' correspondria a l'estat "tancat", com l'observat en el transportador d'oxalat (Ox1T) (HIRAI i SUBRAMANIAM 2004).

## 1.4 Estructura de la MelB

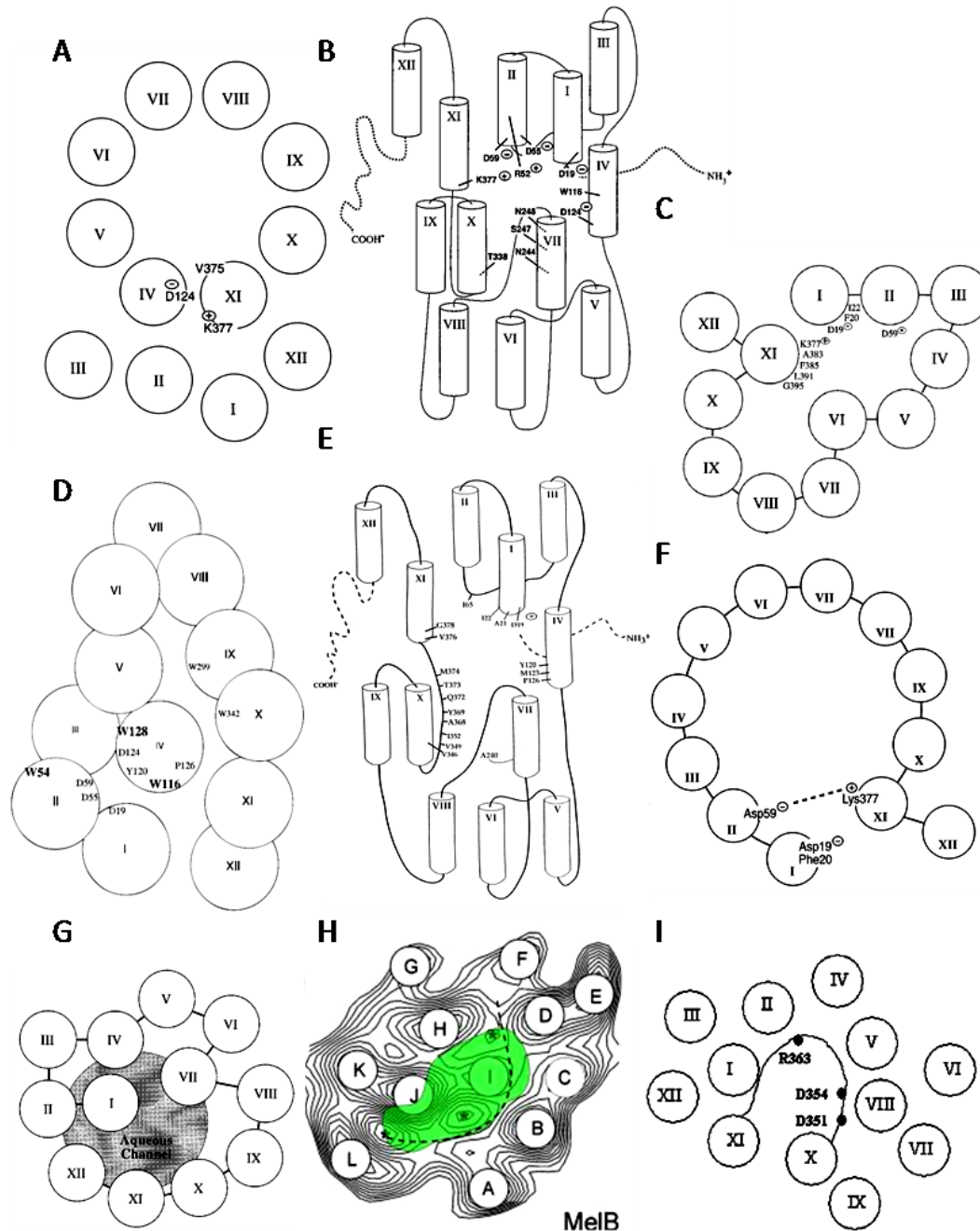
Al no disposar encara de l'estructura 3D amb una resolució prou bona, s'han anat fent propostes sobre l'organització de les hèlixs transmembrana al llarg de l'estudi de la MelB (veure figura 1.8). Per tal de fer aquestes propostes, s'han fet servir mutants d'aminoàcids que se suposa que formen part del lloc d'unió del sucre o del catió, per tant que es troben pròxims en l'espai (DING *et al.* 2000), s'han realitzat mutacions compensatòries (WILSON *et al.* 1995) i s'han substituït els residus per Cys per tal de reaccionar-les amb reactius sulfhídrics o entrecreuar-les amb altres Cys (DING *et al.* 2000; DING i WILSON 2000). La reacció de les Cys amb els reactius sulfhídrics també s'ha utilitzat per veure la seva accessibilitat al medi aquós.

Amb aquests experiments es va veure que l'hèlix I es troba molt exposada al medi aquós (DING i WILSON 2001a), les hèlixs II i XI es troben exposades un 35% (DING 2003) i en canvi l'hèlix VI no mostra accessibilitat al medi aquós i per tant es proposa que es troba molt inserida en la membrana lipídica (DING *et al.* 2001).

El resultats obtinguts foren:

- l'hèlix II estaria a prop de les hèlixs IV, VII i X (FRANCO i WILSON 1999),
- l'hèlix I prop del llaç 10-11 (DING 2004),
- l'hèlix II prop de l'hèlix IV (WILSON *et al.* 1995),
- l'hèlix IV prop de l'hèlix XI (HASTINGS WILSON i WILSON 1998),
- l'hèlix II prop de l'hèlix XI (FRANCO *et al.* 2001),
- l'hèlix I prop de l'hèlix XI (DING i WILSON 2001c),
- les hèlixs I,II, V i XI estarien pròximes (DING i WILSON 2001a), igual que les hèlixs I, IV, VII, X i XI (DING *et al.* 2000).





**Figura 1.8** Evolució de la proposició de la disposició de les hèlixs transmembrana. A, model que mostra la proximitat de les hèlix IV i XI (HASTINGS WILSON i WILSON 1998). B, Model basat en estudis de revertants d'Arg52 (FRANCO i WILSON 1999). C, Model basat en revertants de residus de l'hèlix XI (DING i WILSON 2000). D, Model basat en estudi dels Trp de l'extrem N-terminal (CORDAT *et al.* 2000). E, Model basat en mutants amb anomalies en el reconeixement dels substrats (DING *et al.* 2000). F, Model basat en mutacions compensatòries de la mutació K377V (FRANCO *et al.* 2001). G, Model basat en mutacions puntuals a Cys en l'hèlix I i la seva accessibilitat (DING i WILSON 2001a). H, Model basat en els cristalls 2D obtinguts amb una resolució 8Å (HACKSELL *et al.* 2002). I, Model basat en l'estudi de mutants del loop X/XI (DING 2003).

És interessant observar que en la família de les MFS les hèlixs menys conservades són la III, VI, IX i la XII. Aquestes hèlixs es troben a la perifèria de la molècula, encarades cap a la membrana lipídica (GOSWITZ i BROOKER 1995). És possible que en el cas de la MelB passi el mateix amb les hèlixs E, J, K i L (figura 1.8H). En el cas de l'hèlix VI ja s'ha observat que no és accessible al solvent, i en el cas de les hèlixs III i XII, encara no s'ha trobat cap implicació d'aquestes hèlixs en la funció de la MelB, com per exemple, la unió dels seus substrats.

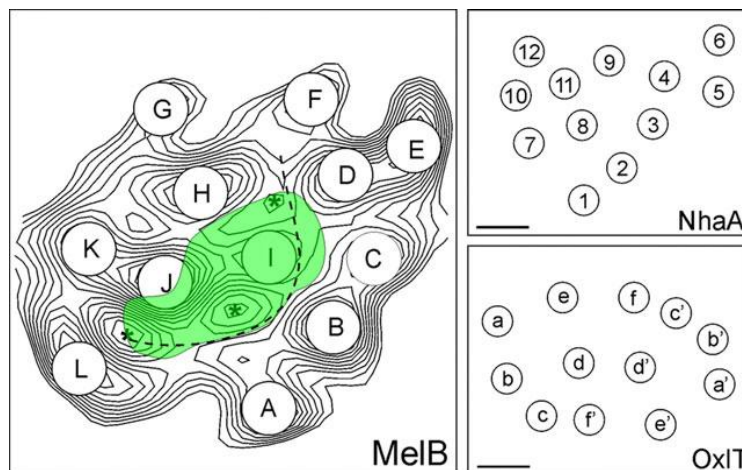
Com s'ha vist en els models obtinguts a partir de la difracció de cristalls de proteïna dels transportadors de la família MFS (ABRAMSON *et al.* 2003), i com també s'ha proposat pels cristalls 2D de la MelB (HACKSELL *et al.* 2002), aquestes hèlixs tenen una inclinació. Per tant, la disposició de les hèlixs vistes des de l'extrem citoplasmàtic pot ser diferent a l'extrem periplasmàtic. En el cas de la MelB, les projeccions a la mateixa alçada de dos transportadors encarats al revés són diferents (PURHONEN *et al.* 2005), indicant una disposició diferent de les hèlixs degut a la inclinació d'aquestes.

#### 1.4.1 Estructures 2D i 3D de la MelB

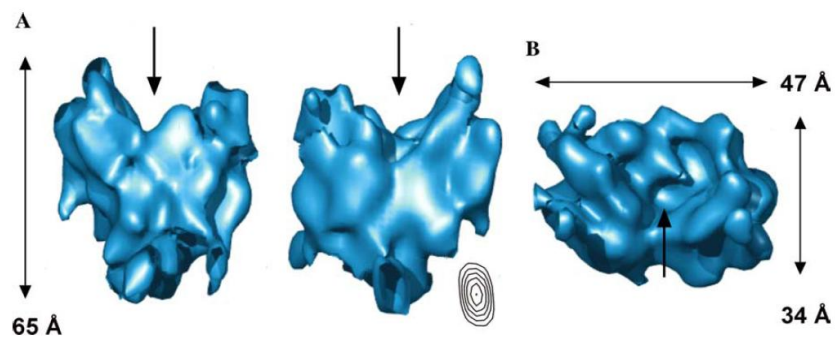
L'estudi de l'estructura de la MelB mitjançant cristalls va començar amb l'observació a 8 Å de cristalls 2D (HACKSELL *et al.* 2002). El mapa de projecció mostra que la mida d'un monòmer és de 49 Å X 37 Å. A partir de les àrees més denses proposen que les hèlixs presenten diferents inclinacions respecte la normal de la bicapa. Un total de 12 hèlixs transmembrana s'assignen a partir d'aquestes àrees més denses (figura 1.9). L'organització d'aquestes àrees és asimètrica, amb sis col·locades en un costat i sis en un altre, separades per una regió de menys densitat. Aquesta organització asimètrica s'observa en el transportador NhaA (WILLIAMS 2000), però no en el transportador d'oxalat (OxIT) (HEYMANN *et al.* 2001). Per tant, podria ser un motiu característic dels transportadors Na<sup>+</sup>-depenent.

També s'ha obtingut l'estructura 3D de la MelB però amb una resolució de només 10 Å (PURHONEN *et al.* 2005). L'altura del transportador és de 65 Å.

L'estructura mostra que la MelB està oberta cap a un costat de la membrana, però tancada cap a l'altre costat (com s'ha observat anteriorment en les estructures de la LacY i del GlpT). Com també s'ha observat en la projecció 2D, s'aprecien dues zones de l'estructura amb densitats diferents, que deuen correspondre a les hèlixs transmembrana, indicant que algunes d'aquestes hèlixs deuen estar significativament inclinades. Aquesta estructura es va superposar a les dels transportadors de lactosa (LacY) i el transportador glicerol-3-fosfat (GlpT) i encara que en els dos casos hi ha bastant similitud, hi ha zones que no se superposen. En canvi s'observen millors superposicions, sobretot en la zona transmembrana, amb el transportador NhaA (PURHONEN *et al.* 2005).



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



**Figura 1.10** Estructura 3D de la MelB. L'estructura 3D de la MelB (10 Å de resolució) presenta una molècula amb forma de cor composta de dos dominis. A, Vista de la molècula des de diferents costats al llarg del pla de la membrana. B, Vista superior, per on la molècula està oberta. La posició de la cavitat interior entre els dos dominis està marcada amb una fletxa (PURHONEN *et al.* 2005).

## 1.5 Estructures 3D dels transportadors de membrana

### 1.5.1 Estructures 3D dels transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana

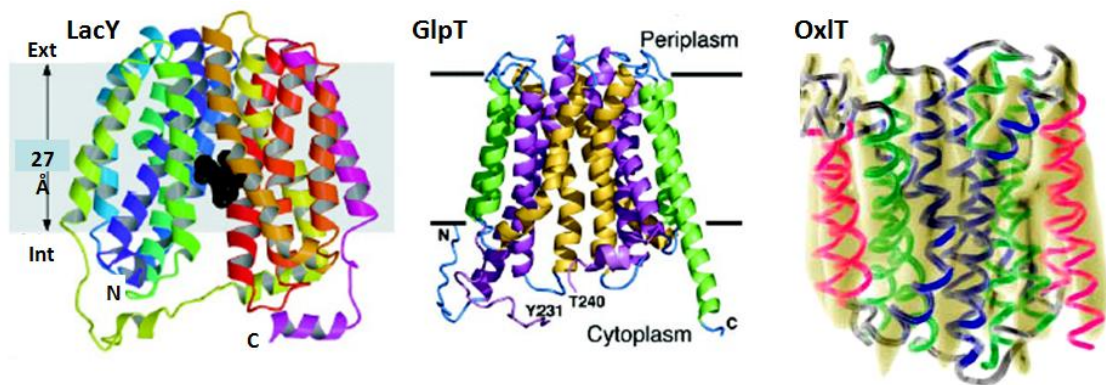
L'estudi dels transportadors de membrana, i en concret dels transportadors de sucres, que són els que presenten més interès per a aquest estudi, ha fet un salt molt important fa pocs anys gràcies a la cristal·lització de la permeasa de lactosa (LacY) (ABRAMSON *et al.* 2003; GUAN *et al.* 2007) i d'altres transportadors de la superfamília de facilitadors majors de membrana (MFS) com són el transportador glicerol-3-fosfat d'*E. coli* (GlpT) (HUANG *et al.* 2003; YEH *et al.* 2008) i el transportador d'oxalat (OxlT) (HIRAI i SUBRAMANIAM 2004).

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

Els cristalls de la LacY (3,4 Å de resolució), del GlpT (3,3 Å de resolució) i de l'OxlT (6,5 Å de resolució) mostren l'estructura esperada de 12 hèlixs transmembrana (figura 1.11), on 6 d'aquestes hèlixs es troben agrupades en el N-terminal i les altres 6 en el C-terminal, amb una cavitat formada entre

les hèlixs I, II, IV i V (N-term) i VII, VIII, X i XI (C-term) en el cas de la LacY. Encara que aquestes proteïnes no tenen una seqüència molt semblant, s'ha vist que l'estructura es troba més conservada en proteïnes de la mateixa família que no pas la seva seqüència (VARDY *et al.* 2004).

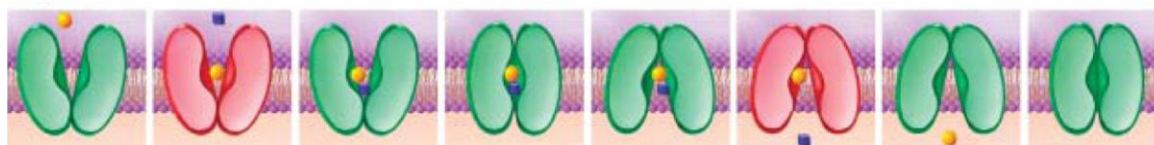
Una de les característiques més rellevants d'aquests cristalls de la LacY i d'altres transportadors és que les hèlixs transmembrana presenten curvatures o altres tipus d'irregularitats (LOCHER *et al.* 2003).



**Figura 1.11** Estructures 3D de la permeasa de lactosa (LacY) (ABRAMSON *et al.* 2003), del transportador glicerol-3-Phosphate (GlpT) (HUANG *et al.* 2003) i del transportador d'oxalat (OxlT) (HIRAI i SUBRAMANIAM 2004)

El cristall de la LacY mostra un transportador amb unes dimensions de 30 x 60 Å i apareix amb un sucre homòleg de la lactosa,  $\beta$ -D-galactopiranosil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosid (TDG) unit. Aquest transportador correspon al mutant C154G que té la peculiaritat que “atrapa” a la proteïna en una conformació que està encarada cap al citoplasma (*inward-facing*). L'estructura de la LacY, i també de la GlpT, corroboren l'assumpció que el mecanisme de transport comporta l'adopció per part de la proteïna d'una sèrie de canvis conformacionals que li permeten tenir el lloc d'unió dels substrats alternativament encarat cap a un cantó o cap a un altre, però no cap als dos cantons alhora (LOCHER *et al.* 2003). Dintre d'aquests canvis conformacionals hi deuen haver canvis en les inclinacions i en les posicions de les hèlixs transmembrana. El problema és que tant la LacY com el GlpT estan cristal·litzats orientats cap al citoplasma

(*inward-facing*), per tant, el primer objectiu per a futurs experiments és obtenir alguna d'aquestes proteïnes en la conformació encarada cap a l'exterior (*outward-facing*). En el cas de l'OxIT la proteïna es troba en un estat que s'anomena *tancat*, degut a que el transportador no es troba obert cap a cap cantó. Per tant, (HIRAI i SUBRAMANIAM 2004) proposen unes seqüències pel transport dels substrats, tant per al simport, uniport i antiport, en el que introdueixen un nou estat, a més de les dues posicions alternades cap a l'espai periplasmàtic i citoplasmàtic. Aquest nou estat correspon a una conformació en la que la proteïna es troba en un estat tancat, sense accés per cap dels costats (figura 1.12).



**Figura 1.12** Descripció dels diferents estats en el transport simport. Els estats en vermell indiquen estats en què la proteïna no pot translocar. Els transportadors simports no poden translocar quan tenen un sol substrat unit (HIRAI i SUBRAMANIAM 2004).

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

Un dels aspectes més interessants en l'estructura de la LacY és que ens permet observar els aminoàcids involucrats en la unió del sucre. Entre ells trobem que els més interessants per aquest treball són (figura 1.13):

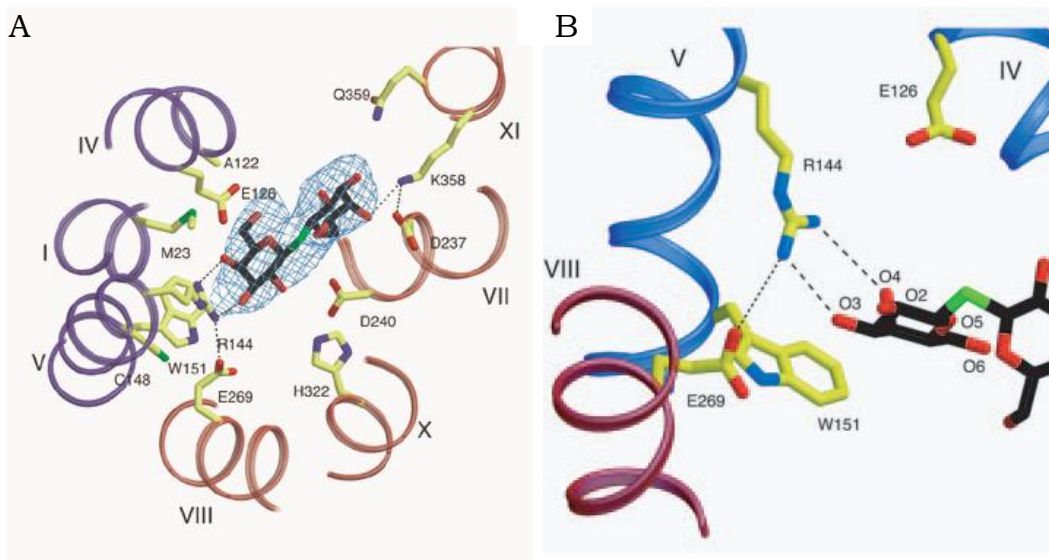
- **Trp151:** Aquest residu es troba en l'hèlix V i deu fer interaccions hifrofòbiques amb el sucre mitjançant el seu anell per tal d'orientar-lo. En el cas de la MelB es va observar que els mutants W299F, W342F i W299F/W342F presenten una afinitat menor pel sucre encara que no impedeixen el transport d'aquest (MUS-VETEAU i LEBLANC 1996). En canvi, els mutants W116F i W118F (que es

troben en l'hèlix IV) redueixen l'activitat de la MelB (CORDAT *et al.* 2000). En un estudi comparatiu entre vàries proteïnes que uneixen galactosa s'observa que totes aquestes proteïnes tenen un residu aromàtic en el lloc d'unió del sucre i proposen que el sucre pot lliscar per sobre d'aquesta cadena lateral per tal d'establir interaccions òptimes amb els altres residus que formen part del lloc d'unió del sucre (SUJATHA i BALAJI 2004).

- **Glu126:** De l'estructura es pot deduir que segurament interacciona amb el sucre mitjançant una aigua. En la MelB trobem un Asp a la posició 124 que, encara que aquest residu se suposa que està a prop o forma part del lloc d'unió del catió (POOLMAN *et al.* 1996), també podria interaccionar amb el sucre (ZANI *et al.* 1994).
- **Lys358:** Forma un pont d'hidrogen amb el sucre i un pont salí amb l'Asp237. En la MelB trobem que el mutant K377V té el transport de melibiosa reduït (FRANCO *et al.* 2001). Però actualment no hi ha res descrit de si forma pont salí amb l'Asp231 (que seria el més proper a l'Asp de la LacY). En canvi a aquesta Lys se li prediu que forma un pont salí amb l'Asp59 i/o amb l'Asp124 (HASTINGS WILSON i WILSON 1998; FRANCO *et al.* 2001).
- **Glu269:** Aquest residu se suposa que és responsable de l'acoblament entre el lloc d'unió del sucre en el N-term i el lloc de protonació en el C-term. En el cristall es proposa que aquest residu forma un pont salí amb l'Arg144 quan té el substrat unit. Posteriorment, es va proposar que el Glu269 forma un pont d'hidrogen amb el grup NH del Trp151 durant el transport del sucre (VÁZQUEZ-IBAR *et al.* 2004).
- **Arg144:** Aquest residu se situa en l'hèlix V i forma un doble pont d'hidrogen amb els oxígens 3 i 4 del sucre. En la MelB trobem dues Arg en les posicions 141 i 149 que s'ha vist que són importants per a la unió del sucre (AMBROISE *et al.* 2000; ABDEL-DAYEM *et al.* 2003). Concretament el mutant R149C no uneix sucre i per tant deu ser el



que deu establir aquests ponts d'hidrogen. A més en altres proteïnes que uneixen galactosa (SUJATHA i BALAJI 2004) s'ha observat que la presència d'un aminoàcid polar que forma un pont d'hidrogen amb el grup hidroxil O<sub>4</sub> de la galactosa és una característica del lloc d'unió d'aquest sucre. S'ha de tenir en compte que l'O<sub>4</sub> de la galactosa és axial, en canvi en la glucosa és equatorial, i per tant és un dels punts més importants per determinar l'especificitat pel sucre.

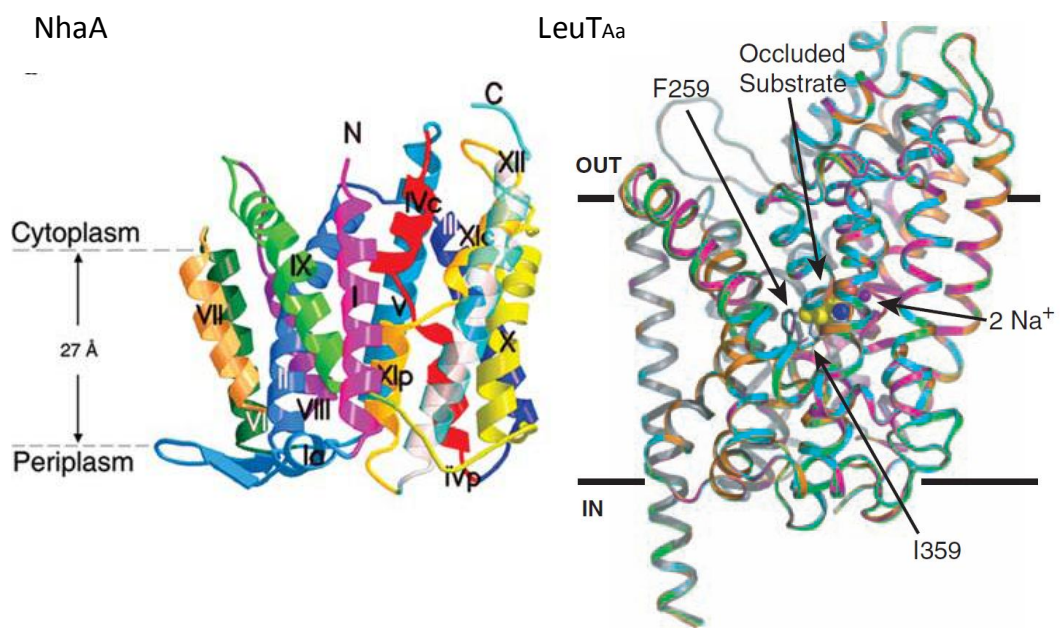


**Figura 1.13** Unió del sucre en la permeasa de lactosa. A, Residus involucrats en la unió del TDG. També es presenta el mapa de densitat electrònica pel TDG. Els possibles ponts d'hidrogen i els ponts salins estan representats per línies negres discontinües. Les hèlixs en el N- i C-terminal estan pintades de color blau i vermell respectivament. Els colors pels àtoms són: groc, carbonis en les cadenes laterals; negre, carbonis en el TDG; blau, nitrogens; vermell, oxígens; verds sulfurs (ABRAMSON *et al.* 2003). B, Proposta de pont d'hidrogen entre el Glu269 i el Trp151 (VÁZQUEZ-IBAR *et al.* 2004).

### 1.5.2 Estructures 3D de transportadors que uneixen Na<sup>+</sup>

Un altre substrat que uneix la proteïna estudiada en aquest treball és el Na<sup>+</sup>. Recentment també s'han resolt les estructures 3D de dos transportadors de membrana de 12 hèlixs  $\alpha$  que transporten Na<sup>+</sup> (figura 1.14).

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

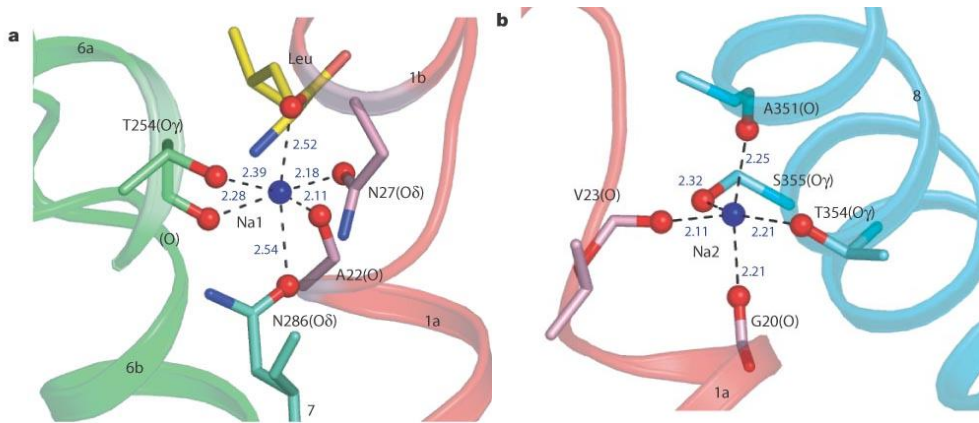


**Figura 1.14** Estructures 3D del transportador antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NhaA) (HUNTE *et al.* 2005) i del transportador de Leucina dependent de  $\text{Na}^+/-$  (LeuTAa) (YAMASHITA *et al.* 2005).

L'altre transportador comentat és el transportador de Leucina dependent de  $\text{Na}^+/-$  (LeuTAa) (resolució 1,65 Å) (YAMASHITA *et al.* 2005). Aquest transportador pertany a la família dels transportadors de neurotransmissors que es troben dintre NhaA LeuTAa de la superfamília dels transportadors simports  $\text{Na}^+/\text{solut}$  (REIZER *et al.* 1994) a la qual també pertany la MelB. En el seu cristall es tornen a observar 12 hèlixs transmembrana, dues d'elles amb discontinuïtats que corresponen a unes estructures més extenses. Els dos  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}1$  i  $\text{Na}2$ ) que uneix la proteïna es

troben a prop d'aquestes estructures extenses. El primer  $\text{Na}^+$  es troba unit amb una coordinació octaèdrica (figura 1.15). Els aminoàcids involucrats són molt variats i no només hi participen les cadenes laterals, si no que també hi participen el carboxil de la leucina i els carbonils de l'Ala 22 i la Thr 254. El segon  $\text{Na}^+$  té una coordinació bipiramidal triangular (figura 1.15). És curiós que l'únic lligant portant una càrrega sencera sigui l'oxigen del grup carboxílic de la Leucina.

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



**Figura 1.15** Llocs d'unió del sodi en el transportador de Leucina depenent de  $\text{Na}^+/-$ . A, Es mostra el Na1 i els seus lligands, els residus de TM1a, TM1b, TM6a i TM7 junt amb la Leucina unida. B, Es mostra el Na2 i els seus lligands, els residus de TM1a i TM8. Les distàncies (Å) estan en lletres blaves (YAMASHITA *et al.* 2005).

## 1.6 Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia d'infraroig

Els experiments presentats en aquest treball són la continuació d'uns estudis previs sobre la MelB utilitzant l'espectroscòpia d'infraroig. A continuació es farà un petit resum d'aquest estudi amb els resultats i les conclusions més destacades o les més rellevants per aquest treball.

### 1.6.1 Espectres d'absorció d'infraroig de proteoliposomes de la MelB salvatge en H<sub>2</sub>O i D<sub>2</sub>O

L'amida I presenta un màxim d'absorció a 1657 cm<sup>-1</sup> i l'amida II a 1545 cm<sup>-1</sup>. La desconvolució de l'amida I dona lloc a dues bandes principals a 1660 cm<sup>-1</sup> i 1653 cm<sup>-1</sup> que s'assignen principalment a hèlixs  $\alpha$  tipus I i II, respectivament. A més, l'amida I està composta d'altres bandes que es poden assignar a diferents tipus d'estructura secundària. Per tal d'ajudar a l'assignació de totes aquestes bandes també es va obtenir l'espectre dels proteoliposomes en presència de D<sub>2</sub>O. Les assignacions i el percentatge de cada estructura es poden observar a la taula 1.3 (DAVE *et al.* 2000). El tant per cent d'hèlix  $\alpha$  trobat està en concordança amb la predicció de 12 hèlixs transmembrana. A més d'aquests espectres també es va realitzar l'espectre d'absorció de la proteïna solubilitzada en el detergent dodecil maltòsid (DDM) (que encara es manté activa).

**Taula 1.3** Composició de l'estructura secundària i assignacions del transportador de melibiosa d'*E. coli* (DAVE *et al.* 2000).

H <sub>2</sub> O			D <sub>2</sub> O		
Número d'ona (cm <sup>-1</sup> )	% àrea	Assignació	Número d'ona (cm <sup>-1</sup> )	% àrea	Assignació
1683 1676 1669	17	Girs reversos	1683 1678 1671 1665	16	Girs reversos
1660 1653	49	$\alpha$ , no ordenada	1660 1653	42	$\alpha$
1647	12	$3_{10}$ , llaços oberts, $\alpha$	1646	13	No ordenada, $\alpha$
1640 1634+1628	20	Làmina $\beta$	1638 1629	29	Làmina $\beta$ , $3_{10}$ , llaços oberts

Aquest espectre continua presentant dues bandes assignables a hèlixs  $\alpha$  situades a 1658 i 1651  $\text{cm}^{-1}$  i, encara que s'observen diferències en la posició d'altres bandes, els espectres de la proteïna solubilitzada i reconstituïda són similars.

### **1.6.2 Canvis conformacionals de la MelB salvatge induïts per l'addició de substrats**

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

### **1.6.3 Estudi del bescanvi H/D per espectroscòpia d'ATR-FTIR**

Mitjançant el bescanvi H/D no només es pot obtenir informació dels canvis conformacionals globals de la proteïna en unir els substrats, si no que a més es pot obtenir informació dels canvis estructurals en cadascuna de les estructures secundàries per separat. Per realitzar això, s'exposa una mostra de proteoliposomes de MelB a una atmosfera saturada de  $\text{D}_2\text{O}$  i s'observa com varia el bescanvi H/D en afegir els substrats (per a més detalls experimentals mirar (DAVE *et al.* 2002)).

### 1.6.3.1 Bescanvi H/D de la MelB salvatge

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

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

L'anàlisi del bescanvi H/D per a cada estructura secundària indica que les estructures de làmina β tenen un bescanvi que depèn de quin substrat es troba unit a la MelB, amb un comportament similar, però no igual, que el bescanvi global de la proteïna, i on en el cas del complex MelB·H<sup>+</sup>, el bescanvi és de tan sols el 40%. Les estructures hèlixs α i girs reversos també estan protegits per la unió de sucre, però amb un menor grau. Prediccions de l'estructura secundària de la proteïna suggereixen que els llaços 4-5 i 10-11 contenen estructura de làmina β. S'ha vist que aquests llaços són importants pel transport (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003; DING 2003) i que el llaç 4-5 intervé en la unió del sucre (AMBROISE *et al.* 2000). Per tant, la variació del bescanvi H/D en les làmines β en afegir els substrats indica uns possibles canvis conformacionals en els llaços citoplasmàtics 4-5 i/o 10-11.

### 1.6.3.2 Bescanvi H/D del mutant R141C

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

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

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

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

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

La presència de bandes a 3296 cm<sup>-1</sup> (amida A), 1660 cm<sup>-1</sup> (amida I) i 1543 cm<sup>-1</sup> (amida II) en l'espectre de dicroisme indiquen que existeixen estructures helicoïdals orientades al llarg de la membrana. També s'observa

una espatlla corresponent a les tirosines a  $1516\text{ cm}^{-1}$ , indicant que almenys algunes d'elles estan orientades. El bescanvi H/D confirma l'assignació d'aquestes bandes a hèlixs  $\alpha$ .

També es va mesurar el canvi d'inclinació dels segments transmembrana en afegir els substrats. Els complexos MelB·H<sup>+</sup> i MelB·melibiosa·H<sup>+</sup> contenen els segments transmembrana més pròxims a la perpendicular a la membrana amb un angle mitjà al voltant de  $26^\circ$ , seguit del complex MelB·melibiosa·Na<sup>+</sup> amb  $30^\circ$  i per últim el complex MelB·Na<sup>+</sup> amb un angle de  $36^\circ$ .

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

### **1.6.5 Estudi de la MelB i R141C mitjançant espectres de diferència induïts pels substrats per ATR-IR**

Els espectres de diferència d'infraroig induïts pels substrats s'obtenen fent passar tampó per sobre dels proteoliposomes dipositats a sobre d'un cristall d'ATR i alternant tampons sense i amb substrats. Per això, per tal de realitzar els espectres de diferència degut a la unió de substrats és necessari que el film de proteoliposomes a sobre el cristall d'ATR no es desenganxi amb al flux de tampó sobre seu. En les diferents proves s'observa que el film de proteoliposomes és molt estable dintre els intervals de temps desitjats (LEÓN 2006).

També es van estudiar altres paràmetres que podien influir en l'obtenció dels espectres de diferència com són: la variació de pH i de força iònica, l'absorbància dels substrats, la unió no específica de sucres que no són substrats de la MelB i la possible contribució dels lípids en la diferència (LEÓN 2006). A l'hora d'adquirir els espectres de diferència és important mantenir la mateixa força iònica en els dos tampons que passen per sobre



la mostra, per evitar variacions en el gruix del film de proteoliposomes, que dóna lloc a pics i bandes amples en l'espectre de diferència que no corresponen a canvis conformacionals de la proteïna i que són deguts a variacions en la compactació del film i pertorbacions en la absorptivitat de l'aigua. Petites diferències de força iònica (2 mM) es poden corregir, en canvi diferències més grans de força iònica (>5 mM) poden donar lloc a problemes a l'hora de la correcció, no tan sols per la variació del gruix del film, si no també per la diferència en la banda de l'aigua que absorbeix just a sobre de l'amida I. Això és degut a que la posició de la banda de l'aigua és sensible a la presència de cations (GOORMAGHTIGH *et al.* 1994).

Però el més important a l'hora de fer les diferències és que els dos tampons tinguin el mateix pH. Petites diferències de pH (de l'ordre de 0,2 unitats) donen lloc a distorsions degudes a variacions en el gruix del film que es poden arribar a corregir. En canvi, diferències grans de pH (>0.5), que serien les necessàries per veure canvis en l'estat de protonació de les cadenes laterals, donen lloc a distorsions en l'espectre molt difícils o impossibles de corregir (LEÓN 2006).

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

Finalment, els sucres que no són substrats de la MelB, com seria el cas de la sacarosa, no donen lloc a pics inespecífics, i tampoc s'observen pics deguts a la interacció dels lípids amb els substrats de la MelB (LEÓN 2006), confirmant que les diferències que se observen s'originen selectivament per canvis induïts per la unió dels substrats a la MelB.

#### *1.6.5.1 Accessibilitat de les estructures que intervien en els espectres de diferència*

El bescanvi H/D ens permet calcular el grau d'accessibilitat de la proteïna al medi aquós (DAVE *et al.* 2002). A partir dels espectres de diferència en H<sub>2</sub>O i D<sub>2</sub>O s'ha obtingut el bescanvi només de les estructures que han sofert un canvi conformacional. En la diferència deguda a la unió de Na<sup>+</sup> s'ha obtingut un bescanvi del 80% aproximadament i en la diferència

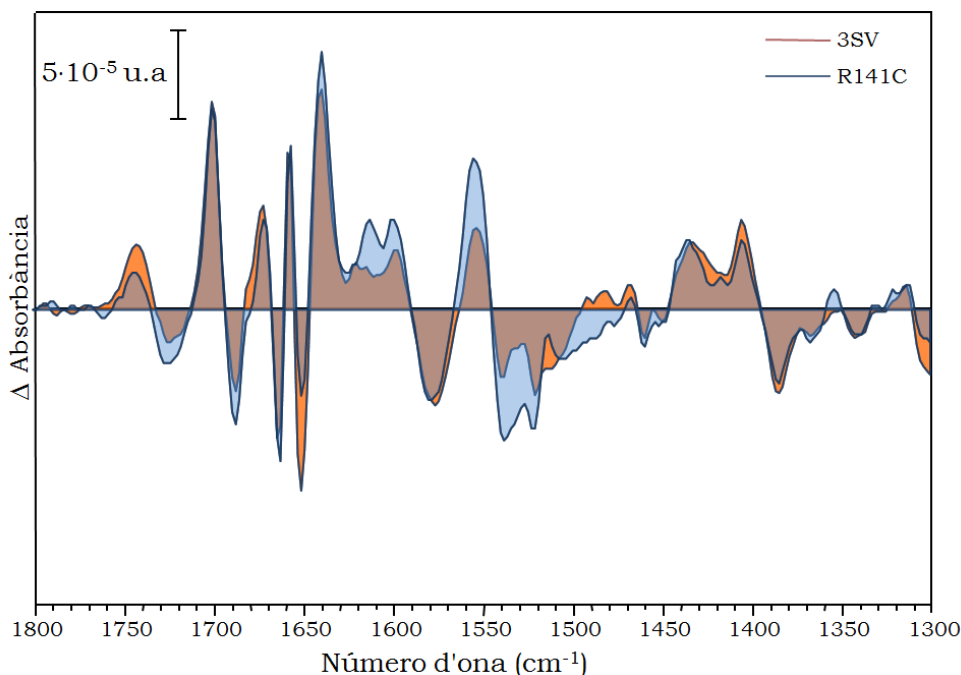
deguda a la unió de melibiosa en presència de Na<sup>+</sup> del 55%, semblant al bescanvi global de la proteïna que és del 56%. Per tant, les estructures modificades per la unió de Na<sup>+</sup> són molt més accessibles al solvent que no pas les modificades per la unió de melibiosa (LEÓN 2006).

#### 1.6.5.2 Canvis estructurals induïts per la unió de Na<sup>+</sup> o Li<sup>+</sup>

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

En els espectres de diferència deguts a la unió de Na<sup>+</sup> (veure figura 1.16) s'observen canvis en una varietat d'estructures secundàries (LEÓN 2006). S'observen pics en la zona d'absorció de les hèlixs  $\alpha$  que deuen ser deguts principalment a un canvi en la inclinació d'aquestes hèlixs, ja que es pot demostrar que una variació en la inclinació dona lloc a un canvi en la intensitat de la banda de l'espectre d'absorbància (ROTHSCHILD *et al.* 1993; BAENZIGER i CHEW 1997; MARSH 1999).

També s'observen canvis en estructures secundàries com làmines  $\beta$ , girs reversos i estructures desordenades. Els canvis en l'estructura de làmina  $\beta$  poden ser deguts a canvis en els llaços 4-5 i 10-11 que podrien contenir estructura de làmina  $\beta$  (DAVE *et al.* 2002). Els pics corresponents a totes aquestes estructures no es veuen afectats en el mutant R141C (veure figura 1.15). Això era d'esperar ja que la interacció del Na<sup>+</sup> amb el R141C és comparable a la del WT, degut a que el Na<sup>+</sup> encara activa la unió de  $\alpha$ -(<sup>3</sup>H)NPG (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003), incrementa l'emissió de fluorescència del sucre fluorescent Dns<sup>2</sup>-S-Gal (MEYER-LIPP 2005) i indueix el senyal elèctric ràpid (MEYER-LIPP 2005). A més a més, la constant d'activació del Na<sup>+</sup> per a la unió del  $\alpha$ -NPG (SÉRY 2002; ABDEL-DAYEM *et al.* 2003), i la concentració de saturació mitja pel Na<sup>+</sup> (MEYER-LIPP 2005) no estan alterades. Per tant, l'Arg141 no deu participar en la unió del Na<sup>+</sup> (MEYER-LIPP 2005).



**Figura 1.16** Espectre de diferència induït per sodi per a MelB silvestre (taronja) i per al R141C (blau)(LEÓN 2006).

### 1.6.5.3 Canvis estructurals induïts per la unió de melibiosa

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

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

En general es tornen a observar pics corresponents a estructures hèlixs  $\alpha$ . Alguns d'aquests pics corresponen probablement a les mateixes hèlixs  $\alpha$  que han estat modificades pel  $\text{Na}^+$  (o  $\text{Li}^+$ ), ja que tenen la mateixa posició i pot ser que hagin sofert alguna variació més com un canvi d'entorn o d'orientació amb la presència de la melibiosa (LEÓN 2006).

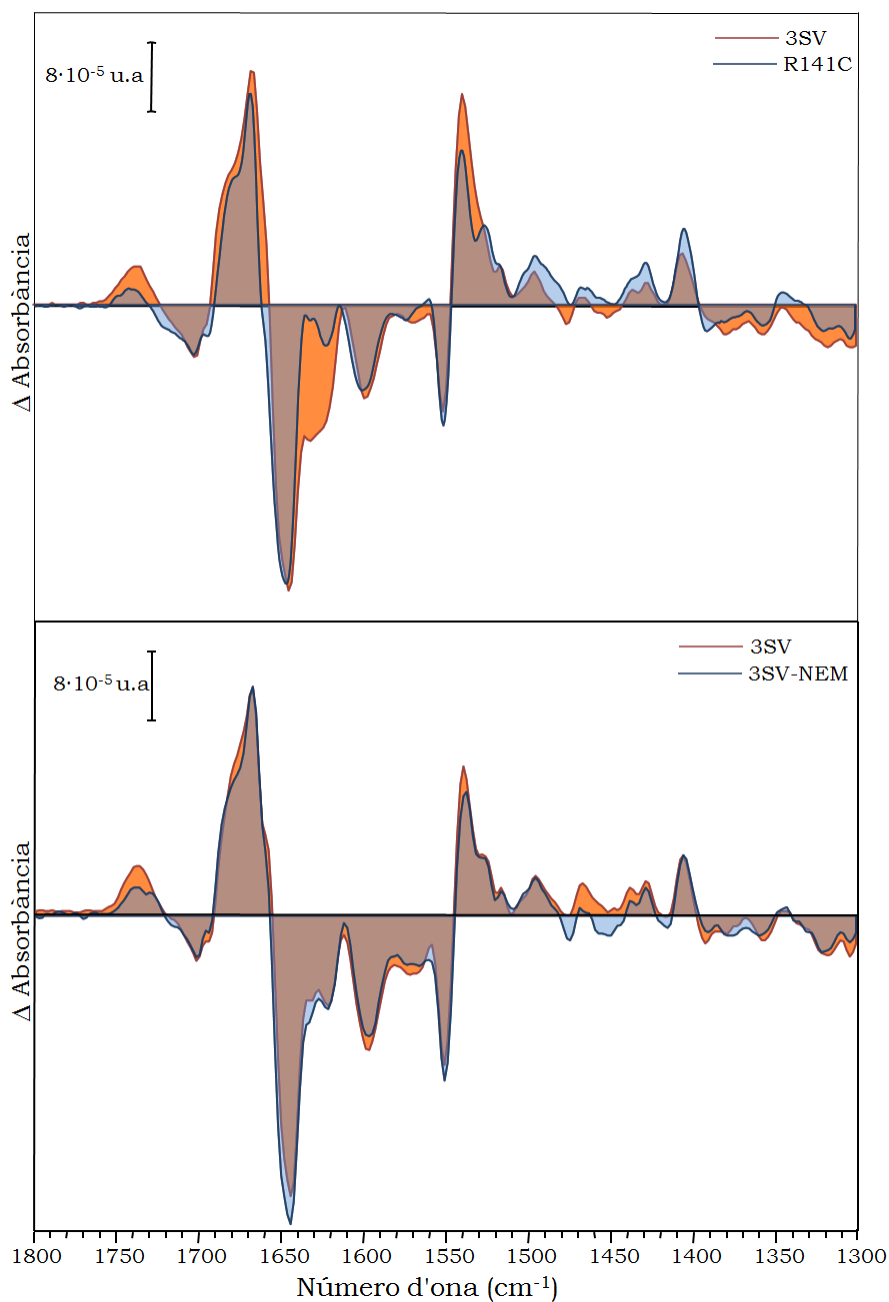
Per tant, aquests canvis de les hèlixs transmembrana es deuen reflectir en l'espectre de diferència amb pics positius i negatius (LEÓN 2006).

Un dels pics assignats a hèlixs  $\alpha$  desapareix en el mutant R141C (veure figura 1.17A), indicant que aquest grup d'hèlixs  $\alpha$ , que prèviament han estat modificades pel catió  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$ , no es veuen modificades en afegir el sucre. En la unió de melibiosa en presència de  $\text{H}^+$ , aquest grup d'hèlixs no ha estat prèviament modificat per la unió del sodi, per tant la unió del sucre provoca un canvi en aquestes hèlixs semblant a l'observat en l'espectre de diferència induït pel sodi (LEÓN 2006). Com ja s'ha comentat anteriorment aquest pic i d'altres a números d'ona propers poden correspondre a un canvi en la inclinació de les hèlixs  $\alpha$ . Per tant, en el R141C algunes d'aquestes variacions d'inclinació en les hèlixs  $\alpha$  podrien no produir-se en aquesta permeasa, i això podria estar relacionat amb la seva manca de capacitat transprotadora (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003).

En canvi, en les diferències de la MelB-NEM induïdes per la interacció de melibiosa (veure figura 1.17B), no només no hi ha pics assignats a hèlixs  $\alpha$  que desapareguin, si no que a més apareix un nou pic negatiu de poca intensitat en la diferència deguda a la unió de melibiosa en presència d' $\text{H}^+$  que es pot assignar a estructura d'hèlix  $\alpha$ . Per tant, la reacció del NEM amb la MelB no afecta pràcticament a les hèlixs  $\alpha$  observades mitjançant espectres de diferència (LEÓN 2006).

Les làmines  $\beta$  també es veuen afectades per la interacció de la melibiosa. Aquesta variació estructural era d'esperar tenint en compte que tant el llaç 4-5 com el llaç 10-11 s'han proposat que es tracten de llaços mòbils funcionals (ABDEL-DAYEM *et al.* 2003; DING 2004) i que la seva estructura secundària podria contenir làmines  $\beta$  (DAVE *et al.* 2002). En els espectres de diferència del mutant R141C s'observa que els pics corresponents a estructures  $\beta$  estan modificats en comparació als espectres de diferència del WT. En concret, el pic a  $1633\text{ cm}^{-1}$  (-) desapareix i n'apareix un altre a  $1637\text{ cm}^{-1}$  (+). En canvi, aquests pics corresponents a estructura  $\beta$  no pateixen modificacions en la MelB reaccionada amb NEM. Per tant, el pic negatiu a  $1633\text{ cm}^{-1}$  que desapareix en el R141C en totes les condicions

d'unió de melibiosa, podria correspondre al llaç 4-5, ja que l'Arg141 està situada en aquest llaç (LEÓN 2006).



**Figura 1.17** Espectres de diferència induïts per la melibiosa en presència de sodi. A, Espectre en taronja WT i en blau R141C. B, Espectre en taronja de WT i en blau de WT unit a NEM.

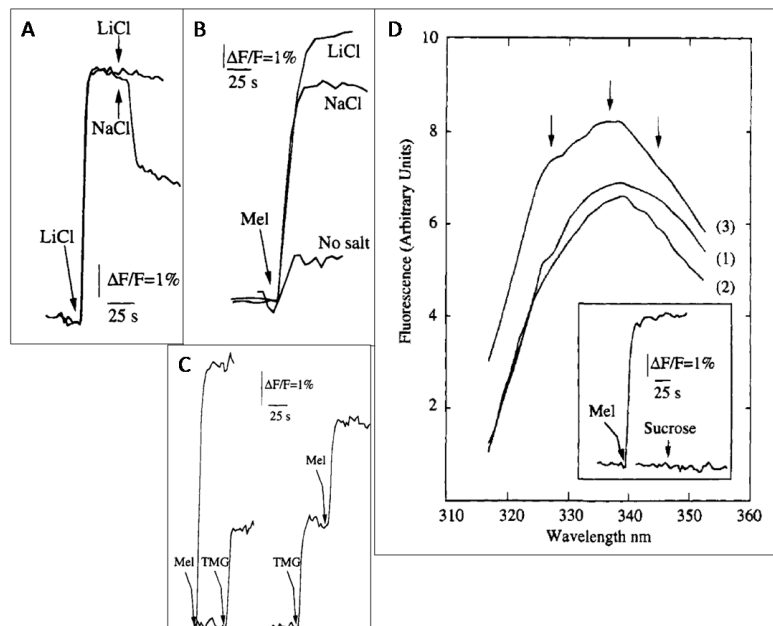
Finalment, la unió de melibiosa també provoca canvis en els girs reversos. Els pics corresponents a aquestes estructures també es troben modificats en el mutant R141C, però el més interessant és que és l'única

estructura que es troba modificada en els espectres de diferència deguts a la unió de melibiosa en presència de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$  de la MelB-NEM. Per tant, aquestes estructures deuen ser importants en els canvis estructurals implicats en la translocació dels substrats (LEÓN 2006).

## 1.7 Estudi de la MelB mitjançant espectroscòpia de fluorescència

L'espectroscòpia de fluorescència dels residus triptòfans de la proteïna és un mètode important per estudiar els aspectes dinàmics i estàtics, tant de l'estructura com de la funció de la proteïna (Brandolin et al., 1985; Pearce, 1990; Martineau et al., 1990; Walmsley et al., 1993).

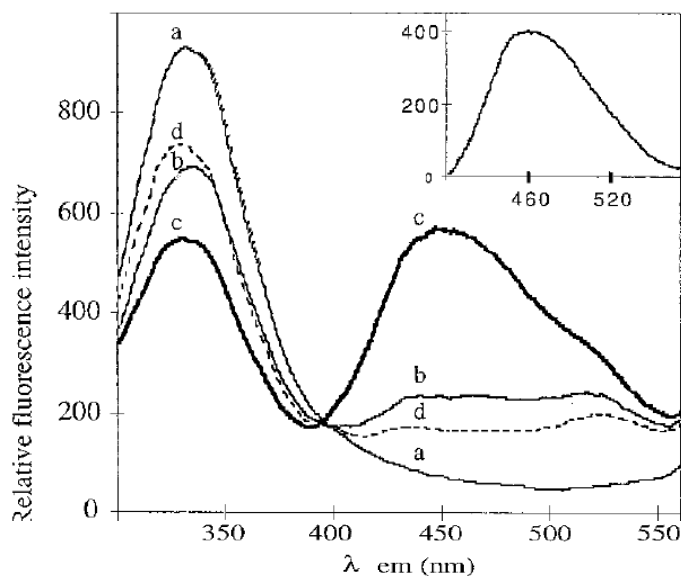
S'ha estudiat la fluorescència intrínseca generada pels 8 residus triptòfans que conté la MelB. La fluorescència d'aquests és modificada selectivament per la interacció dels substrats: catió i/o sucre (veure figura 1.18). El sucre produeix un increment de la fluorescència que és més gran en presència de sodi o liti que de protó (figura 1.18B), mentre que la unió del catió sol produeix una disminució de la fluorescència específica (figura 1.18D).



**Figura 1.18** **A**, Increment de fluorescència de la MelB en presència de Melibiosa 10 mM al afegir liti (4 mM) i desplaçament competitiu a l'afegir després sodi (20 mM). **B**, Increment de fluorescència en presència dels diferents cations (10 mM) al afegir melibiosa (10 mM). **C**, Increment de la fluorescència de la MelB en presència de sodi 10 mM al afegir diferents sucres. Al igual que els cations s'observa un desplaçament competitiu. **D**, Espectre de fluorescència de la melB sola (1), amb sodi (10 mM) (2) i amb sodi (10 mM) i melibiosa (10 mM) (3) (MUS-VETEAU *et al.* 1995).

Aquests canvis de fluorescència que s'han observat no són bloquejats per l'acilació de la permeasa amb NEM. Aquests resultats suggereixen que els canvis de fluorescència induïts pel substrat estan relacionats amb la formació del complex MelB-sucre-catió en les primeres etapes, ja que l'acilació amb NEM bloqueja el transport en etapes posteriors (MUS-VETEAU *et al.* 1995).

Tal com s'observa en la figura 1.18D, el màxim de fluorescència s'observa a 337 nm, suggerint que alguns dels Trp es troben en dominis de polaritat reduïda. Això concorda amb el model de l'estructura de la MelB que mostra que 5 dels 8 Trp es troben en les hèlix transmembrana de l'extrem N-terminal i 2 en l'extrem C-terminal (Fig. X). A l'afegir el sucre s'observa un augment més marcat a longituds d'ona més baixes indicant un possible canvi d'ambient més hidrofòbic d'un o més Trp (MUS-VETEAU *et al.* 1995).



**Figura 1.19** Espectre de fluorescència de la MelB; a, MelB sola; b, MelB amb Dns2-S-Gal 15  $\mu$ M; c, MelB amb Dns2-S-Gal 15  $\mu$ M i Na<sup>+</sup> 10 mM; d, MelB amb Dns2-S-Gal 15  $\mu$ M, Na<sup>+</sup> 10 mM i melibiosa 100 mM (CORDAT *et al.* 1998).

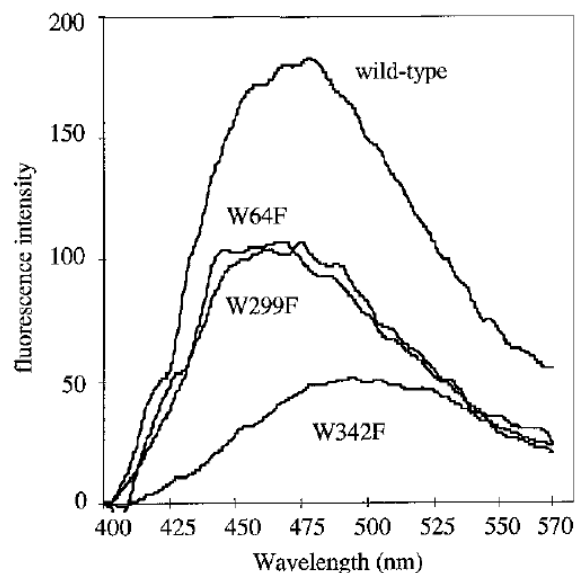
Els derivats Dns-S-Gal són anàlegs als  $\beta$ -galactòsids que presenten alta afinitat per la MelB (CORDAT *et al.* 1998). El solapament de l'emissió dels Trp de la MelB amb l'espectre d'absorció dels derivats Dns-S-Gal ha estat utilitzat com a eina per investigar la interacció dels cations i sucres amb la



MelB mitjançant transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET).

En la figura 1.19 es pot observar canvis en la intensitat de fluorescència deguts la transferència d'energia entre els Trp de la MelB abans (a) i després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal (b). A l'afegir melibiosa aquesta desplaça al Dns<sup>2</sup>-S-Gal del lloc de unió i la transferència d'energia es perd (d), demostrant que el Dns-S-Gal s'uneix específicament a la MelB mitjançant el lloc d'unió del sucre (CORDAT *et al.* 1998).

Es van realitzar mutacions puntuals de cada un dels Trp de la MelB i es van caracteritzar i estudiar per fluorescència amb Dns-S-Gal (CORDAT *et al.* 1998). Es va poder demostrar que la transferència d'energia dels Trp cap al Dns-S-Gal és produïda bàsicament pel Trp 64 i Trp 299. En la figura 1.20 s'observa com els mutants que no tenen aquest Trp mostren un espectre induït pel sodi en presència de Dns-S-Gal reduït, però presenten propietats d'unió i transport similars al WT. Donada l'alta sensibilitat de l'eficiència del FRET amb la distància, aquests resultats indiquen que els Trp 64 i 299 es troben propers al lloc d'unió del sucre que ocupa el Dns-S-Gal (CORDAT *et al.* 1998).



**Figura 1.20** Increment de fluorescència generat pel sodi en els espectres de fluorescència del Dns-S-Gal interaccionant amb la MelB WT o mutants de Trp (CORDAT *et al.* 1998)

Objectius

## 2 Objectius

La caracterització de l'estructura i la funció de la permeasa de melibiosa (MelB) és important per a l'estudi dels transportadors de membrana. El transport de sucres és de vital importància per a la cèl·lula. La MelB pot ser de gran interès, ja que pot utilitzar diferents sucres i cations. A més a més, la seva purificació i reconstitució en liposomes està ben estudiada i es poden aconseguir quantitats suficients per fer estudis espectroscòpics (Pourcher *et al.* 1995). La MelB comparteix característiques funcionals i estructurals amb altres transportadors acoblats a sodi o protó que intervenen en diverses malalties o que són dianes d'acció de fàrmacs o drogues. També existeixen moltes malalties degudes a la mala absorció de glucosa o bé degudes al transport deficient de glucosa al cervell (Klepper i Voit 2002). Aquests transportadors presenten una estructura molt similar a la MelB amb 12 hèlix  $\alpha$  transmembrana i utilitzen el sodi com a catió.

El sodi és el catió més emprat per aquests tipus de transportadors com a co-substrat. Conèixer com interacciona aquest catió amb la permeasa de melibiosa, ens pot ajudar a l'estudi d'aquestes malalties.

Per aquestes raons, volem estudiar les mutacions puntuals en els quatre residus d'àcid aspàrtic que s'ha proposat que formen el lloc d'unió del sodi: els Asp 19, 55, 59 i 124 (Pourcher *et al.* 1993; Zani *et al.* 1993).

Per tant, s'estudiarà les mutacions puntuals d'aquests residus d'Asp substituint-los per residus neutres, però polars com la cisteïna. Aquesta substitució ens permetrà fer reaccionar la Cys amb reactius fluoròfors específics de grup tiol. Tot i que aquesta informació serà molt important, el principal interès d'aquest treball és realitzar un estudi estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig. També s'estudiarà l'Asp 59 substituït per un àcid glutàmic (Glu). Aquest mutant s'ha descrit que manté certa interacció amb el sodi, encara que presenta deficiències respecte a la MelB silvestre (Zani *et al.* 1994).

A part d'aquests quatre Asp substituïts a Cys, també s'estudiarà un altre residu més. Una asparagina (Asn) que es troba molt propera als residus

d'Asp i que segons estudis previs, sembla que també està implicada en la unió del sodi (Franco i Wilson 1996).

El **primer objectiu** del treball serà purificar i reconstituir-les permeases de melibiosa mutades, obtenint els proteoliposomes de cada mutant per poder analitzar-los per espectroscòpia d'infraroig per reflexió total atenuada (ATR-IR).

El **segon objectiu** és analitzar la unió del sodi a les permeases mutades mitjançant ATR-IR. Es realitzaran espectres d'absorció en presència i absència del sodi. La resta d'aquests espectres, ens permetrà obtenir un espectre de diferència on només obtenim els senyals generats per la unió del sodi.

El **tercer objectiu** és analitzar la unió de la melibiosa en presència i absència de sodi de les permeases mutades mitjançant ATR-IR.

El **quart objectiu** és l'estudi de la unió dels substrats a les permeases mutades per espectroscòpia de fluorescència utilitzant la fluorescència intrínseca dels triptòfans de la MelB i complementant l'estudi amb un anàleg fluorescent de sucre i amb un reactiu de grup tiol per obtenir informació de l'entorn de les cisteïnes dels mutants.

## Materials i Mètodes

### 3. Materials i mètodes

#### 3.1 Productes utilitzats

##### 3.1.1 Cultiu bacterià i formació de vesícules

###### MEDI LURIA-BROTH (LB):

1% (p/v) Bacto®-Tryptona  
0,5% (p/v) Bacto® extracte de llevat  
0,5% (p/v) NaCl

###### TAMPÓ DE RENTAT DE LES VESÍCULES:

50 mM Tris-HCl  
50 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
pH 8

###### MEDI **M9** COMPLEMENTAT:

42 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
8,5 mM NaCl  
18,7 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
54 mM Glicerol  
1 mM  $\text{MgSO}_4$   
0,1 mM  $\text{CaCl}_2$   
1 mM Tiamina,  
0,2% (p/v) Àcid casamino  
0,3 mM Ampicil·lina  
pH 7,5

##### 3.1.2 Purificació i reconstitució de la permeasa de melibiosa

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **I** (2X):

40 mM Tris-HCl  
1,2 M NaCl  
10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
20% (v/v) Glicerol  
pH 8

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **9/10**:

20 mM Tris-HCl  
600 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
10% (v/v) Glicerol  
10 mM Imidazol  
10 mM Melibiosa  
pH 8

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **A**:

20 mM Tris-HCl  
600 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
10% (v/v) Glicerol  
10 mM Imidazol  
10 mM Melibiosa  
0,2% (p/v) LAPAO  
pH 8

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **C**:

20 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
10% (v/v) Glicerol  
10 mM Imidazol  
10 mM Melibiosa  
0,1% (p/v)DDM  
pH 8

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **B**:

20 mM Tris-HCl  
600 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
10% (v/v) Glicerol  
10 mM Imidazol  
10 mM Melibiosa  
0,1% (p/v) DDM  
pH 8

###### TAMPÓ DE PURIFICACIÓ **D**:

20 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol  
10% (v/v) Glicerol  
100 mM Imidazol  
10 mM Melibiosa  
0,1% (p/v)DDM  
pH 8

Reïna de agarosa amb grups àcid nitriloacètic recoberts d'ions níquel, "HIS-Select® Nickel Affinity Gel"

*Bio-Beads* (Bio-Rad)

LAPAO (Anatrace)

DDM (Anatrace)

Lípids totals d'*Escherichia coli* (Avanti Polar Lípids)

### 3.1.3 Tampons utilitzats en espectroscòpia d'infraroig

#### TAMPÓ **R** :

20 mM MES

100 mM KCl

pH 6,6

#### TAMPÓ **R 10** :

20 mM MES

110 mM KCl

pH 6,6

#### TAMPÓ **R 50** :

20 mM MES

150 mM KCl

pH 6,6

#### TAMPÓ **SUCRE 50**:

20 mM MES

100 mM KCl

50 mM Melibiosa

pH 6,6

#### TAMPÓ **SODI 10**:

20 mM MES

100 mM KCl

10 mM NaCl

pH 6,6

#### TAMPÓ **SODI 50**:

20 mM MES

100 mM KCl

50 mM NaCl

pH 6,6

#### TAMPÓ **SODI I SUCRE 10**:

20 mM MES

100 mM KCl

10 mM NaCl

10 mM Melibiosa

pH 6,6

#### TAMPÓ **SODI I SUCRE 50**:

20 mM MES

100 mM KCl

10 mM NaCl

50 mM Melibiosa

pH 6,6

Si no s'indica la casa comercial, els reactius pertanyen a Sigma-Aldrich.

## 3.2 Soca bacteriana i plasmidis utilitzats

La soca d'*E. coli* DW2-R, provinent de la soca *E. coli* DW2 (*melA*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *melB*,  $\Delta$ *lacZY*) és deficitària del gen *RecA*. La manca d'aquest gen és necessària per mantenir el plàsmidi intacte, sense que es produeixi recombinació homòloga amb el DNA del bacteri. La manca d'aquest gen *RecA* es manté afegint tetraciclina 10  $\mu$ g/ml al medi, ja que el gen de resistència per aquest antibiòtic es troba insertat en el gen *RecA* produint la seva inactivació. Aquesta soca és també deficitària en els gens *melB* (permeasa de melibiosa), *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) i *lacY* (permeasa de lactosa), però sí que conté el gen *melA* ( $\alpha$ -galactosidasa) (BOTFIELD i WILSON 1988).

La preparació de les cèl·lules competents de *E. coli* DW2-R es va realitzar pel mètode amb clorur de rubidi (HANAHAN 1983). Es va utilitzar el plasmidi pK95 $\Delta$ AHB, que deriva del vector pKK 223-3 (Farmacia, Uppsala, Sweden) per fer la transformació. Aquest plasmidi conté el gen de resistència a ampil·lina i el gen *melB* silvestre o el gen *melB* amb una mutació puntual sota el control del promotor *tac* (POURCHER *et al.* 1995). Al gen *melB* se li han afegit sis codons consecutius d'histidina (His) a l'extrem 3'. També conté l'últim terç del gen de la *MelA* per millorar l'expressió de la *MeB* amb la cua d'histidines.

## 3.3 Cultiu dels bacteris transformats amb el gen de la permeasa de melibiosa

### 3.3.1 Transformació i selecció

Els bacteris *E. coli* DW2-R competents han estat transformats per xoc per calor (MANDEL *et al.* 1970). Les cèl·lules transformades s'han sembrat en plaques d'agar MacConkey contenint 10 mM melibiosa, 150  $\mu$ g/ml ampil·lina i 10  $\mu$ g/ml tetraciclina. La temperatura de treball utilitzada és de 30°C, ja que algunes de les permeases de melibiosa mutades utilitzades són termosensibles.



### 3.3.2 Estudi del transport de la permeasa de melibiosa mitjançant el medi MacConkey

El medi MacConkey mínim (lliure de tota font de carboni) és un medi selectiu que conté indicadors de pH, els quals ens permeten veure si els bacteris són capaços de fer la fermentació. S'afegeix com a font de carboni 10 mM melibiosa que permet veure les colònies que tenen la permeasa de melibiosa funcional. Primer, se seleccionen les colònies transfectades amb ampicil·lina, i també amb tetraciclina per evitar que els bacteris puguin fer servir la RecA i recombinar. Els bacteris *E. coli* DW2-R no sintetitzen la permeasa de lactosa, així que només podran fer la fermentació del sucre les cèl·lules que realitzin el transport amb la permeasa de melibiosa. La fermentació produeix productes àcids que fan tornar les colònies vermelles degut als indicadors de pH que conté el medi. Cada mutant presenta una coloració depenent de l'activitat que presenta la permeasa de melibiosa. Si la cèl·lula és capaç de transportar la melibiosa, s'observen colònies vermelles. Si no pot transportar no es produeix la fermentació i les colònies són blanques.

Un cop s'han obtingut les colònies positives, es fa un precultiu amb 5 ml de medi ric Luria-Broth (**LB**) amb ampicil·lina 150 µg/ml i tetraciclina 10 µg/ml per mantenir la selecció de les cèl·lules contenint el plasmidi. A continuació, es procedeix a fer una purificació dels plasmidis de les colònies positives (Kit QIAprep® Miniprep de Qiagen). Aquest DNA plasmídic es porta a seqüenciar per confirmar la presència del gen mutant al plasmidi de les colònies positives.

### 3.3.3 Cultiu bacterià

Es realitza un cultiu cel·lular a gran escala, contenint ampicil·lina 150 µg/ml i tetraciclina 10 µg/ml per mantenir la selecció. El procés es realitza en tres etapes on cada cop s'augmenta el volum del cultiu. El cultiu es realitza a 30°C amb agitació (200 rpm). Es fan dos precultius petits amb 12 ml de **LB** amb ampicil·lina 150 µg/ml i tetraciclina 10 µg/ml on s'afegeixen les bactèries que s'han obtingut anteriorment en una placa de MacConkey i es deixa créixer tota la nit. Aquests precultius s'utilitzen per

fer dos cultius amb 200 ml de medi mínim **M9** complementat, i es deixen créixer 6-8 h. Finalment, es procedeix a fer 8 cultius amb 900 ml de medi M9 complementat, on s'afegeix 50 ml del cultiu previ a cadascun. Aquest cultiu final es deixa créixer tota la nit fins obtenir una densitat òptica (DO) de 1,0-1,2 a 600 nm de longitud d'ona ( $\lambda$ ).

#### **3.3.4 Rentats, centrifugació i emmagatzematge dels cultius**

Un cop finalitzat el cultiu es realitza una centrifugació a 7000g 15 min a 4°C. Es recull el sediment i es resuspèn amb 30 ml de tampó de rentat i es torna a centrifugar a 7000xg 15 min a 4°C. Finalment, es resuspèn el sediment amb 20 ml de tampó de rentat, s'afegeix glicerol 15% i es congela a -80 °C.

## 3.4 Purificació i reconstitució de la permeasa de melibiosa

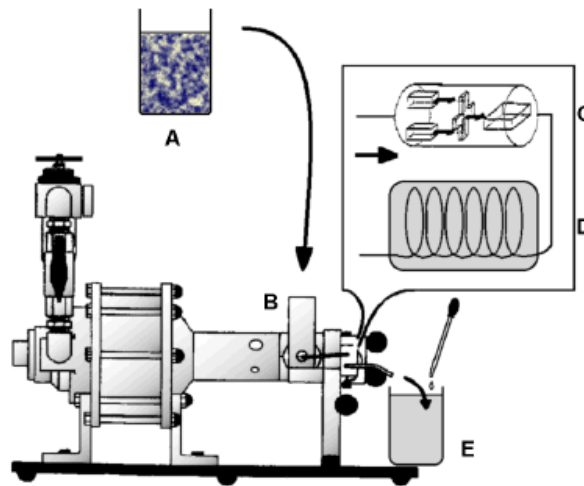
El procés de purificació el podem dividir en dues etapes:

- Formació de les vesícules invertides.
- Solubilització i purificació de la permeasa de melibiosa.

### 3.4.1 Formació de les vesícules invertides

Partim de les cèl·lules obtingudes en el cultiu bacterià que han estat guardades a  $-80^{\circ}\text{C}$ . S'agafen 60 ml de bacteris resuspesos amb tampó de rentat (veure apartat anterior) i es descongelen les cèl·lules en un bany a  $30^{\circ}\text{C}$ . Un cop descongelades s'han de mantenir sempre en fred a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es resuspenen amb 100 ml de tampó de rentat i es centrifuguen a  $15000\times g$  durant 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment amb 100 ml de tampó de rentat. A continuació es procedeix a fer la lisi cel·lular. S'afegeix 1 mg/ml de lisozim i s'inverteix tres cops. Després, s'afegeixen 15 mM de EDTA i s'inverteix tres cops. Es deixa a  $4^{\circ}\text{C}$  amb agitació suau (200 rpm) durant 30 min. S'afegeix 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNAasa i de RNAasa, i 1,5 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M i es passa la mostra per l'homogeneïtzador d'alta pressió o microfluidificador "*Microfluidizer 110S*". Es va introduint en el reservori d'entrada els 100 ml de mostra, la pressió aplicada és de 20000 psi, tot mantenint el circuit refrigerat amb gel per evitar l'escalfament de la mostra. La mostra passada pel microfluidificador se centrifuga a baixa revolució ( $1200\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durant 10 minuts) per descartar les cèl·lules que no s'han trencat.

El darrer procés consisteix en rentar les vesícules invertides i per això es fan tres rentats a  $31000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durant 30 min. Finalment es resuspèn el sediment amb 24 ml de tampó de rentat. Les vesícules es poden congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.1** Esquema del procés d'homogeneïtzació utilitzant el "Microfluidizer 110S". El "Microfluidizer" és un aparell que realitza una disrupció cel·lular mitjançant elevades pressions

### 3.4.2 Solubilització i purificació de la permeasa de melibiosa

Es descongelen les vesícules en un bany a 30°C. Un cop descongelades es mantenen sempre en fred, a 4°C. El volum de vesícules és d'uns 24 ml que es divideixen en 4 tubs de policarbonat de 30 ml de volum (tubs d'ultracentrifuga Sorvall). S'afegeix 6 ml de vesícules i 6 ml de tampó de solubilització **I** (2X) a cada tub, s'acaba d'omplir el tub amb tampó de solubilització **I** (1X) i se centrifuga a 310000xg a 4°C durant 30 minuts. El sediment es resuspèn amb el tampó de solubilització **9/10**, s'afegeix 2,5 ml de LAPAO 10% a cada tub d'ultracentrifuga i s'acaba d'omplir amb el tampó de solubilització **9/10**. S'inverteix 5 cops suaument i es deixa reposar 10 minuts. Finalment, se centrifuga a 310000xg a 4°C durant 30 minuts.

Es recullen els sobrenedants, que contenen la proteïna solubilitzada. En aquest punt s'agafa una alíquota (50 µl) que es farà servir per fer una electroforesi. Es barregen els sobrenedants amb la reïna Ni-NTA, mantenint la solució a 4°C en agitació suau durant 1 hora. La reïna Ni-NTA abans de ser utilitzada s'ha rentat 3 cops amb aigua destil·lada, 3 cops amb tampó de solubilització **I** (1X) i finalment 1 cop amb tampó de solubilització **A**. El volum de reïna utilitzat és de 5 ml.

Un cop s'ha incubat la reïna Ni-NTA amb la proteïna solubilitzada se centrifuga a 3000xg durant 5 minuts i es resuspèn la reïna amb tampó de solubilització **A**. A continuació es prepara una columna de polipropilè de 15 ml de volum amb la reïna Ni-His-Select, que conté la proteïna unida. Es fan un conjunt de rentats de 10 ml de volum: un cop amb el tampó de solubilització **A**; 6 cops amb el tampó de solubilització **B**, per canviar el detergent de LAPAO a DDM; i 3 cops amb tampó de solubilització **C**, per reduir la concentració de NaCl. Finalment per eluir la proteïna primer posem 5 ml de tampó de solubilització **D**, i després fem una segona elució amb 5 ml més. Aquest tampó conté una concentració de 100 mM imidazol, que desplaça les histidines de la interacció amb els ions níquel de la reïna, afavorint l'elució de la MelB. S'agafen alíquotes de 1,5 ml, mesurant l'absorbància a 280 nm per tal de determinar la concentració de proteïna durant el procés d'elució. Aplicant la llei de Lambert-Beer i el coeficient d'extinció estimat per a la MelB, obtenim:

$$\frac{\text{Absorbància}}{1,5} = [\text{Proteïna}] \text{ mg/ml}$$

S'ajunten les alíquotes que contenen proteïna, prenent una alíquota de 50 µl per fer una electroforesi. El rendiment òptim per 3SV o WT són 7,5 mg per cada 15 g de bacteris. La proteïna solubilitzada es pot congelar a -80°C.

### 3.4.3 Formació de proteoliposomes

Primer es preparen els liposomes, que es poden guardar a 4°C durant 3 dies màxim. Es pesen 15 mg de lípids totals d'*E. Coli*, i es dissolen amb 1 ml de cloroform. A continuació es rotaevaporen. Un cop s'ha eliminat tot el cloroform es resuspenen amb 1,5 ml de tampó **R** (MES 20 mM KCl 100 mM pH 6,6) i es vorteja durant 15 min. A continuació, es fan cinc cicles de congelació amb nitrogen líquid i descongelació en un bany a 36°C, per tal de trencar els liposomes i obtenir liposomes unilamel·lars grans. Després s'extrusiona amb un sistema de xeringues (mini-extruder de Avanti)

utilitzant una membrana de policarbonat de 100  $\mu\text{m}$ . Aixó permet obtenir una població de liposomes de mida petita i homogènia.

Per la formació dels proteoliposomes la proporció de lípids: proteïna (p:p) és 2:1. Es barreja la solució de la proteïna solubilitzada amb els liposomes i es deixa en un agitador rotatiu durant 10 min a 4°C. Posteriorment, s'afegeixen 120 mg de Bio-Beads per ml de proteïna per eliminar el detergent i així afavorir la formació de proteoliposomes. Els Bio-Beads han estat prèviament rentats amb 50 ml d'aigua 10 cops i 50 ml de tampó **R**, un cop. Per afegir els Bio-Beads es divideix la quantitat total de Bio-Beads en tres alíquotes, afegint una fracció cada 10 min, i finalment es deixa a 4°C en agitació rotativa (200 rpm) tota la nit.

Al dia següent s'utilitza una columna de polipropilè de 15 ml, on hi afegim la solució que conté els Bio-Beads amb els proteoliposomes, s'elueix per gravetat, realitzant dos rentats de 5 ml amb tampó **R**. S'ajunten totes les fraccions i es procedeix a fer els rentats dels proteoliposomes. Per fer els rentats se centrifuga a 310000xg i 4°C durant 30 minuts, i es resuspèn amb tampó **R**. A continuació, es fan tres cicles de congelació amb nitrogen líquid, i descongelació en un bany a 30°C. Després es sonica 10 segons dues vegades en un bany d'ultrasons (Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6) a màxima potència a 4°C. Aquest procés de rentat es realitza per eliminar la possible presència de sodi o melibiosa a l'interior dels proteoliposomes, i es repeteix tres cops. En l'última centrifugació es resuspèn amb tampó **R** per obtenir una concentració de 5-8 mg/ml final.

### **3.5 Determinació de la puresa dels proteoliposomes i quantificació**

Un cop finalitzat el procés de formació dels proteoliposomes, fem una electroforesi amb un gel de poliacrilamida al 12% amb les alíquotes que s'han anat recollint durant tot el procés de purificació i reconstitució, per tal de poder detectar les proteïnes contaminants.

La quantificació de la proteïna continguda en els proteoliposomes es va fer pel mètode de Lowry modificat (LOWRY *et al.* 1951) que permet realitzar la quantificació en presència de lípids. Com a estàndard es va utilitzar seroalbúmina.

## 3.6 Espectroscòpia d'infraroig

L'espectroscòpia d'infraroig (FTIR) és una tècnica freqüentment utilitzada per a l'estudi de l'estructura i el mecanisme de les proteïnes (MANTELE 1993; GOORMAGHTIGH *et al.* 1994; ARRONDO i GOÑI 1999; BARTH i ZSCHERP 2000; ZSCHERP i BARTH 2001; TATULIAN 2003). Un dels avantatges d'aquesta tècnica sobre altres espectroscòpies és que degut a la seva elevada longitud d'ona no hi ha els problemes de dispersió de la llum que es donen en altres tècniques en l'estudi de proteoliposomes. Al contrari que altres tècniques espectroscòpiques, l'estudi de proteïnes per FTIR no requereix d'incorporació de cap sonda externa, ni introduir cap marcatge isotòpic.

La FTIR s'ha vist que és una de les tècniques més versàtils a l'hora d'estudiar l'estructura secundària de les proteïnes, ja que permet estudiar-la en diferents entorns: reconstituïda en lípids en suspensions aquoses (DAVE *et al.* 2000; LÓRENZ *et al.* 2001), en dissolucions orgàniques (TORRES i PADRÓS 1993), solubilitzada (DAVE *et al.* 2000; LÓRENZ *et al.* 2001) o en films secs (LÓRENZ-FONFRÍA *et al.* 2003).

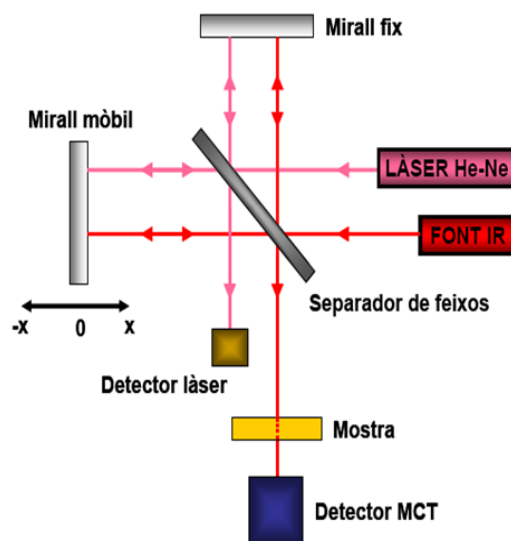
També és una bona tècnica per estudiar les cadenes laterals dels aminoàcids (BARTH 2000). Per exemple, es poden seguir les protonacions-desprotonacions dels Asp i Glu involucrats en la funció de les proteïnes (ROTHSCHILD 1992), les seves interaccions amb cations (NARA *et al.* 1994) o els canvis en la força dels ponts d'hidrogen que formen els grups carbonil d'aquestes cadenes laterals (BARTH i ZSCHERP 2002).

### 3.6.1 Adquisició dels espectres i funcionament d'un espectròmetre amb transformada de Fourier

El funcionament d'un interferòmetre (figura 3.2) consisteix bàsicament en dos feixos d'infraroig que es recombinen donant lloc a una intensitat en el senyal que rep el detector. Per obtenir això, la font d'infraroig emet llum infraroja policromada que anirà al separador de feixos ("Beam Splitter"). Aquest separador transmet el 50% de la llum incident i reflecteix l'altre 50%. Aquest parell de feixos es dirigiran a un mirall fix i a un altre de mòbil que té una velocitat constant. La llum reflectida pel mirall fix i la llum



reflectida pel mirall mòbil es recombinaran en el separador de feixos i es dirigiran cap a la mostra.



**Figura 3.2** Esquema de l'interferòmetre d'un aparell de FTIR. Extret de (León 2006).

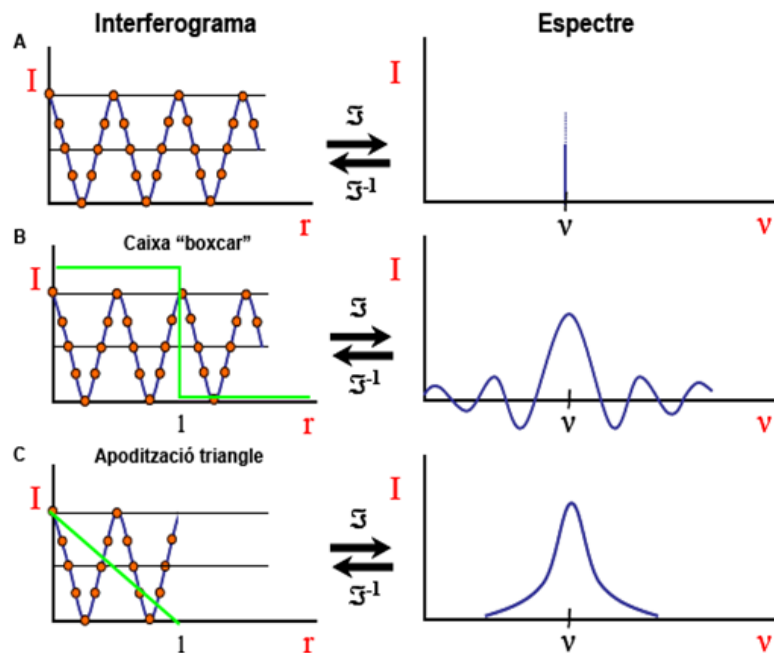
La interferència dels dos feixos produirà un senyal en el detector que dependrà de quantes ones estiguin en fase (interferència constructiva) o en oposició de fase (interferència destructiva). La interferència d'aquestes ones dependrà de la posició del mirall mòbil (figura 3.2). En aquest punt tenim un interferograma que dóna una relació entre la intensitat del senyal i la distància del mirall mòbil. Per obtenir una relació entre la intensitat i cada nombre d'ona cal aplicar la transformada de Fourier.

En una situació ideal en la que el mirall mòbil es pogués moure fins a una distància infinita, la transformada de Fourier de l'interferograma resultant donaria lloc a un espectre on cada nombre d'ona estaria ben definit (figura 3.3A). Degut a que el mirall mòbil només es pot moure fins a una certa distància ( $l$ ), l'espectre resultant correspondria a l'aplicació a l'interferograma d'una funció "Boxcar" (figura 3.3B), que representa el conjunt de dades que es perden degut al desplaçament limitat del mirall. Això dóna lloc a un espectre amb una banda central amb lòbuls als costats (Figura 3.3B). Per tal de minimitzar aquests lòbuls a l'interferograma se li aplica una funció d'apodització que, en el nostre cas, és la funció triangle

que és la més utilitzada per l'espectroscòpia FTIR per mostres biològiques (Figura 3.3C). La transformació de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat ens dona l'espectre d'emissió, que podem transformar en espectre d'absorció (veure EQ3.1).

$$\text{Absorció de la mostra} = -\log \frac{\text{Transmitància de la mostra}}{\text{Transmitància sense mostra}} \quad (\text{EQ 3.1})$$

Per tal de mesurar la posició del mirall es fa servir un làser de Ne-He. Quan més gran sigui la distància que es mogui el mirall mòbil, més resolució tindrà l'espectre, però es tardarà més temps en adquirir-lo.



**Figura 3.3** Representació del tractament de l'interferograma per tal d'obtenir l'espectre d'absorció.  $\mathcal{F}$ , transformada de Fourier;  $\mathcal{F}^{-1}$ , inversa de la transformada de Fourier;  $I$ , intensitat;  $r$ , distància recorreguda pel mirall mòbil;  $l$ , retard màxim del mirall;  $\nu$ , nombre d'ona. **A**, interferograma amb un desplaçament del cristall infinit, que donaria un espectre ideal. **B**, aplicació d'una funció "Boxcar" a l'interferograma, que dona lloc a un espectre amb una banda amb lòbuls. **C**, interferograma amb una apodització triangle, que dona lloc a un espectre sense lòbuls.

### 3.6.2 Tècnica d'espectroscòpia d'infraroig per reflexió total atenuada

Durant aquests últims anys, l'espectroscòpia d'infraroig per reflexió total atenuada (ATR-FTIR, *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared*) ha esdevingut un dels mètodes potents a l'hora d'estudiar l'estructura de les proteïnes (GOORMAGHTIGH *et al.* 1999; TATULIAN 2003). Aquesta tècnica presenta alguns avantatges respecte la tècnica de transmissió, ja que necessita molt poca quantitat de proteïna a l'hora d'adquirir els espectres (100 µg), permet obtenir informació de l'orientació de la proteïna (GOORMAGHTIGH *et al.* 1999) i el que és més important per aquest treball, permet modificar el medi extern on es troba la proteïna (pH, substrats, deuteració) sense necessitat de canviar de mostra. Un exemple d'aquest avantatge és la possibilitat d'estudiar les cinètiques de bescanvi H/D (DAVE *et al.* 2002).

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

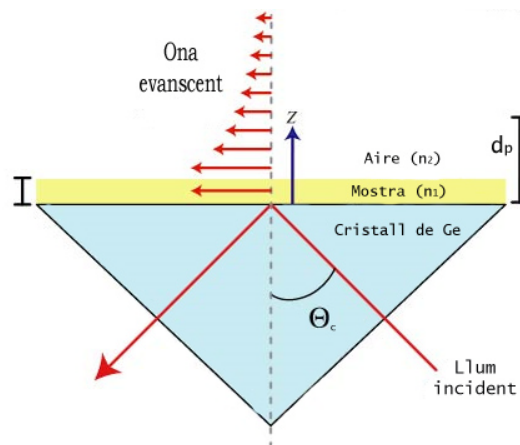
$$\theta_c = \sin^{-1} n_{21} \quad (n_{21} = n_2 / n_1)$$

Si el feix d'infraroig penetra amb un angle per sobre de l'angle crític, el feix serà totalment reflectit quan arribi a la superfície del cristall. Llavors es produeixen vàries reflexions totals de la llum a dins de l'IRE fins arribar al final del cristall, on el feix serà dirigit cap al detector.

La superposició de les ones entrants i reflectides resulta en una ona perpendicular a la superfície de reflexió total que s'anomena ona

evanescent. Aquesta ona es caracteritza per un decaïment exponencial de la seva amplitud amb la distància des de la interfase (veure figura 3.4). La presència del camp evanescent és el que possibilita la interacció entre la llum infraroja i la mostra situada a la superfície de l'IRE. Per aquesta raó els films de proteïnes de membrana o proteïnes reconstituïdes en lípids són molt utilitzats (ARKIN *et al.* 1996; CABIAUX *et al.* 1997; LE COUTRE *et al.* 1997; TATULIAN *et al.* 1998), ja que permeten mantenir una elevada concentració de mostra a prop del cristall IRE.

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



**Figura 3.4** Esquema de l'entrada del feix d'infraroig al cristall d'IRE i la formació de l'ona evanescent. En aquest exemple es mostra l'esquema d'un cristall triangular d'una sola reflexió. El cristall utilitzat en el present treball es trapezoïdal amb un total de 25 reflexions.

El número de reflexions internes dependrà de la longitud del cristall, del seu gruix i de l'angle d'incidència del feix d'infraroig. Com més reflexions, més intens serà l'absorbància. Una configuració normal que s'usa freqüentment i que també es fa servir en aquest treball, és un cristall de germani de 5 cm de llarg, de 2 mm d'ample i un angle de  $45^\circ$ , que dóna lloc a 25 reflexions, 13 d'elles al costat on es situa la mostra.

En l'ATR la forma d'un espectre d'absorbància pot diferir del que s'obtidria per transmissió. Aquestes "distorsions" dependran dels següents paràmetres òptics: longitud d'ona de la llum incident, índex de refracció, índex d'absorció de l'element intern de reflexió (IRE), de la mostra i de l'angle d'incidència. El gruix del film de proteoliposomes sobre el cristall és també un paràmetre important, ja que l'espectre d'absorbància mostra un comportament diferent en funció del gruix del film. En un film gruixut, on el gruix de la mostra és superior a la distància de penetració efectiva de l'ona evanescent, l'absorbància no depèn del gruix real de la mostra, només de la distància de penetració del feix evanescent (que disminueix amb el número d'ona) i de la concentració mitja de la mostra en la distància de penetració. S'ha de tenir en compte que en aquestes condicions un espectre d'ATR presenta una absorbància més gran a números d'ona menors que el seu equivalent adquirit per transmissió. Això és conseqüència de que el gruix "il·luminat" pel feix evanescent decau inversament amb el número d'ona (serà la meitat a  $4000\text{ cm}^{-1}$  que a  $2000\text{ cm}^{-1}$ ). També es pot observar una distorsió en la forma de les bandes, causat per canvis en l'índex de refracció en una banda de forta absorció. Aquestes distorsions només son apreciables per a bandes amb coeficients d'absorció grans, que no es el cas per a mostres de proteoliposomes. En cas de tenir un film prim, on el gruix de la mostra és inferior a la distància de penetració efectiva de l'ona evanescent, l'absorbància de la mostra no dependrà del número d'ona, ja que l'ona evanescent no té temps de decaure significativament en la mostra. A més, es d'esperar que les possibles distorsions en la forma de les bandes causades per la variació de l'índex de refracció de la mostra amb el número d'ona seran menors que amb un film gruix. Com a principal problema, assolir el límit de film prim requereix mostres molt primes (de l'orde de la monocapa), i per tant implica una molt baixa absorbància per part de la mostra i relacions senyal/soroll intolerablement pobres.

En el nostre cas, al realitzar els espectres de diferència dels proteoliposomes ens trobem en la hipòtesi de film gruixut. Això té certs avantatges: tenim la màxima absorbància possible (afegint més mostra l'absorbància no augmentaria), i el gruix aparent de la mostra (la part que

sent el feix evanescent) es manté constant. En aquestes condicions, si s'observa bandes més intenses a números d'ona menors, però no s'observen distorsions apreciables en la forma de les bandes. Per poder-les veure les mostres haurien d'estar molt concentrades, tenir coeficients d'absorció molt grans, o d'angles d'incidència de la llum IR propers a l'angle crític i aquest no és el nostre cas. Finalment, cal fer notar que l'orientació de la mostra sobre el cristall pot tenir un efecte sobre l'absorbància, tant per a ATR com per a transmissió, encara que de manera diferent (MARSH 1999). Per totes aquestes raons els espectres per ATR poden diferir dels espectres de transmissió (LARRABEE i CHOI 1993; GOORMAGHTIGH *et al.* 1999).

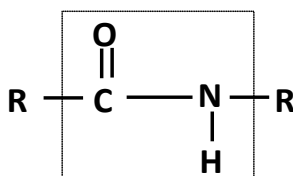
Un cop s'ha estès la mostra sobre el cristall, en assecar-se es formaran multicapes de membranes. Les primeres capes que queden en contacte amb el cristall són proteoliposomes que formaran unions fortes amb el cristall. La resta es disposaran sobre aquesta primera capa. Amb proteïnes solubles s'ha observat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

### **3.6.3 Vibracions moleculars de les proteïnes**

La radiació d'infraroig es troba entre 14000 i 10  $\text{cm}^{-1}$ , però és la zona de l'infraroig mig, 4000-1000  $\text{cm}^{-1}$ , la que té un major interès per ser on absorbeixen les vibracions dels grups funcionals que defineixen les propietats químiques de les molècules biològiques. Per sobre de 4000  $\text{cm}^{-1}$  només absorbeixen els sobretons d'aquestes vibracions (molt més febles), i per sota del 1000  $\text{cm}^{-1}$  vibracions molt deslocalitzades.

La freqüència de vibració d'un enllaç depèn de la massa dels àtoms i de la força de l'enllaç. Els modes de vibració dels enllaços es poden classificar en dos grups. Els de tensió, on els àtoms vibren en la direcció de l'enllaç, i els de flexió, on els àtoms es mouen perpendiculars a la direcció de l'enllaç. Poden donar-se combinacions dels diferents modes de vibració en un mateix enllaç.

En les proteïnes el grup més abundant és el grup amida de l'enllaç peptídic (figura 3.5). Aquest grup presenta diferents formes de vibració, però els que són importants per aquest estudi són l'amida I i II.



**Figura 3.5** Representació de l'enllaç amida.

L'amida I absorbeix entre  $1700$  i  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Aquesta banda prové principalment de la vibració de tensió de l'enllaç C=O acoblada amb la vibració de tensió de l'enllaç C-N i la vibració de deformació (flexió) de l'enllaç CCN. La freqüència d'aquestes vibracions depèn en part dels ponts d'hidrogen que es formen amb els grup C=O i N-H, i aquests ponts depenen de l'estructura secundària que adopta la proteïna. Per això, la banda de l'amida I presenta una alta sensibilitat als canvis conformacionals de les proteïnes.

L'amida II absorbeix aproximadament a  $1550\text{ cm}^{-1}$ , i correspon a la vibració de flexió en el pla de l'enllaç N-H acoblat amb la vibració de tensió de l'enllaç CN, amb petites contribucions de les vibracions de flexió en el pla CO i vibracions de tensió CC i NC. Aquesta banda també presenta sensibilitat a l'estructura secundària, encara que menor que l'amida I.

Un altre tipus de vibració molecular important per al nostre estudi són les vibracions de les cadenes laterals dels aminoàcids. Les vibracions que són més interessants per aquest estudi són:

*Cadenes laterals d'Asp i Glu:* Aquests aminoàcids tenen 3 vibracions principals. Al voltant de  $1400\text{ cm}^{-1}$  absorbeix la vibració de tensió simètrica de l'enllaç  $\text{COO}^-$ , al voltant de  $1574\text{-}1579\text{ cm}^{-1}$  (Asp) i  $1556\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$  (Glu) la vibració de tensió antisimètrica de l'enllaç  $\text{COO}^-$ , i la vibració de tensió de l'enllaç  $\text{C=O}$  absorbeix entre  $1712\text{-}1788\text{ cm}^{-1}$ .

*Cadenes laterals d'Asn i Gln:* Tenen dues vibracions principals, la vibració de l'enllaç  $\text{C=O}$  al voltant de  $1678\text{ cm}^{-1}$  (encara que pot absorbir fins a  $1704\text{ cm}^{-1}$ ) per l'Asn i entre  $1668\text{-}1687\text{ cm}^{-1}$  per la Gln. La vibració de flexió de l'enllaç  $\text{NH}_2$ , es troba al voltant de  $1612\text{-}1622\text{ cm}^{-1}$  per l'Asn i  $1586\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$  per la Glu.

*Cadena lateral de Tyr:* En el cas de la Tyr, la vibració principal es troba entre  $1516$  i  $1518\text{ cm}^{-1}$ .

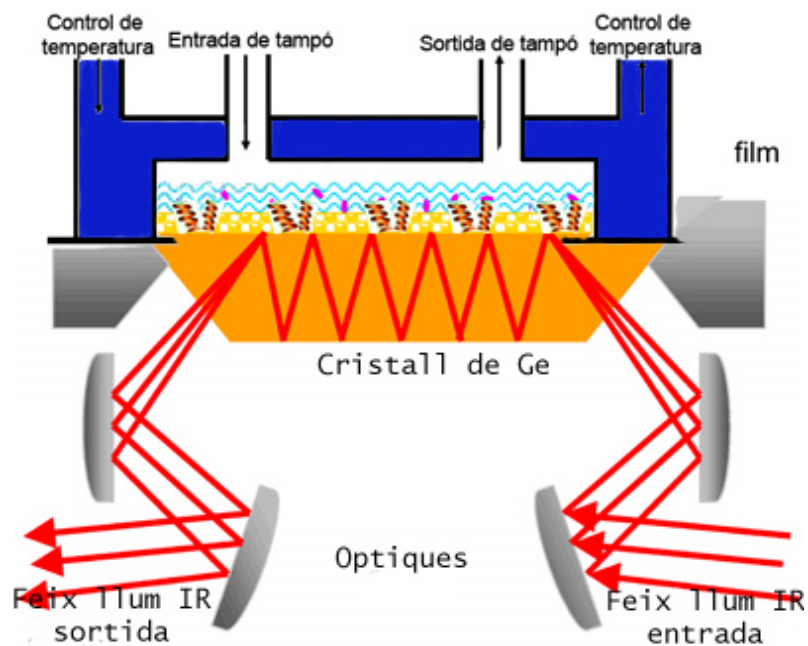
#### **3.6.4 Estudi per espectroscòpia d'infraroig de l'estat de la permeasa de melibiosa reconstituïda**

Per comprovar la correcta inserció de la proteïna en el liposoma es va realitzar un espectre d'absorció d'infraroig, utilitzant la tècnica de reflexió total atenuada. L'element de reflexió interna utilitzat va ser un cristall de germani de forma trapezoïdal amb un angle de  $45^\circ$  i dimensions  $50/10/2\text{ mm}$  (longitud / amplada / gruix). Aquest cristall presenta una superfície on es pot estendre la mostra, de  $4\text{ cm}^2$ , aproximadament. Damunt del cristall col·loquem una carcassa termostatitzada (figura 3.6) connectada a un bany de circulació que ens permet controlar la temperatura de treball. Aquesta carcassa també té dos conductes d'entrada i sortida per canviar el medi en què es troba la mostra. La temperatura de treball és de  $20^\circ\text{C}$ .

Estenem uns  $20\text{ }\mu\text{l}$  de proteoliposomes damunt del cristall, que a la concentració utilitzada representen uns  $80\text{-}120\text{ }\mu\text{g}$  de proteïna, deixem assecar  $15\text{ min}$  a l'aire i després hi passem un flux molt suau de nitrogen sec per assegurar que la mostra es troba ben seca. El nivell d'hidratació de la mostra el podem seguir amb la banda d'absorció de l'aigua de  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Després mantenim la mostra a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$  gràcies a la carcassa termostatitzada.



En aquestes condicions adquirim un espectre d'absorbància amb un espectròmetre Bio-Rad FTS 6000 equipat amb un detector mercuri-cadmí-tel·lur (MCT) refredat amb nitrogen líquid. Els espectres d'absorció es van adquirir a una resolució de  $2\text{ cm}^{-1}$  acumulant 2000 escombrats.



**Figura 3.6** Esquema d'un accessori d'ATR. Els miralls dirigeixen la llum IR cap l'IRE. Sobre aquest es troba dipositada la mostra. La llum IR que prové de les reflexions és dirigida cap al detector.

L'espectre d'absorció de la proteïna seca també ens permet veure per la forma de la banda amida I de si hi ha agregació (banda característica a  $1630\text{ cm}^{-1}$  acompanyada d'una altra banda menys intensa cap a  $1690\text{ cm}^{-1}$ ) o cap altre canvi conformacional significatiu respecte a l'estructura del 3SV o WT.

### 3.6.5 Estudi per espectroscòpia d'infraroig de la interacció dels substrats i els cations amb la permeasa de melibiosa

Per mesurar l'efecte del substrat en la permeasa i els seus mutants, utilitzem la tècnica d'ATR-IR i un cristall de germani (esmentat a l'apartat anterior). L'aparell utilitzat també s'ha descrit, un espectròmetre Bio-Rad FTS 6000 equipat amb un detector MCT.

Estenem 20 µl de mostra (contenint aproximadament 120 µg de proteïna) i la deixem assecat, posem la carcassa per termostatitzar la mostra i adquirim un espectre d'absorbància de la mostra seca (esmentat a l'apartat anterior).

La raó d'assecat la mostra és que els proteoliposomes formen una pel·lícula multilamel·lar ordenada damunt del cristall, on es generen interaccions fortes entre la primera capa de proteoliposomes i el cristall de germani. Aquestes interaccions ens permeten fer passar un flux amb sucre i després sense sucre, alternativament, i restar els espectres d'absorció de cada situació veurem diferències induïdes pel sucre. Ja que, l'efecte generat pel sucre en cada proteïna se sumarà, permetent-nos obtenir una senyal prou intensa per mesurar-la.

El procés s'inicia amb un flux constant d'1,5 ml/min de tampó **R/R10/R50** per hidratar la mostra durant 30 min. Després es procedeix a obtenir els espectres de diferència.

S'obté primer un espectre d'absorbància de la mostra sense substrat, després de passar el tampó **R** durant 10-30 min. A continuació obtenim el espectre d'absorció amb substrat, després de fer passar durant 2-4 min el tampó **Sodi** o tampó **Sucre** o tampó **Sucre i Sodi**.

### **3.6.6 Disseny dels experiments per realitzar els espectres de diferència**

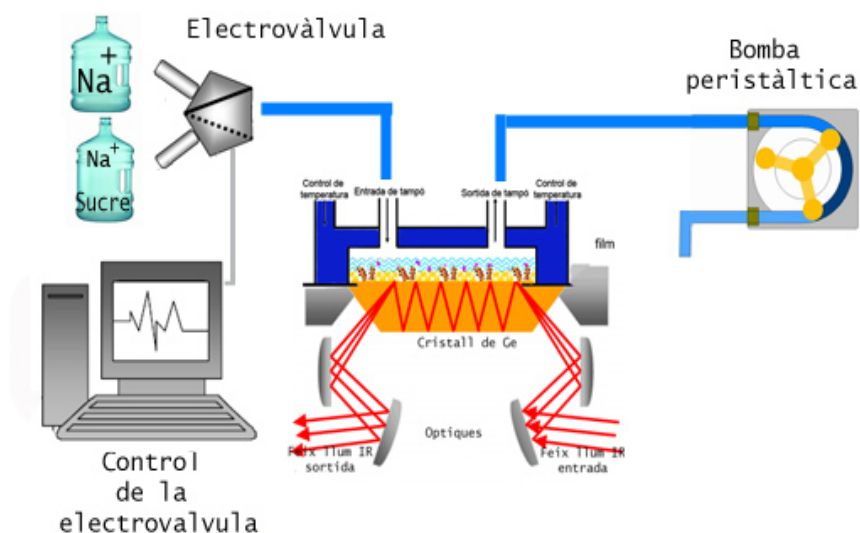
El disseny per realitzar aquests espectres de diferència va ser desenvolupat pel Dr. X. León i es troba exposat en la seva tesi doctoral (LEÓN 2006). A continuació es fa un breu resum del procés.

El temps d'exposició de la mostra amb el tampó de rentat i amb el tampó que conté el substrat es troben detallats a la taula 3.1. El flux dels tampons es manté constant a 1,5 ml/min El canvi dels tampons està dirigit per una electrovàlvula que és controlada per un ordinador (figura 3.7). Tant abans com després de canviar de tampó s'obtenen 1000 escombrats de la mostra a 4 cm<sup>-1</sup> de resolució. Per tal d'incrementar la relació senyal/soroll, es van realitzar un total de 25 repeticions del canvi de tampó, promitjant-les per

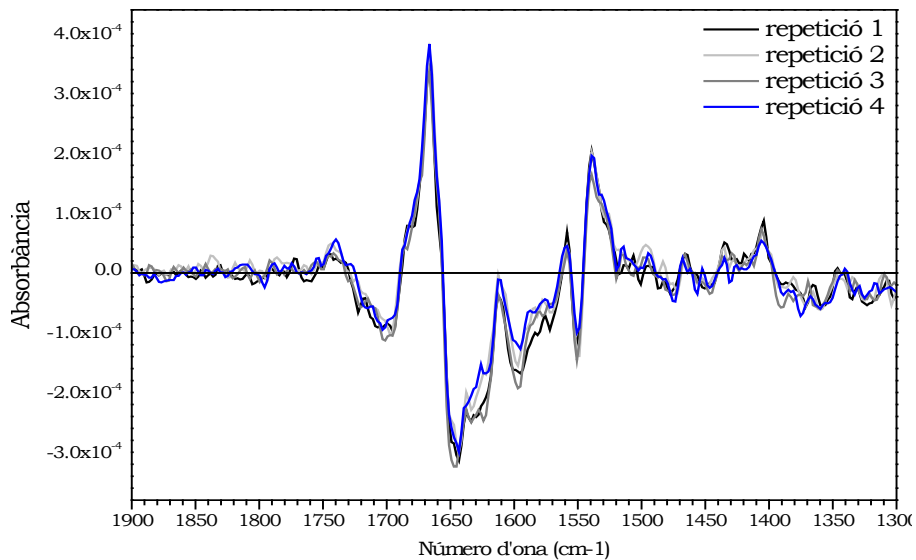
obtenir un espectre de diferència amb un total acumulant de 25000 escombrats.

Espectre de diferència	Tampó de rentat	Tampó de substrat
Na 10 mM vs H	10 min Tampó R10	2 min Tampó Sodi 10
Na 50 mM vs H	30 min Tampó R50	4 min Tampó Sodi 50
Mel 10 mM Na vs Na	10 min Tampó Sodi 10	4 min Tampó Sodi i Sucre 10
Mel 50 mM Na vs Na	30 min Tampó Sodi 10	4 min Tampó Sodi i Sucre 50
Mel 50 mM vs H	30 min Tampó R	4 min Tampó Sucre 50

Cada experiment dura aproximadament 20 hores i es van realitzar un mínim de 2 experiments independents amb mostra nova. L'espectre de diferència utilitzat és la mitja de tots els experiments independents i a la vegada aquests espectres són la mitja d'aquest 25 espectres individuals. Els quals presenten una repetitivitat bona, tal com es pot observar en la figura 3.8, on tenim 4 repeticions consecutives del mateix espectre.



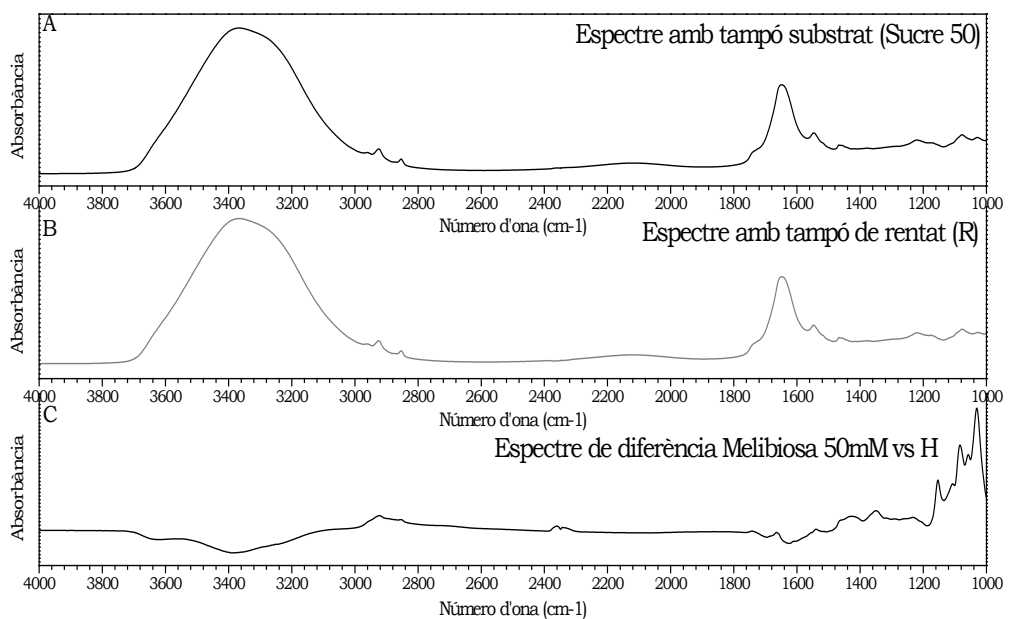
**Figura 3.7** Esquematització del muntatge utilitzat per realitzar els espectres de diferència induïts per la unió de substrats.



**Figura 3.8** Espectres de diferència del mutant 3SV causats per la interacció de melibiosa 50 mM en presència de protó. Cada espectre és el resultat d'un cicle, és a dir, són repeticions consecutives.

### 3.6.7 Correcció dels espectres de diferència

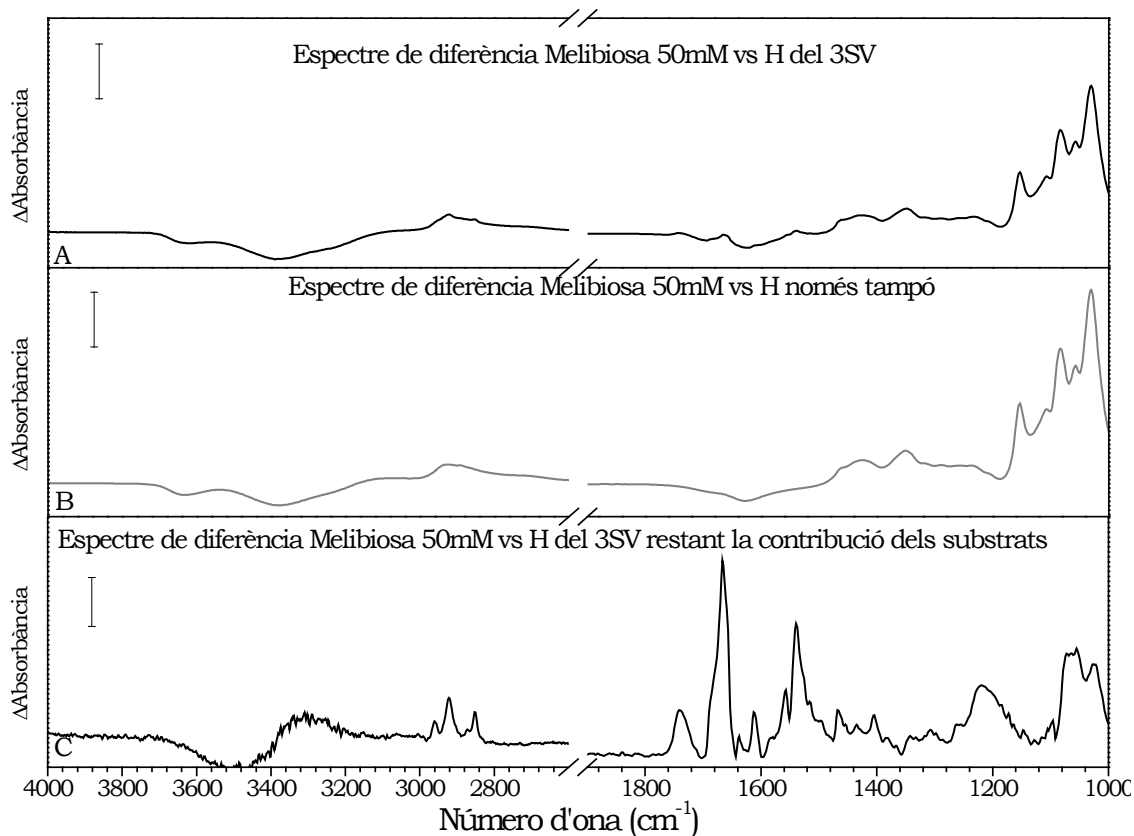
L'espectre de diferència s'obté restant l'espectre obtingut amb substrat a l'espectre obtingut amb el tampó de rentat (veure figura 3.9).



**Figura 3.9** Espectres d'absorbància obtinguts després del tampó **sucre 50 (A)** i Tampó **R (B)**, **C** és l'espectre de diferència obtingut restant A de B.

Un espectre de diferència obtingut tal com s'ha exposat té 4 contribucions possibles:

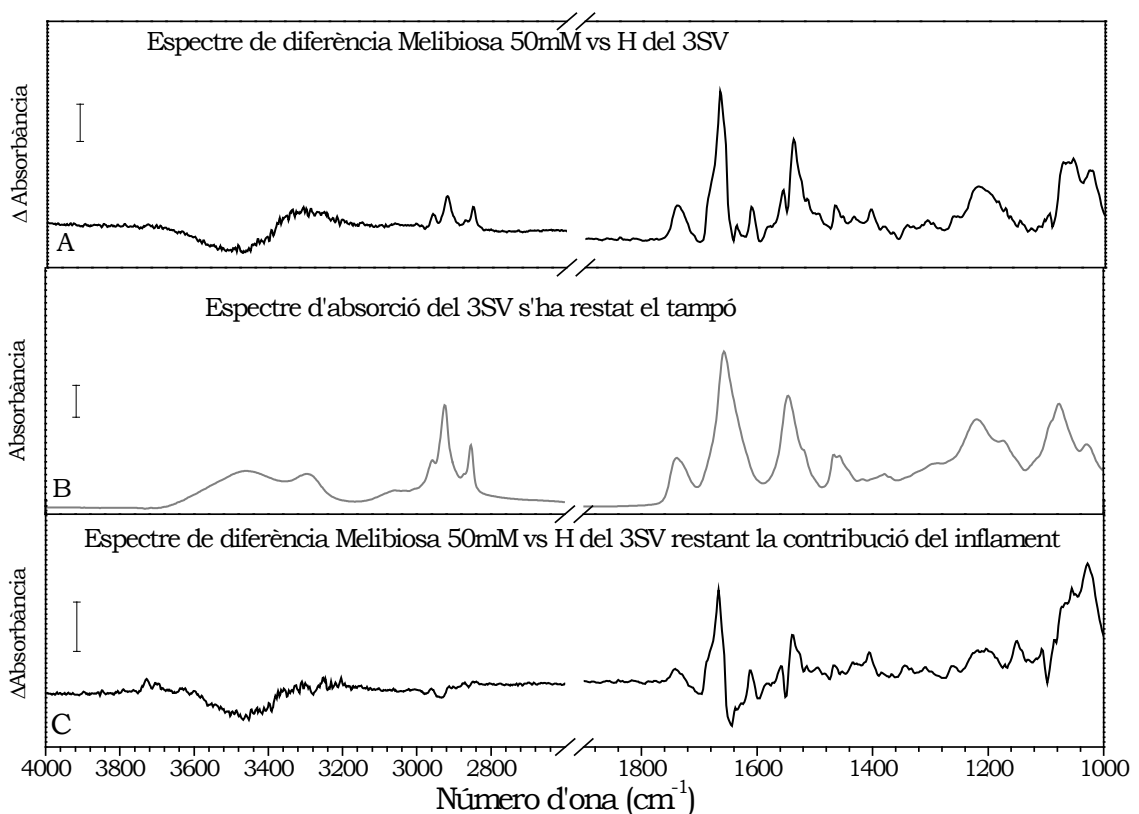
- I. Espectre de diferència de la mostra (proteïna i lípid) induït específicament per la unió dels substrats. És l'espectre d'interès.
- II. Espectre de diferència de l'aigua induït per la presència dels substrats, els quals modifiquen l'estructuració de l'aigua (VENYAMINOV i KALNIN 1990).
- III. Absorbància dels substrats (en el nostre cas la melibiosa, ja que els cations no absorbeixen).
- IV. Canvi en l'inflament del film, amb un aparent guany/pèrdua de mostra amb una respectiva pèrdua/guany d'aigua.



**Figura 3.10** **A:** Espectre de diferència del mutant 3SV (melibiosa 50 mM respecte protó); **B:** Espectre de diferència de melibiosa 50 mM respecte protó (sense mostra); **C:** Espectre de diferència del mutant 3SV (melibiosa 50 mM respecte protó) sense la contribució dels substrats, s'obté restant l'espectre B a l'espectre A.

Les contribucions II i III van ser corregides restant a l'espectre de diferència obtingut una diferència dels tampons (sense mostra). El factor de resta que es va fer servir va ser el que va permetre obtenir la zona d'absorció de l'aigua entre  $3700$  i  $2800\text{ cm}^{-1}$  plana i restar completament les bandes d'absorció degudes als substrats (la melibiosa dóna una banda intensa a  $1080\text{ cm}^{-1}$  a més d'altres bandes de menor intensitat). En la figura 3.10 podem observar la resta de la contribució de la melibiosa.

L'última contribució es va corregir restant, de la diferència obtinguda, un espectre d'absorbància dels proteoliposomes (veure figura 3.11). El factor de resta va ser aquell que va permetre la resta completa de les bandes de lípid (corresponents a la vibració de l'enllaç  $\text{CH}_2$ ) a  $2920\text{ cm}^{-1}$  i  $2850\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.11** **A:** Espectre de diferència del mutant 3SV (melibiosa 50 mM respecte protó); **B:** Espectre d'absorció del 3SV restant la contribució del tampó; **C:** Espectre de diferència del mutant 3SV (melibiosa 50 mM respecte protó) sense la contribució del inflament del proteoliposoma, s'obté restant l'espectre B a l'espectre A.

### 3.6.8 Desconvolució pel mètode de màxima entropia

Un dels problemes de l'espectroscòpia d'infraroig es el solapament de bandes. Generalment, les bandes als espectres tenen una separació menor que la seva amplada, implicant la seva identificació directa. La desconvolució es un mètode matemàtic per compensar aquesta limitació, i ajudar a resoldre bandes superposades. És aplicable tan a un espectre d'absorbància o com a un espectre de diferència,. La desconvolució té un inconvenient, i és que augmenta considerablement el soroll de l'espectre. Per tant, per ser aplicable la desconvolució ha de treballar amb certa supressió del soroll. El mètode de desconvolució més utilitzat és la desconvolució de Fourier (FD) (KAUPPINEN *et al.* 1981a; KAUPPINEN *et al.* 1981c, b), que discerneix entre el senyal (dades sense soroll) i el soroll només tenint en compte les seves freqüències. Aquesta aproximació té dues limitacions importants: (i) s'ha d'elegir un punt de tall de la freqüència, fent el resultat bastant arbitrari; (ii) per algunes freqüències, les contribucions del senyal i el soroll són igualment significatives, per tant podem descartar senyal vertader o incloure soroll en la desconvolució resultant. Per tal d'evitar aquestes limitacions, s'han descrit altres mètodes com és el cas de la desconvolució per màxima entropia (MaxEntD) (STEPHENSON 1988). Aquesta desconvolució segueix una altra aproximació per discriminar el soroll de les dades. El senyal és discriminat del soroll gràcies a la propietat de descriure les dades mentre manté la solució de la desconvolució el més simple possible, al contrari del que fa el soroll. Aquest mètode dona la solució més simple, amb menys informació o més probable entre totes les solucions possibles. La simplicitat, falta d'informació o probabilitat d'aquesta solució és mesurada normalment per una funció que rep el nom d'entropia. Aquesta desconvolució permet un major estretament amb menys soroll que la desconvolució per Fourier i a més és més robusta que els mètodes de predicció lineal. Per tant, es pot considerar com una de les desconvolucions més potents que hi ha actualment.

Anteriorment aquesta desconvolució assumia que tots els valors eren positius. Però recentment (LÓRENZ-FONFRÍA 2005) han introduït una nova expressió d'entropia (Burg-entropy) sense restricció de signe que, entre

altres avantatges, la fa ser molt adequada a l'hora de desconvolució d'espectres de diferència.

#### *3.6.8.1 Desconvolució dels espectres de diferència mitjançant el mètode de la màxima entropia*

Per a la desconvolució mitjançant el mètode de la màxima entropia es van fer servir bandes Lorentzianes de  $7 \text{ cm}^{-1}$  d'amplada. Aquest valor es va determinar a partir dels espectres de diferència com descriu Saarién (SAARINEN 1995). Per a la desconvolució per màxima entropia cal especificar el valor del paràmetre de regularització. Aquest paràmetre determina el nivell de detall de l'espectre que és assignat a la senyal (i cal reproduir) i al soroll (que no cal reproduir). Per experiència prèvia, es va fer servir un regularitzador de  $10^{-11}$  en els espectres adquirits amb el cristall de Ge. Es declarava la convergència quan en dues iteracions consecutives, funcions consecutives i espectres consecutius variaven menys que el llindar seleccionat. Els valors per aquests dos paràmetres van ser de  $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  respectivament (LÓRENZ-FONFRÍA 2005).

#### **3.6.9 Comparació quantitativa de la intensitat i semblança dels espectres de diferència dels mutants respecte al 3SV**

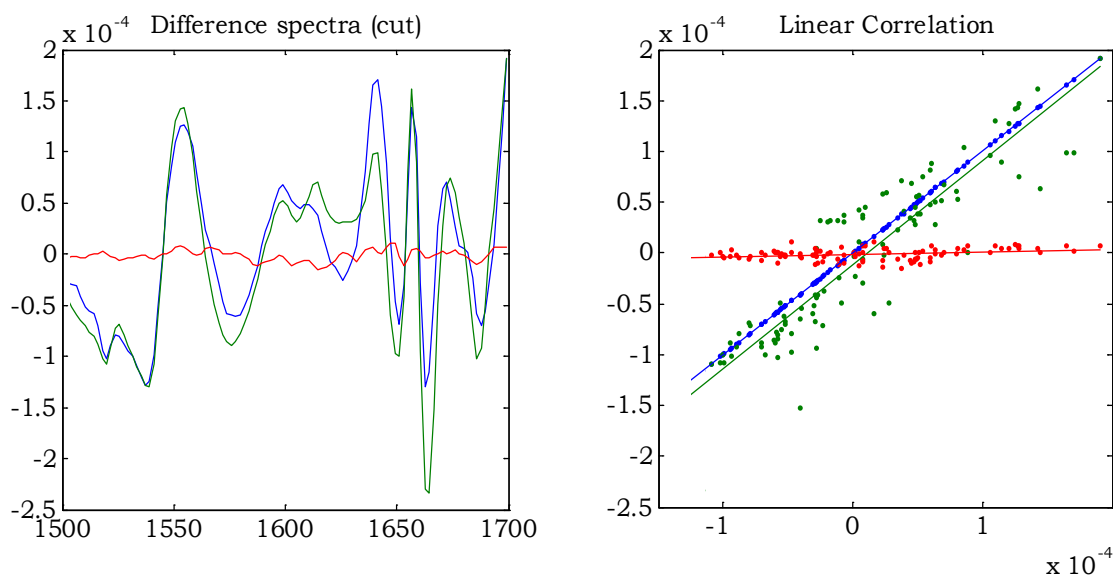
Els espectres de diferència ens informen dels canvis que es donen a la MelB induïts per la presència dels diferents substrats. Per tant, variacions en els espectres de diferència entre els diferents mutants i el 3SV estaran relacionats amb canvis de l'efecte dels substrats degut a les mutacions. Per tant la seva quantificació és altament rellevant. Comparar canvis d'intensitat i de número d'ona banda a banda presenta molts problemes, tant per l'elevat número de bandes com per la dificultat de fixar quines bandes s'han de comparar, en cas de canvis en la quantitat de bandes resoltes. Per tant, resulta molt més pràctic i realista comparar els espectres no banda per banda, sinó globalment, quantificant només dos aspectes: intensitat global de l'espectre de diferència, i semblança global de l'espectre de diferència, prenent com a referència al 3SV.

La quantificació tant de la intensitat com de la semblança d'un espectre de diferència respecte al del 3SV s'ha realitzat per correlació lineal. Es



representa les diferències d'absorbància d'un mutant respecte a les diferència d'absorbància del 3SV per a un interval de número d'ona donat (1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ ). La gràfica resultat s'ajusta a una recta, i la pendent ens dona la intensitat relativa de l'espectre de diferència del mutant. El factor de correlació R quantifica com de bé s'ajusta la recta als punts experimentals, és a dir, fins a quin punt l'espectre de diferència del mutant pot reproduir-se amb l'espectre de diferència del 3SV.

Per raons pràctiques, aquest procés no s'ha realitzat directament amb els espectres de diferència, sinó amb la segona derivada dels espectres de diferència. La raó és que els espectres de diferència poden mostrar canvis en la línia base originats per la dificultat del procés de correcció (detallat en 3.6.7). Aquesta línia base pot interferir en la mesura de la correlació. La segona derivada minimitza la contribució de canvis en la línia base, donant valors de correlació més robustos. També cal dir que per millorar la quantificació dels canvis d'intensitat respecte al 3SV, els espectres de diferència utilitzats han estat escalats per la intensitat de l'amida I, és a dir, s'han normalitzat per la quantitat de proteïna.



**Figura 3.12** Gràfiques de la segona derivada de l'espectre de diferència induït pel sodi i de la correlació lineal d'aquest espectre dels mutant D19C (en verd) i D55C (en vermell) respecte el 3SV (en blau).

El procés es mostra de manera il·lustrativa a la figura 3.12. A l'esquerra podem veure la segona derivada de tres espectres de diferència (3SV, D19C i D55C) en l'interval 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ . A la dreta es representa amb punts la segona derivada del 3SV vs 3SV (blau), D19C vs 3SV (verd), i D55C vs 3SV (vermell). Com és natural, per al 3SV vs 3SV l'ajust lineal es perfecte ( $R=1$ ), amb una pendent 1, es a dir, amb una semblança del 100% i una intensitat del 100%. Per al D19C vs 3SV la pendent es lleugerament superior a 1 (l'espectre de diferència del D19C és més intens que el del 3SV), i els punts s'ajusten bé a una recta però no perfectament (correlació alta però menor que 1). Per al D55C vs 3SV la pendent és pràcticament nul·la, i encara que no es pot apreciar per la baixa intensitat, els valors del D55C i del 3SV no mostren pràcticament correlació (semblança no apreciable).

### 3.7 Espectroscòpia de fluorescència

La fluorescència és un procés d'emissió de fotons prèvia excitació de les molècules per l'absorció de radiació electromagnètica: les espècies excitades es relaxen cap al seu estat basal, alliberant el seu excés d'energia en forma de fotons. Normalment, el temps de vida mitja d'una espècie excitada és petit perquè hi ha diferents maneres en què un àtom o una molècula excitada pot alliberar el seu excés d'energia i relaxar-se cap el seu estat basal. Els processos que permeten alliberar l'excés d'energia són l'emissió de calor, la fosforescència i la fluorescència. Comparativament, però, el temps de vida mig d'una espècie excitada és molt més gran que el procés d'absorció.

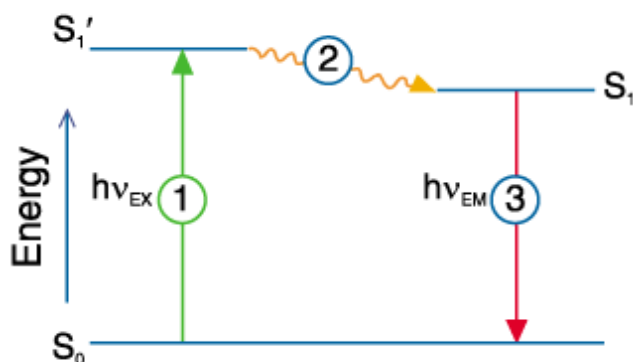
La fluorescència és el resultat d'un procés en tres etapes que té lloc en certes molècules que s'anomenen fluoròfors. El procés pel qual té lloc la fluorescència està representat en la figura 3.13. A la primera etapa del procés, un fotó d'energia és absorbit pel fluoròfor, i com a conseqüència els electrons d'aquest passen del seu estat basal ( $S_0$ ) a un nivell excitat ( $S_1$ ). En la segona etapa, l'estat excitat roman un cert temps que depèn essencialment de la seva naturalesa i de les interaccions amb el medi.

Durant aquesta etapa poden tenir lloc diferents processos:

1. L'energia de l'estat excitat es dissipa parcialment en forma de calor i dona lloc a un estat electrònic relaxat ( $S_1$ ). A partir d'aquest es genera la fluorescència.
2. Procés que pot tenir lloc és la desactivació deguda a col·lisions laterals.
3. La transferència d'energia cap a molècules presents al medi mitjançant un procés de ressonància, que fan disminuir la població de molècules en estat excitat.

La mesura de la quantitat relativa d'aquests processos és el rendiment quàntic. Aquest es defineix com la relació entre el número de fotons fluorescent emesos (etapa 3) i el número de fotons absorbits (etapa 1).

En l'última etapa el fluoròfor retorna al seu estat basal emetent un fotó. L'energia emesa per aquest fotó és menor que l'energia absorbida, degut a la dissipació de l'energia que s'ha produït en l'etapa anterior. Això, s'anomena desplaçament d'Stokes, on tenim que la longitud d'ona emesa és més gran que la longitud d'ona absorbida.



**Figura 3.13** Diagrama de Jablonski on es descriuen els processos implicats en la fluorescència.

### 3.7.1 Fluorescència dels triptòfans

L'espectroscòpia de fluorescència ha estat de gran utilitat per a l'estudi dinàmic de les proteïnes, degut a la seva alta sensibilitat i selectivitat.

Els residus aromàtics tal com Phe, Trp o Tyr que es troben sovint en les proteïnes, presenten fluorescència. Aquesta fluorescència s'anomena intrínseca, mentre que les sondes fluorescentes que s'uneixen a les proteïnes s'anomenen fluoròfors extrínsecs. La fluorescència dels Trp presenta un gran interès, ja que és més intensa que la fluorescència de les Tyr, i molt més que les Phe. A més, podem utilitzar una longitud d'ona d'excitació (290 nm) en què pràcticament només absorbeix el Trp. A més, el rendiment quàntic i la posició del màxim d'absorció són sensibles a petits canvis del seu entorn.

Per exemple, la unió d'un lligand que provoqui el moviment d'un Trp d'una posició polar, en la superfície de la proteïna, a una menys polar, en

l'interior de la proteïna, induirà un augment de la fluorescència del Trp i/o un desplaçament de la banda de fluorescència. Aquesta sensibilitat de la fluorescència del Trp ens permet relacionar els canvis de fluorescència amb canvis conformacionals. Malgrat que, aquesta interpretació pot ser difícil si tenim més d'un Trp que contribueix a la fluorescència.

Adicionalment, les sondes externes són molt útils per detectar canvis en un lloc concret de la proteïna sempre que no afectin l'estructura o la funció de la proteïna. Per exemple, les sondes fluorescents derivades de grups tiol o grups maleïmida poden reaccionar amb residus Cys. Així doncs, es pot generar un mutant de la proteïna amb un sol residu Cys on fem reaccionar la sonda, això ens permet obtenir informació localitzada de canvis conformacionals. També, es poden generar sondes que actuïn com a substrat: seria el cas dels grups dansil units a un sucre. Aquests ens aportaran informació del lloc d'unió del substrat.

### **3.7.2 Mesures de la fluorescència intrínseca de la MelB**

Les mesures de fluorescència es van realitzar amb un espectrofluorímetre QuantaMaster™ UV VIS i es van processar amb el software Felix 32 (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA). La longitud d'ona d'excitació utilitzada va ser 290 nm amb una amplada de banda de 5 nm, mentre que per obtenir l'espectre d'emissió es va utilitzar el rang (310-400 nm), amb una amplada de banda de 8 nm, i per les cinètiques es va recollir la fluorescència a 325 nm amb una amplada de banda de 8 nm.

Es va utilitzar 35 µg de proteoliposomes de MelB (K<sub>P</sub><sub>i</sub> 100 mM pH 7), corresponent a una concentració de proteïna 23 ng/µl. La mostra es va sonicar 30 segons en un bany d'ultrasons (*Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6*) a màxima potència a 4°C, abans d'afegir-lo a la cubeta de fluorescència.

Es van realitzar un espectre d'emissió de la proteïna sense substrats, després es va seguir al llarg del temps la variació de fluorescència causada per la unió de la melibiosa a la proteïna, i al final de la cinètica es va obtenir un altre espectre d'emissió de la proteïna unida al sucre. Aquest procés es va repetir per la unió del sodi i per la unió del sodi en presència de melibiosa. Es va fer la mitja de dos experiments com a mínim per espectre i

per cinètica. Es va restar l'espectre del tampó sense proteïna en tots els casos.

### 3.7.3 Mesura del FRET entre els Trp i el dansil-galactosid

S'han realitzat mesures de transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) entre els Trp de la MelB i l'anàleg de sucre fluorescent 2'-N-dansil-aminoetil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosid (Dns<sup>2</sup>-S-Gal). Aquest anàleg de sucre conté com a grup fluorescent, el dansil que presenta variacions de la fluorescència en funció de la polaritat del medi on es troba. D'aquesta manera podrem mesurar canvis de propietats fisico-químiques de la proteïna deguts a la unió del dansil-galactosid al lloc d'unió del sucre (MAEHREL *et al.* 1998).

El FRET és un procés no radiatiu, on l'energia d'excitació passa des d'una molècula fluorescent donadora a una molècula fluorescent acceptora, si es troben a una distància menor de 10-100Å i en l'orientació adient. A més, és necessari que hi hagi un solapament de l'espectre d'emissió del donador amb l'espectre d'absorció de l'acceptor.

Els factors que cal tenir en compte quan s'estudia qualsevol procés mitjançant FRET són:

- L'eficiència en la transferència d'energia entre el donador i l'acceptor, la qual depèn del grau de superposició entre l'espectre d'emissió del primer i l'espectre d'absorció dels segon;
- El rendiment quàntic del donador;
- L'orientació relativa dels dipols del donador i acceptor;
- La distància entre ambdues molècules, que és el paràmetre que normalment es vol obtenir.

En el nostre cas els Trp actuaran com a donador i la sonda Dns<sup>2</sup>-S-Gal actuarà com a acceptor.

Les mesures de fluorescència es van realitzar amb l'espectrofluorímetre descrit anteriorment. Els espectres d'emissió per veure el FRET entre Trp i

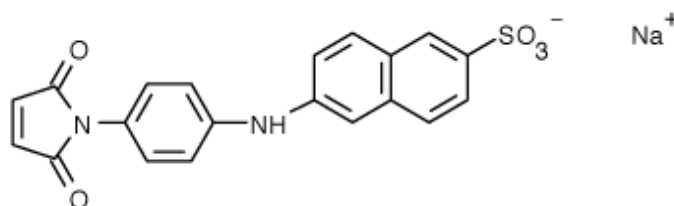
Dns<sup>2</sup>-S-Gal s'han realitzat excitant a 290 nm amb una amplada de banda 5 nm i mesurant la emissió en el rang 310-570 nm amb una amplada de banda 8 nm. Els espectres d'emissió per veure la fluorescència directa del Dns<sup>2</sup>-S-Gal s'han realitzat excitant a 325 nm amb una amplada de banda 5 nm i mesurant l'emissió en el rang 400-570 nm amb una amplada de banda 8 nm.

La concentració de proteoliposomes de MelB (KPi 100 mM, KCl 100 mM pH 7) utilitzada és proteïna 50 ng/μl i es va sonicar 30 segons, en un bany d'ultrasons (*Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6*) a màxima potència a 4°C. Es va obtenir un espectre d'emissió abans de afegir el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, després es va afegir 15 μM de dansil-galactòsid i s'adquirí un altre espectre d'emissió. A continuació afegeix Na<sup>+</sup> 10 mM (concentració final) i adquireix un altre cop l'espectre d'emissió. La resta d'aquest espectre amb l'anterior ens donarà la senyal de FRET induïda pel sodi (MAEHREL *et al.* 1998).

Per poder comparar senyal específics de FRET els espectres han estat normalitzats per la variació de la quantitat de MelB unida a dansil-galactòsid (CORDAT *et al.* 1998).

### 3.7.4 Marcatge dels proteoliposomes amb MIANS

2-(4'-maleimidylanilino)-naphthalene-6- sulfonic acid (MIANS, *Molecular Probes, Eugene, OR, USA*) és una sonda que reacciona amb grups tiol. Per tant, els residus de Cys són uns bons substrats (veure figura 3.14).



**Figura 3.14** Estructura del MIANS

Per tal d'estudiar llur accessibilitat, fem reaccionar els mutants puntuals que contenen un sol residu Cys amb el MIANS. És un reactiu molt potent perquè només presenta fluorescència un cop ha reaccionat, per tant no és necessari separar o rentar per eliminar el MIANS que no ha reaccionat. A

més a més, aquesta sonda presenta una alta sensibilitat a l'entorn on es troba i presenta més fluorescència en ambients hidrofòbics (HOGLAND i JAY 2002).

Les mesures de fluorescència es van realitzar amb l'espectrofluorímetre descrit anteriorment. Els espectres d'emissió per veure la fluorescència directa del MIANS s'han realitzat excitant a 325 nm amb una amplada de banda 5 nm i mesurant l'emissió en el rang 350-560 nm amb una amplada de banda 8 nm. Les cinètiques s'han realitzat excitant a 325 nm i mesurant l'emissió a 415 nm.

La concentració de proteoliposomes de MelB (KPi 100 mM, KCl 100 mM pH 7) utilitzada és proteïna 20 ng/ $\mu$ l i es va sonicar 30 segons, en un bany d'ultrasons (*Ultrasonic cleaner de Fungilab US 1.6*) a màxima potencia a 4°C. Es va obtenir un espectre d'emissió abans de començar la reacció del MIANS amb la proteïna, i s'inicià la reacció afegint 1 $\mu$ l MIANS 24 mM dissolt en DMSO. A l'acabar la reacció es va realitzar un altre espectre d'emissió.



## Resultats i Discussió

## 4. Resultats i discussió

### 4.1 Cultiu i purificació dels mutants de la permeasa de melibiosa

Les cèl·lules *E. coli* DW2-R competents es van transformar amb el plasmidi pK95 $\Delta$ AHB que conté el gen de la permeasa de melibiosa (MelB). (veure Materials i Mètodes). El plasmidi 3SV conté el gen de la MelB on s'han substituït totes les cisteïnes natives per altres residus. En concret, s'han substituït les 4 cisteïnes natives localitzades a les posicions 110, 235, 310 i 364 per serines, excepte en el cas de la Cys 235 que s'ha de substituir per una valina, ja que dona millors rendiments de la permeasa (WEISSBORN *et al.* 1997). El mutant 3SV presenta una expressió similar a la que s'ha observat pel WT, continua transportant melibiosa fent servir Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> o H<sup>+</sup> com a cosubstrats i conserva aproximadament les mateixes propietats cinètiques de la MelB salvatge (WEISSBORN *et al.* 1997). Aquest plasmidi ha estat cedit pel Dr. Leblanc.

Els altres plasmidis contenen les mutacions del 3SV, és a dir, no tenen les cisteïnes natives de la MelB i a més contenen una mutació puntual. Aquesta mutació puntual correspon a cadascun dels residus que s'ha proposat en estudis previs que són necessaris per a la unió dels cations a la permeasa (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993; POOLMAN *et al.* 1996; DING i WILSON 2001b). Són quatre residus d'àcid aspàrtic (Asp o D) i també una asparagina (Asn o N):

- Asp 19 (hèlix I)
- Asp 55, Asp 59 (hèlix II)
- Asp 124 (hèlix IV)
- Asn 58 (hèlix II)

En aquests plasmidis, cedits pel Dr. Leblanc, s'ha substituït el residu d'àcid aspàrtic/asparagina per una cisteïna. Per aquesta raó, anomenarem

aquests mutants de MelB per la mutació que tenen cadascun: D19C, D55C, D59C, D124C i N58C.

Addicionalment, en el nostre laboratori es va realitzar el plasmidi on es substituïa l'Asp 59 per Glu, que anomenarem D59E. Aquest mutant ens permetrà estudiar la importància de la presència del grup carboxilat en aquest residu per la interacció del catió amb la MelB.

Per poder veure el comportament de cada mutant durant el cultiu bacterià, es va obtenir una corba de creixement que demostra una gran similitud entre els diferents mutants (no mostrat). Això evidencia que les mutacions en la permeasa, tot i que podem abolir (o afectar) la seva funció com a transportador, no afecten de manera important el procés de creixement bacterià ja que el bacteri pot utilitzar altres substrats per créixer.

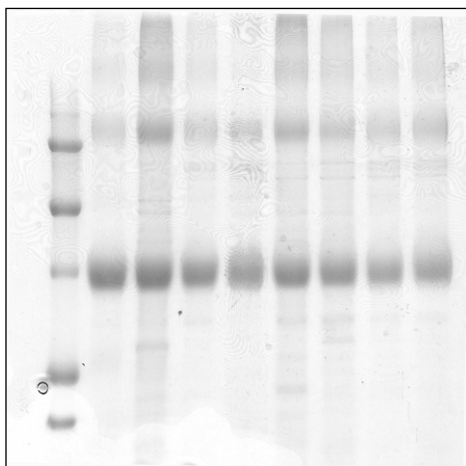
Mutants	3SV	D19C	D55C	N58C	D59C	D59E	D124C
<b>Fenotips<sup>a</sup></b>	vermell	blanc centre rosa	blanc centre rosa	rosa	blanc centre rosa	rosa	blanc
<b>Nivell<sup>b</sup> d'expressió</b>	100%	31%	104%	53%	82%	100%	40%
<b>Rendiment purificació<sup>c</sup></b>	100%	32%	37%	40%	23%	20%	41%

**Taula 4.1** Caracterització dels mutants, **a:** fenotips obtinguts en plaques MacConkey amb 10 mM melibiosa, 150 µg/ml ampicilina i 10 µg/ml tetraciclina; **b:** nivells d'expressió dels mutants, obtingut per immunoblot, **c:** percentatge de proteïna obtinguda en la purificació en relació a 3SV obtingut pel mètode de Lowry.

Per a cadascun dels plasmidis s'ha seqüenciat el gen complet de la MelB per comprovar que només contenien la mutació desitjada. Els bacteris transformats s'han sembrat en plaques MacConkey amb melibiosa (veure Materials i Mètodes), que permet obtenir els fenotips de cada mutació (veure taula 4.1). Breument, si hi ha transport de melibiosa la cèl·lula la fermentarà, produint com a conseqüència una disminució del pH de medi, i

obtenim les colònies vermelles. Si no hi ha transport, no hi haurà fermentació de melibiosa, i les colònies seran blanques.

En la taula 4.1 podem observar el nivell d'expressió de cadascun dels mutants que s'obté utilitzant un anticòs contra MelB en extractes de cèl·lules. El resultat es dona en percentatge respecte l'expressió del 3SV. En la tercera línia podem observar el rendiment de la purificació de cadascun dels mutants, en relació a l'obtingut pel 3SV. Veiem que els mutants D19C, D124C i N58C tot i tenir una expressió no molt alta en cèl·lules, tenen un rendiment de purificació semblant al d'expressió. Per tant, aquests mutants són bastant estables durant el procés de purificació. En canvi, D55C, D59C i D59E presenten una expressió més alta en cèl·lules, però obtenim un rendiment de purificació inferior a la meitat de l'expressió.



**Figura 4.1** Gel SDS-PAGE 12% dels diferents mutants de MelB. D'esquerra a dreta: estàndard de pesos moleculars, WT, 3SV, D19C, D55C, D59C, D59E, D124C i N58C

En la figura 4.1 presentem un gel SDS-PAGE, on podem observar el grau de puresa dels diferents mutants després de llur reconstitució amb lípids d'*E. coli*. Els carrils s'han sobrecarregat per tal d'observar possibles contaminacions. En la figura 4.1 es pot observar la presència de dímers, que es generen a l'interaccionar amb el SDS, per tant no aporten informació sobre l'estat d'agregació de la mostra, ja que són un artefacte del gel (RATH *et al.* 2009). A més, també s'observen certes bandes minoritàries d'altres

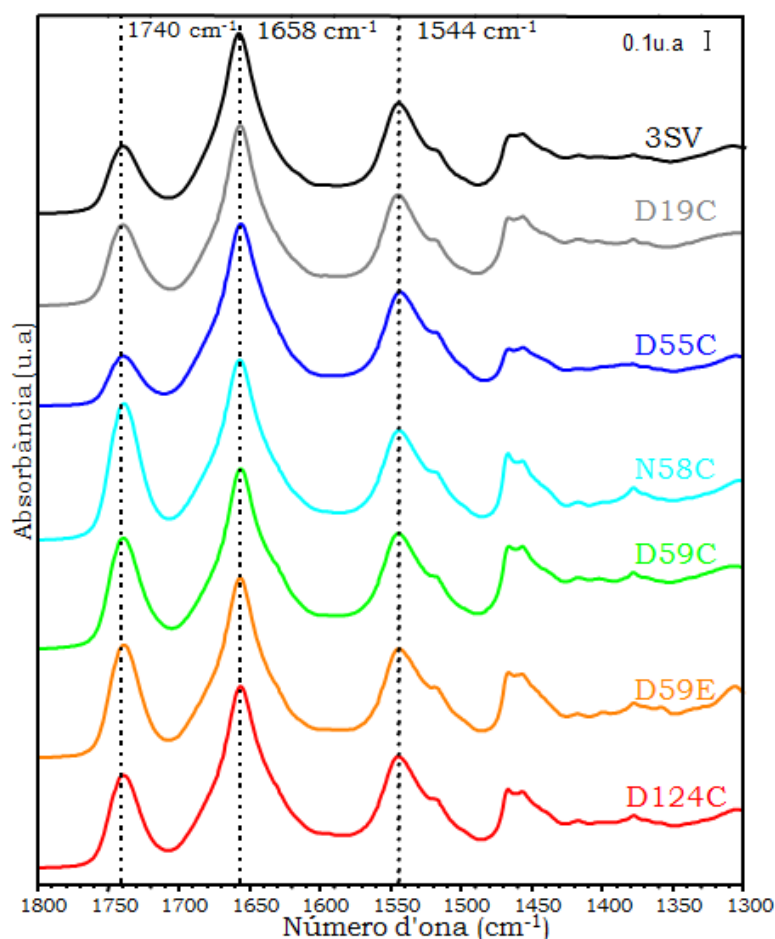
proteïnes, que en el nostre cas no interfereixen a l'estudiar interaccions específiques de la MelB amb els seus substrats.

## 4.2 Comprovació de l'estat dels proteoliposomes per espectroscòpia d'infraroig

Després de comprovar la proteïna mitjançant SDS-PAGE, que permet veure el nivell de puresa de la mostra, s'ha analitzat l'estat de la proteïna purificada des d'un punt de vista més estructural mitjançant l'espectroscòpia d'infraroig. Després de cada purificació i abans de cada espectre de diferència s'adquireix un espectre d'absorbància de la proteïna. Aquest espectre ens permet determinar si la relació lípid/proteïna és l'esperada, per tant confirmar que la proteïna s'ha incorporat sense problemes als liposomes. Per altra banda, gràcies a la ben coneguda correlació estructura-freqüència de l'amida I (SUREWICZ *et al.* 1993), l'espectre d'absorbància ens dóna informació sobre l'estructura de la proteïna reconstituïda. Per exemple, un procés d'agregació intermolecular, que porta a la pèrdua de funcionalitat de la proteïna, pot detectar-se per l'aparició d'una banda característica al voltant de  $1627\text{ cm}^{-1}$ , acompanyada d'una altra menys intensa i estreta al voltant de  $1690\text{ cm}^{-1}$  (CLARK *et al.* 1981; PRESTRELSKI *et al.* 1993; MARSH 1999). Conseqüentment, l'absència d'agregació en les mostres es pot confirmar per l'absència d'aquestes dues bandes en l'espectre d'absorbància.

Un cop tenim la proteïna reconstituïda fem un espectre d'absorció, estenent  $20\text{ }\mu\text{l}$  de proteoliposomes en el cristall de ATR ( $150\text{ }\mu\text{g}$ ). En aquestes condicions, la relativa baixa concentració de proteïna combinada amb la gran contribució a l'absorbància de l'aigua dificulta enormement l'observació de l'espectre de la proteïna. Assecant lentament la mostra, primer a humitat ambient i després amb un flux de nitrogen sec, es forma espontàniament una pel·lícula de proteoliposomes sobre el cristall d'ATR. Això permet mesurar directament la seva absorbància sense requerir la sostracció de la contribució de l'aigua. S'ha de dir que encara que a aquesta condició experimental li diem film sec, la mostra no es troba totalment seca, ja que retén la quantitat suficient d'aigua per preservar la seva estructura (GOORMAGHTIGH *et al.* 1999).

A la figura 4.2 es mostra l'espectre d'absorció d'una pel·lícula de film sec de la MelB 3SV reconstituïda i la dels altres mutants. Observem un pic a  $1658\text{ cm}^{-1}$  corresponent al màxim de l'amida I i un pic a  $1544\text{ cm}^{-1}$  que correspon al de l'amida II. No s'observa cap signe espectroscòpic d'agregació. Les posicions d'aquests pics indiquen que la proteïna conté majoritàriament hèlix  $\alpha$  (GOORMAGHTIGH *et al.* 1994; CABIAUX *et al.* 1997; DAVE *et al.* 2000). Tots els mutants presenten un espectre semblant en la regió de l'amida I i l'amida II ( $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ), suggerint que les mutacions introduïdes no donen lloc a canvis conformationals significatius en l'estructura del transportador.



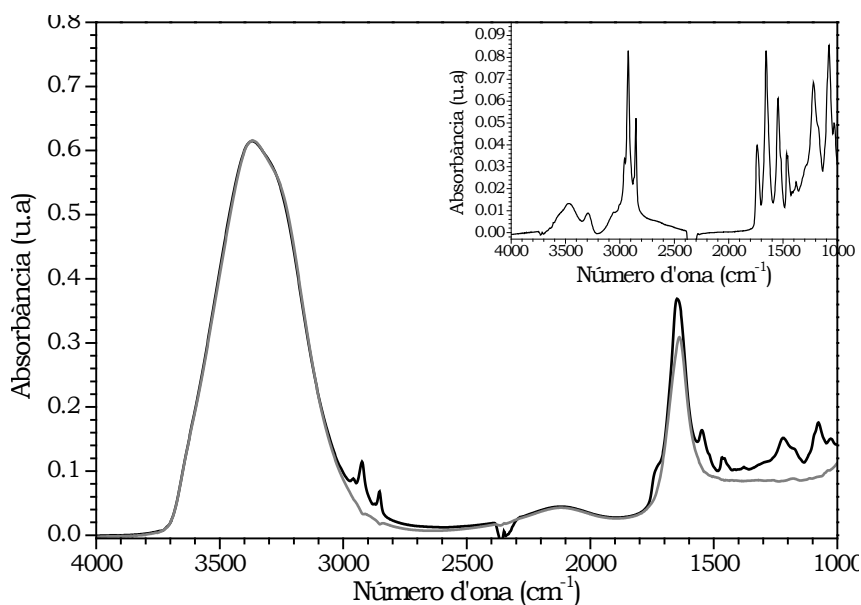
**Figura 4.2** Espectres d'absorció obtinguts per ATR-IR de films secs de proteoliposomes per al 3SV, D19C, D55C, N58C, D59C, D59E i D124C. Resolució,  $2\text{ cm}^{-1}$ ; 2000 escombrats.

S'observa també una banda a  $1740\text{ cm}^{-1}$ , que correspon al mode d'estirament del grup carbonil de l'èster dels lípids (DEGRIP *et al.* 1988). La relació d'àrees (o intensitats) entre la banda de carbonils dels lípids i l'amida I de la proteïna, ens permet estimar la relació lípid:proteïna a les nostres mostres. Encara que s'observen petites variacions en la relació lípid:proteïna entre diferents preparacions, aquestes variacions no afecten significativament la funcionalitat de la proteïna. Això es va deduir pel fet que preparacions del 3SV (o mutants) amb diferències en la relació lípid:proteïna final mostraren espectres de diferència induïts per substrats bàsicament indistingibles (no mostrat).



### 4.3 Estudi per espectroscòpia d'infraroig de la MelB mutada mitjançant espectres de diferència

A l'estendre i deixar assecar el film de proteoliposomes de MelB damunt del cristall d'ATR es formen una sèrie de capes multilamel·lars ordenades que queden adherides al cristall. Això permet fer passar diferents solucions aquoses per la mostra, alternant una sense i una amb substrats. Els espectres de diferència que s'obtenen mitjançant ATR-FTIR alternant solucions, ens permeten veure les variacions estructurals que sofreix la proteïna degut a la interacció amb els substrats. Així mateix poden detectar-se canvis en l'entorn de determinats aminoàcids o canvis en l'estat de protonació d'àcid aspàrtic o de l'àcid glutàmic (BARTH 2000).



**Figura 4.3** Espectre d'absorbància de proteoliposomes de la MelB amb el tampó **R** (negre); espectre d'absorció del tampó **R** (gris). En el gràfic inserit a l'extrem dret, presentem l'espectre d'absorció del film de proteoliposomes de MelB després de restar-li la contribució del tampó **R**.

En la figura 4.3 podem observar l'espectre d'absorbància d'un film hidratat de proteoliposomes del 3SV (línia negra). Degut a la presència d'aigua les bandes d'absorció de la proteïna i del lípid són difícils d'apreciar.

Si a aquest espectre li restem la contribució del tampó (línia grisa), podem observar les bandes de la MelB i dels lípids (figura inserida al costat dret).

### 4.3.1 Anàlisi dels espectres de diferència induïts per sodi

La MelB presenta un transport actiu de sucre acoblat a un gradient electroquímic de protó, sodi, o liti, tots tres compartint el mateix lloc d'unió (BASSILANA *et al.* 1988). Degut a la poca rellevància biològica que presenta el liti i els pocs transportadors que l'utilitzen el nostre estudi s'ha basat en les diferències entre el protó i el sodi. Obtenim un espectre d'absorció tal com s'ha descrit als Materials i Mètodes en presència de protó (presència inevitable per altra banda), i després en presència de sodi. Restem el primer espectre al segon i l'espectre de diferència resultant presenta bandes negatives i positives: negatives si són més intenses amb protó, i positives si són més intenses amb sodi unit.

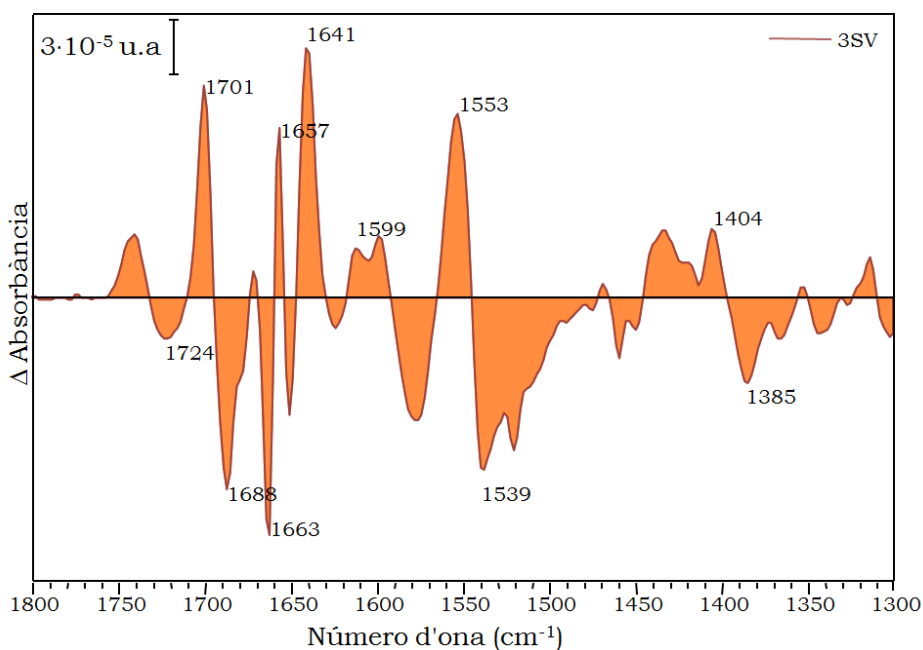
Degut a què la MelB uneix, però no transporta cations sense la presència de melibiosa (DAMIANO-FORANO *et al.* 1986), els espectres de diferència induïts per la interacció dels cations corresponen només a la unió dels cations i no inclouen canvis corresponents a llur translocació.

S'han obtingut els espectres de diferència induïts per sodi 50 mM i/o 10 mM en cadascuna de les MelB mutades. Els espectres de diferència s'obtenen tal com està descrit a Materials i Mètodes. Aquests espectres de diferència els comparem amb l'espectre de diferència del 3SV, que correspon a la permeasa de melibiosa silvestre sense cisteïnes. En estudis previs, s'ha demostrat que aquest mutant presenta un transport similar a la MelB silvestre (WEISSBORN *et al.* 1997). S'ha utilitzat aquest mutant com a control degut a què tots els mutants estudiats s'han construït a partir d'aquest.

#### 4.3.1.1 Espectre de diferència induït pel sodi del 3SV

En la figura 4.4 podem veure els pics més importants que s'obtenen en l'espectre de diferència del 3SV induït pel sodi (LEÓN *et al.* 2006), és a dir, degut a la substitució del protó pel sodi com a co-substrat. En l'amida I podem observar els pics a 1649, 1657 i 1663  $\text{cm}^{-1}$  que s'han assignat a hèlix  $\alpha$  i que sofreixen canvis d'entorn o d'orientació. Els pics a 1553 i 1539  $\text{cm}^{-1}$  corresponen a l'amida II. El pic a 1724  $\text{cm}^{-1}$  s'ha assignat a la vibració del grup carbonil protonat de la cadena lateral dels aminoàcids àcid aspàrtic o

àcid glutàmic. Els pics a 1602, 1598 i 1576  $\text{cm}^{-1}$  s'han associat a la vibració asimètrica del grup carboxilat de les cadenes laterals d'àcid aspàrtic o d'àcid glutàmic, i els pics a 1404 i 1385  $\text{cm}^{-1}$  a la vibració simètrica del grup carboxilat de les cadenes laterals d'àcid aspàrtic o d'àcid glutàmic. Els pics a 1701 i 1688  $\text{cm}^{-1}$  corresponen a girs reversos que sofreixen canvis d'entorn, mentre el pic a 1641  $\text{cm}^{-1}$  correspon a estructures  $\beta$  o girs que sofreixen canvis (LEÓN *et al.* 2005).

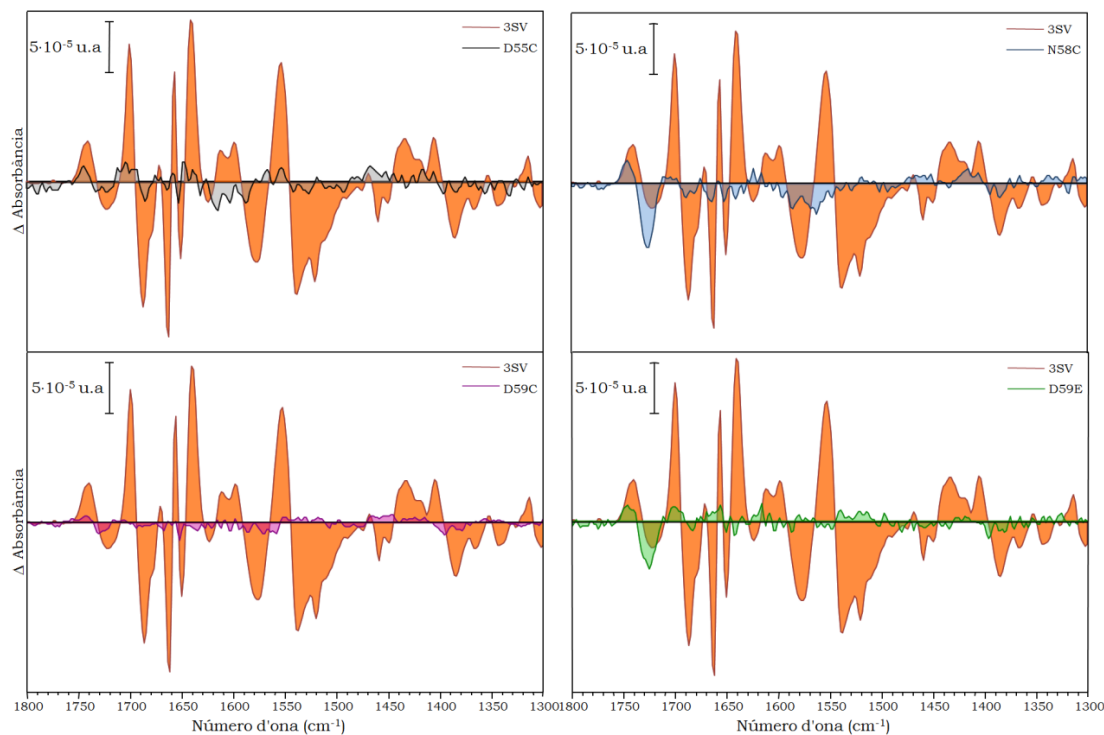


**Figura 4.4** Espectre de diferència del 3SV induït pel sodi. Aquest espectre s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb tampó **R10** a l'espectre d'absorció amb tampó **Na 10**. Resolució 4  $\text{cm}^{-1}$ , 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 254 (desviació estàndard del soroll  $1 \cdot 10^{-6}$ ).

#### 4.3.1.2 Espectres de diferència dels mutants D55C, D59C, D59E i N58C, induïts pel sodi

Els espectres de diferència dels mutants D55C, D59C, D59E i N58C s'han obtingut en presència de sodi 50 mM, mentre que els espectres de 3SV, D19C i D124C s'han obtingut en presència de sodi 10 mM. Inicialment, es van realitzar tots els espectres de diferència a una concentració de sodi 10 mM, ja que aquesta concentració és saturant pel 3SV (MUS-VETEAU *et al.* 1995). Degut a què alguns mutants no presenten

cap senyal en l'espectre de diferència, es va augmentar la concentració de sodi fins a 50 mM per tal de descartar que l'absència d'espectre de diferència no fos deguda només a una disminució de l'afinitat pel sodi.

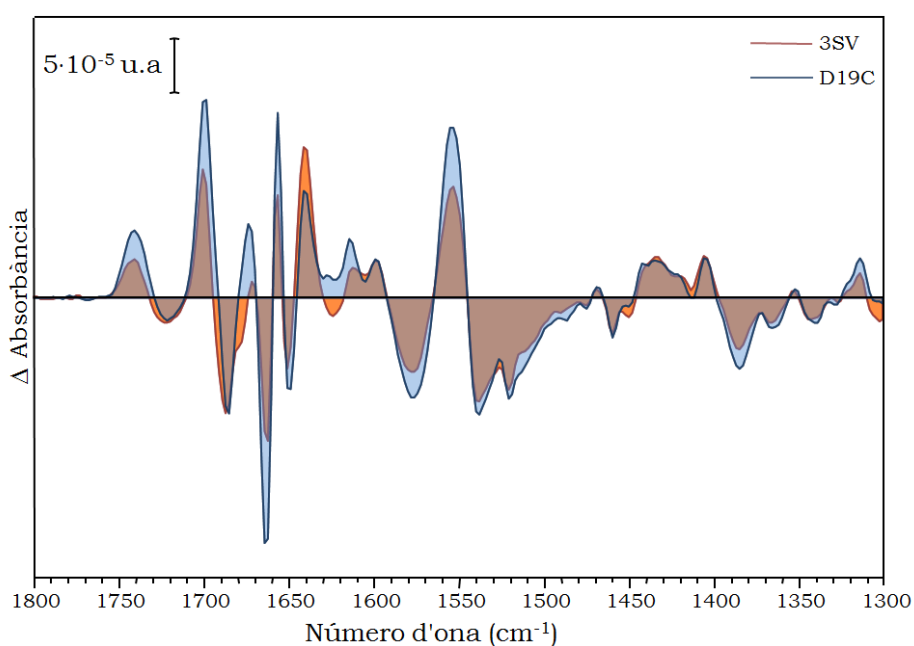


**Figura 4.5** Espectres de diferència dels mutants D55C (gris), D59C (lila), D59E (verd) i N58C (blau) respecte 3SV (taronja) induïts pel sodi. Els espectres de diferència s'han obtingut restant l'espectre d'absorció amb tampó **R50** a l'espectre d'absorció amb tampó **Na 50**, menys per al 3SV que s'obté al restar l'espectre d'absorció amb el tampó **R10** a l'espectre d'absorció amb tampó **Na10**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup> i 25000 escombrats.

Tal com podem observar en la figura 4.5, tot i que s'ha augmentat la concentració de sodi a 50 mM, no s'obté cap espectre de diferència en cap dels quatre mutants. Així doncs podem assegurar que la manca de senyal no és deguda a una disminució moderada de l'afinitat, sinó a una falta d'unió del sodi (o una afinitat extremadament petita). Podem concloure que els Asp 55 i 59 i l'Asn 58 són essencials per a la unió de Na<sup>+</sup>.

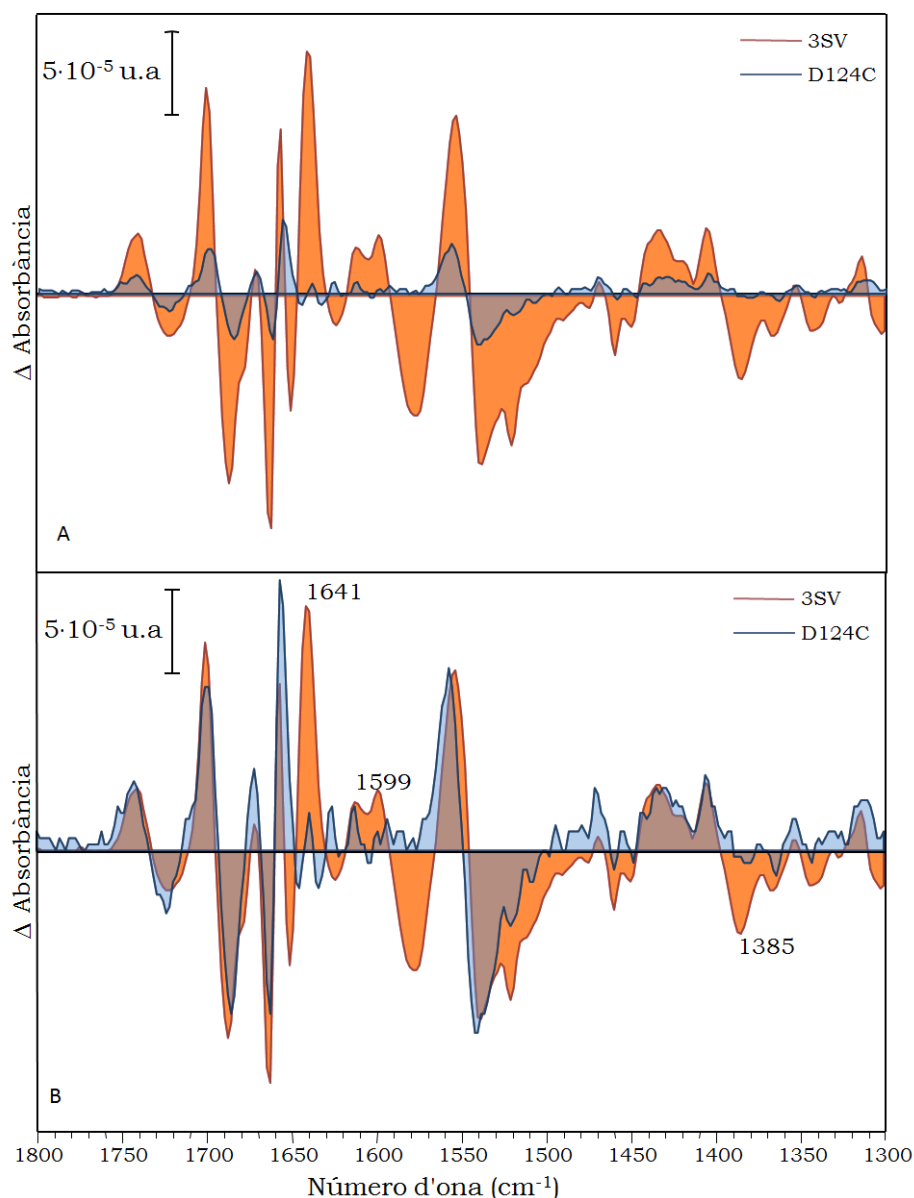
### 4.3.1.3 Espectres de diferència dels mutants D19C i D124C, induïts pel sodi

Per als mutants D19C i D124C s'han obtingut espectres de diferència en presència de sodi 10 mM (veure figura 4.6 i figura 4.7A). En la figura 4.6 es presenta l'espectre de diferència del mutant D19C observant-se un espectre molt semblant al 3SV tant en la forma com en la intensitat. Això demostra que aquest mutant és capaç d'unir sodi, i per tant l'Asp 19 no és ni essencial ni important per la unió del Na<sup>+</sup>.



**Figura 4.6** Espectres de diferència del mutant D19C (blau) respecte 3SV (taronja) induït pel sodi. Els espectres de diferència s'han obtingut al restar l'espectre d'absorció amb tampó **R10** a l'espectre d'absorció amb tampó **Na 10**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 376 (desviació estàndard del soroll 1,3·10<sup>-6</sup>).

En la figura 4.7A veiem l'espectre de diferència del mutant D124C en presència de sodi 10 mM. En aquest cas, encara que té senyal, aquesta és de menor intensitat i presenta certes variacions respecte el 3SV. Per poder comparar millor amb el 3SV s'ha amplificat l'espectre del D124C 3,6 cops. Aquest espectre amplificat es pot veure a la figura 4.7B (espectre en blau).



**Figura 4.7** Espectres de diferència del mutant D124C (blau) i del 3SV (taronja) induïts pel sodi. **A:** Els espectres de diferència s'han obtingut al restar l'espectre d'absorció amb tampó **R10** a l'espectre d'absorció amb tampó **Na 10**. **B:** L'espectre de D124C s'ha ampliat 3,6 vegades per facilitar la seva comparació amb el 3SV. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de la gràfica **A** és 44 (desviació estàndard del soroll 3,6·10<sup>-6</sup>).

Les variacions més destacades són la desaparició del pic a 1651 cm<sup>-1</sup>, que s'ha proposat que és degut a estructura hèlix  $\alpha$ , i també la desaparició del pic a 1641 cm<sup>-1</sup> que s'ha assignat a estructura  $\beta$  o girs (LEÓN *et al.* 2005). S'ha proposat en estudis previs que el lloc d'unió del catió es troba format per quatre àcids aspàrtics (POOLMAN *et al.* 1996), on Asp 124 és un dels residus implicats. La manca d'aquest àcid aspàrtic produeix canvis en la unió del catió, tal com es pot observar en l'espectre de diferència del mutant

D124C que presenta canvis respecte el 3SV i també presenta menor intensitat. A falta d'experiments a una concentració de Na<sup>+</sup> 50 mM, la menor intensitat de l'espectre de D124C podria explicar-se per una reducció de l'afinitat pel Na<sup>+</sup>, causada per la pèrdua d'un lligand important però no essencial per la unió de sodi.

Però no només tenim una caiguda de la intensitat de l'espectre de diferència, sinó que també es poden observar canvis important en les bandes que s'ha proposat que corresponen a les de vibració d'estirament dels carboxilats dels àcid aspàrtic a 1612 i 1599 cm<sup>-1</sup> (LEÓN *et al.* 2005), i la desaparició de certes bandes (ex., 1651 cm<sup>-1</sup> i 1641 cm<sup>-1</sup>). Això suggereix, no només una possible afinitat reduïda, sinó que certs canvis conformationals que es produeixen al 3SV per la unió del Na<sup>+</sup> queden inhibits amb la mutació de l'Asp 124. Podria ser que l'Asp124 sigui un residu essencial, no per unir el sodi, sinó per generar la totalitat dels canvis conformationals induïts per la seva unió. Per tant, la funció de l'Asp124 podria ser com a transductor de la unió de sodi en un canvi conformational més ampli de la proteïna.

#### 4.3.1.4 Comparació quantitativa dels mutants respecte al 3SV

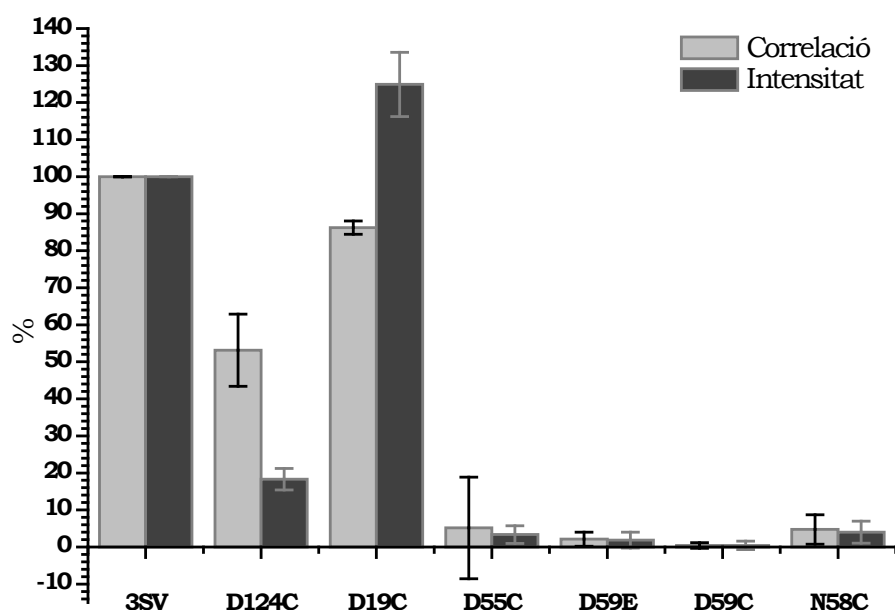
Després de realitzar una comparació qualitativa, s'ha realitzat una anàlisi quantitativa dels espectres per així poder quantificar millor la semblança i intensitat relativa dels espectres de diferència respecte al del 3SV. S'ha calculat la correlació lineal entre els espectres de diferència dels mutants respecte al 3SV (consultar Materials i Mètodes per a detalls). Aquesta anàlisi ens dóna un valor que ens indica la semblança de l'espectre del mutant respecte al 3SV (el factor de correlació R, que mesura com de bé l'espectre d'un mutant pot reproduir l'espectre del 3SV), i una pendent que ens dóna la intensitat de l'espectre de diferència del mutant respecte al 3SV. S'ha de dir que en aquesta comparació s'ha normalitzat l'espectre de diferència de cada mutant per la concentració de proteïna que contribueix als espectres de diferència, utilitzant l'absorbància de l'amida I i l'amida II.

En la figura 4.8 es representen els factors de semblança i d'intensitat en percentatge respecte al 3SV. Es pot veure com els espectres de diferència



induïts pel Na<sup>+</sup> pels mutants D55C, D59E, D59C i N58C tenen una semblança pràcticament nul·la amb el del 3SV (molt baixa correlació) i la seva intensitat relativa al 3SV és també quasi zero. Pel contrari, el mutant D19C presenta una intensitat fins i tot una mica superior al 3SV, amb una correlació prou alta, suggerint que els canvis estructurals induïts pel Na<sup>+</sup> són molt similars per al D19C i el 3SV, com es pot apreciar visualment a la figura 4.6.

En el cas de l'Asp 124 s'observa que la diferència presenta una intensitat significativa però baixa (18%), amb una correlació moderada (~53%). Encara que aquest mutant és capaç d'unir sodi (obtenim espectre de diferència), s'observa que la seva intensitat es troba molt disminuïda. Per tant, el mutant D124C mostra canvis conformacionals induïts pel sodi alterats (baixa correlació), i té afectada l'afinitat pel sodi i/o mostra una atenuació dels canvis conformacions induïts pel sodi (intensitat reduïda).



**Figura 4.8** Quantificació de la correlació i intensitat dels espectres de diferència induïts pel sodi per a cada mutant en relació amb el 3SV.

Segons aquests resultats, podem concloure que el D19C reacciona de manera nativa a la unió de sodi, observant-se només algun petit efecte degut a la mutació generada. Per tant, aquest residu no està implicat ni en

la unió del sodi (interacció directa), ni en la transducció de la seva unió en canvis conformacionals en la proteïna (interacció indirecta). El mutant D124C presenta interacció amb el sodi, encara que en aquest cas s'observa un efecte important de la mutació, principalment en la intensitat de l'espectre de diferència. Per tant, aquest residu no és essencial per la unió del sodi, però es troba implicat en la directa o indirectament.

Els mutants D55C, D59C, D59E i N58C no mostren cap interacció amb el sodi. Per tant, aquests tres residus són essencials per la unió del sodi.

### **4.3.2 Anàlisi dels espectres de diferència induïts per melibiosa en presència del protó com a catió**

Un cop analitzada la unió del catió, el següent pas és veure l'efecte de la melibiosa en els espectres de diferència en presència de protó com a catió. Tal i com està descrit en Materials i Mètodes, per obtenir aquests espectres s'ha adquirit un espectre d'absorció sense melibiosa i un altre en presència de melibiosa. La resta d'aquests dos espectres ens donarà l'espectre de diferència induït per la melibiosa.

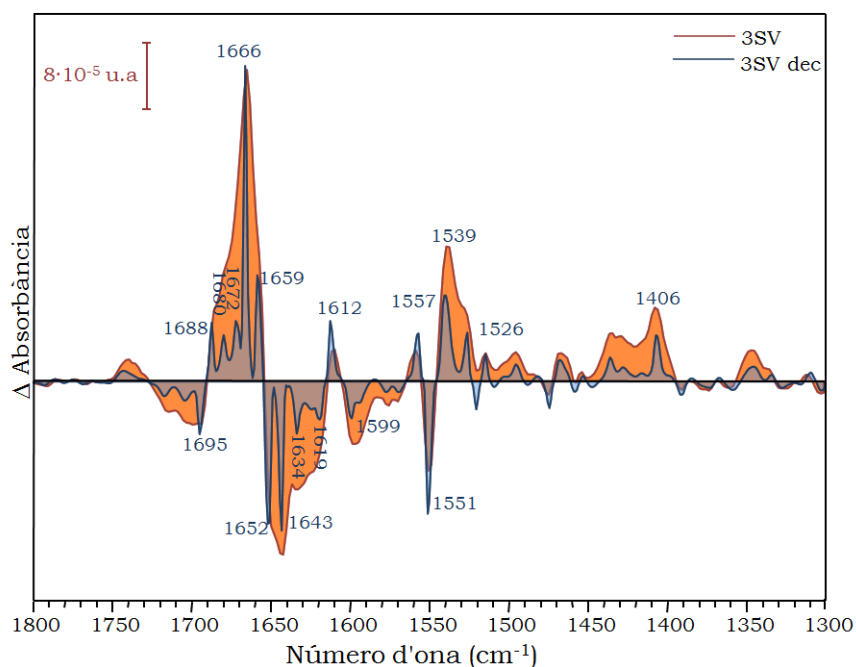
En aquest cas, a part de formar-se el complex ternari MelB-sucres-catió, també es pot produir la translocació. Per tant diferents etapes del cicle de transport poden contribuir a l'espectre de diferència observat, tant la unió de la melibiosa, com la translocació del complex. Probablement l'alliberació dels substrats no està present en les nostres mostres d'una manera apreciable, degut a l'elevada concentració dels substrats i per tant desplaça l'equilibri cap a la situació dels substrats units.

Els espectres de diferència s'obtenen tal com està descrit a Materials i Mètodes. La baixa intensitat d'alguns dels espectres de diferència dels mutants dificulta distingir entre alguns pics de l'espectre i el soroll, i per aquesta raó només es podran analitzar els més intensos.

#### *4.3.2.1 Espectre de diferència del 3SV induït per melibiosa en presència de protó*

Els espectres de diferència de la melibiosa s'obtenen a concentracions de sucre nominalment saturants. En el cas de l'espectre de diferència de melibiosa del 3SV amb protó s'utilitza una concentració de melibiosa 50 mM, mentre que si utilitzem el sodi com a catió la concentració saturant utilitzada de melibiosa és de 10 mM, ja que l'afinitat per la melibiosa augmenta amb la unió de sodi (MUS-VETEAU *et al.* 1995). En els espectres de diferència de tots els mutants (3SV, D19C, D55C, N58C, D59C, D59E i D124C) s'ha utilitzat sempre una concentració de melibiosa 50 mM, independentment de la presència o absència de sodi.

En la figura 4.9 es presenta l'espectre de diferència del 3SV (espectre taronja). En primer lloc es pot observar que aquest espectre és més intens que l'espectre de diferència generat pel sodi (2,3 cops més intens). També es pot observar que els pics són més amples. Això és degut a un major solapament dels pics. Per poder assignar millor aquests pics s'ha utilitzat la desconvolució per màxima entropia, que permet estretar els pics i així poder-los separar (LÓRENZ-FONFRÍA 2005). L'espectre de diferència del 3SV desconvulat (figura 4.9, espectre en blau) presenta nombrosos pics, molts dels quals han estat assignats en estudis anteriors del nostre grup (LEÓN *et al.* 2005; LEÓN *et al.* 2006).



**Figura 4.9** Espectre de diferència del 3SV (taronja) induït per melibiosa 50 mM, en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 210 (desviació estàndard del soroll 2,8·10<sup>-6</sup>). Sobreposat en blau es presenta l'espectre desconvulat amb els pics més importants indicats (dividit amb un factor de 4). El procés de desconvolució està detallat a Materials i Mètodes.

A continuació es farà un breu resum d'aquestes assignacions. En la zona de l'amida I, els pics a 1666, 1659 i 1652 cm<sup>-1</sup> s'han assignat a hèlix  $\alpha$ . Els pics a 1695, 1688, 1680 i 1672 cm<sup>-1</sup> s'han assignat a estructura secundària no accessible a solvent, possiblement estructures  $\beta$  o girs. El pic a 1641

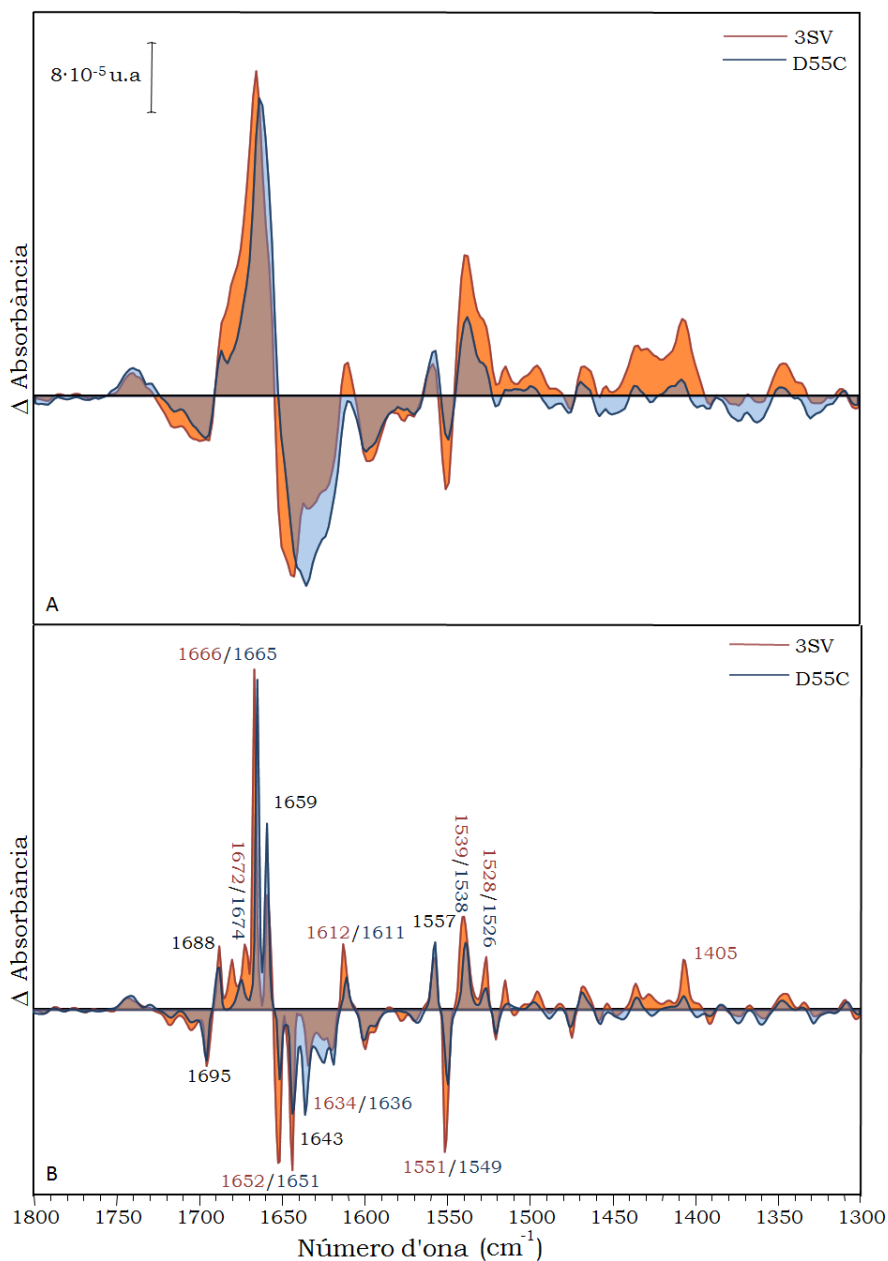
$\text{cm}^{-1}$  s'ha assignat a estructura  $\beta$ , hèlix  $3_{10}$  o llaços no accessibles al solvent (LEÓN 2006). Els pics a 1634, 1619 i  $1612 \text{ cm}^{-1}$  s'han assignat a estructura secundària no accessible al solvent, possiblement estructures  $\beta$ , encara que no es descarta que pertanyin a les cadenes laterals d'aminoàcids aromàtics. El pic a  $1599 \text{ cm}^{-1}$  s'ha assignat a la vibració antisimètrica del grup carboxilat i el pic a  $1406 \text{ cm}^{-1}$  a la vibració simètrica del grup carboxilat desprotonat de l'aminoàcid àcid aspàrtic.

Els pics a 1557, 1551 i  $1539 \text{ cm}^{-1}$ , pertanyent a l'amida II, s'han assignat a hèlix  $\alpha$  els dos primers i estructura  $\beta$  el darrer. Per últim el pic a  $1526 \text{ cm}^{-1}$  s'ha assignat a la cadena lateral de la lisina (LEÓN *et al.* 2005; LEÓN *et al.* 2006).

#### 4.3.2.2 Espectre de diferència del D55C induït per melibiosa en presència de protó

En la figura 4.10A podem veure l'espectre de diferència del mutant D55C induït per la melibiosa en presència de  $\text{H}^+$  (espectre blau). Sobreposat hi ha l'espectre de diferència del 3SV (espectre taronja). Aquest espectre té molts pics sobreposats, per tant serà necessari fer una desconvolució per poder assignar els pics. En la figura 4.10B veiem l'espectre desconvulat del D55C (espectre blau) i del 3SV (espectre taronja). En aquesta figura s'indica la posició dels pics més importants, en taronja si són més intensos en el 3SV, en blau si ho són en el D55C i en negre si no hi ha variació.

Els estudis previs ens demostraven que aquest mutant presenta transport acoblat a protó (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993). D'acord amb aquests estudis, l'espectre de diferència degut a la presència de melibiosa i protó ens mostra que hi ha interacció entre la MelB i la melibiosa en presència de protó com a catió (veure figura 4.10).



**Figura 4.10 A:** Espectre de diferència del D55C (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induïts per melibiosa 50 mM en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4  $\text{cm}^{-1}$ , 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 288 (desviació estàndard del soroll  $2,2 \cdot 10^{-6}$ ). **B:** Espectre de diferència desconvulat del D55C (blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

Observant la figura 4.10A podem veure que l'espectre de diferència, encara que presenta variacions respecte el 3SV, té una intensitat semblant i moltes bandes comuns. En la figura 4.10B podem observar les variacions entre aquests dos espectres de diferència. En l'amida I veiem que els pics a

1695 i 1688  $\text{cm}^{-1}$  no presenten variació ni d'intensitat ni de posició, mentre els pics a 1672 i 1680  $\text{cm}^{-1}$ , assignats a estructures  $\beta$  o girs es converteixen en un pic a 1674  $\text{cm}^{-1}$ .

Els pics assignats a hèlix  $\alpha$  en l'amida I pateixen petites variacions: el pic a 1666  $\text{cm}^{-1}$  pateix un lleuger desplaçament cap a números d'ona menors (1665  $\text{cm}^{-1}$ ), mentre el pic a 1659  $\text{cm}^{-1}$  no sofreix variació i el pic a 1652  $\text{cm}^{-1}$  perd intensitat i es desplaça també cap a números d'ona menors. El pic a 1643  $\text{cm}^{-1}$ , assignat a estructures  $\beta$  o hèlix  $3_{10}$ , no pateix variacions importants, mentre el pic a 1634  $\text{cm}^{-1}$ , assignat a estructures  $\beta$  o cadenes laterals d'aminoàcids es desplaça a 1636  $\text{cm}^{-1}$  i augmenta d'intensitat.

En l'amida II podem observar que els pics que s'han assignat a hèlix  $\alpha$  disminueixen d'intensitat en els cas de 1549 i 1538  $\text{cm}^{-1}$ , a més d'un petit desplaçament en el cas del pic a 1551  $\text{cm}^{-1}$  que passa a 1549  $\text{cm}^{-1}$ . Per un altre costat, el pic a 1539  $\text{cm}^{-1}$  assignat a estructura  $\beta$  es desplaça a 1538  $\text{cm}^{-1}$ . A l'observar els petits desplaçaments d'alguns pics, tant en l'amida I com en l'amida II, sembla que la mutació de l'Asp 55 produeix distorsions en algunes estructures secundàries que fan disminuir el número d'ona. Això podria ser degut a un canvi d'inclinació de les hèlix  $\alpha$  o canvi conformacional que reduís l'energia de vibració de l'enllaç.

S'observa que el pic a 1599  $\text{cm}^{-1}$ , que s'ha assignat a la vibració antisimètrica del grup carboxilat, no pateix quasi variacions. Però el pic de 1406  $\text{cm}^{-1}$ , que s'ha assignat a la vibració simètrica del grup carboxilat desprotonat de l'aminoàcid àcid aspàrtic, perd intensitat.

#### *4.3.2.3 Espectre de diferència del D59C induït per melibiosa en presència de protó*

El següent mutant estudiat és el D59C. Tal com podem observar en la figura 4.11A, aquest mutant presenta un espectre de diferència de menor intensitat que el 3SV i amb més variacions que l'anterior mutant. Sembla per tant que l'Asp 59 a diferència de l'Asp 55 es troba implicat al lloc d'unió de la melibiosa. Tot i així, al donar pics a l'espectre de diferència hem de concloure que és capaç d'unir melibiosa, encara que associat a canvis

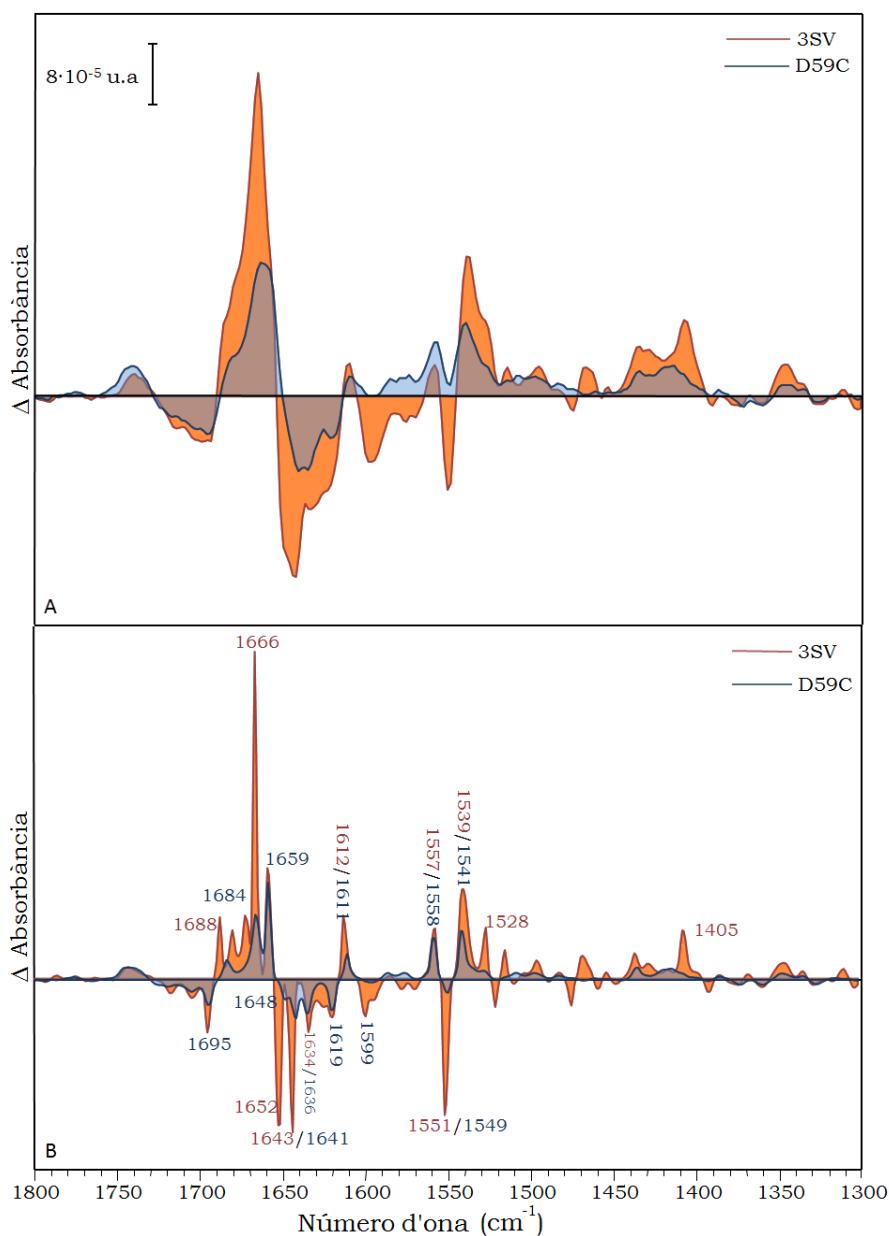
conformacionals menors. Això concordaria amb estudis previs, segons els quals aquest mutant és capaç de transportar el sucre encara que sense acoblament del sucre i el catió, és a dir, presenta un transport passiu del sucre (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993). Aquesta falta d'acoblament podria reflectir-se en la manca de canvis estructurals que es dedueix dels espectres de diferència de melibiosa- $H^+$  del mutant D59C, de menor intensitat que els corresponents al mutant D55C o del 3SV, que sí que presenten acoblament a protó (veure figura 4.16). Sembla per tant que hi ha una relació entre la intensitat de l'espectre de diferència i l'acoblament en el transport.

Per poder fer un estudi més detallat de les variacions es va realitzar la desconvolució de l'espectre de diferència del D59C (figura 4.11, espectre blau) i es va comparar amb el 3SV (Figura 4.11B, espectre taronja). En l'amida I s'observa que el pic a  $1688\text{ cm}^{-1}$  pateix un desplaçament cap a números d'ona menors ( $1684\text{ cm}^{-1}$ ), mentre els pics a  $1680$  i  $1672\text{ cm}^{-1}$  no s'observen, fet que pot ser degut a la superposició del pic a  $1684\text{ cm}^{-1}$ . Sembla que aquesta mutació produeix una major distorsió en el pic a  $1688\text{ cm}^{-1}$ , mentre la mutació D55C produïa distorsions en els pics a  $1680$  i  $1672\text{ cm}^{-1}$ .

Els següents pics assignats a hèlix  $\alpha$  també presenten alguns canvis: el pic a  $1666\text{ cm}^{-1}$  perd intensitat, mentre el pic  $1659\text{ cm}^{-1}$  es manté. El pic  $1652\text{ cm}^{-1}$  sembla desplaçar-se a  $1649\text{ cm}^{-1}$  i quasi desapareix. Els pics a  $1634$  i  $1619\text{ cm}^{-1}$  no es troben gaire afectats, només el pic  $1634\text{ cm}^{-1}$  es desplaça a  $1636\text{ cm}^{-1}$ , desplaçament que també observàvem amb el mutant D55C.

En l'amida II també hi trobem variacions. El pic a  $1557\text{ cm}^{-1}$ , assignat a hèlix  $\alpha$ , no presenta variacions. Mentre el pic  $1539\text{ cm}^{-1}$ , assignat a estructures  $\beta$ , perd intensitat i es desplaça a números d'ona majors. El pic a  $1551\text{ cm}^{-1}$  assignat a hèlix  $\alpha$  quasi desapareix i es desplaça a números d'ona menors.





**Figura 4.11 A:** Espectre de diferència del D59C (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induïts per melibiosa 50 mM en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** a l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 135 (desviació estàndard del soroll  $2,0 \cdot 10^{-6}$ ). **B:** Espectre de diferència desconvulat del D59C (blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

Per últim, els pics a  $1599$  i  $1405 \text{ cm}^{-1}$ , que s'han assignat a les vibracions antisimètriques i simètriques respectivament de grups carboxilats d'àcids aspàrtics, han desaparegut. Això afavoriria l'assignació temptativa d'aquestes dues bandes al grup carboxilat de l'Asp59.

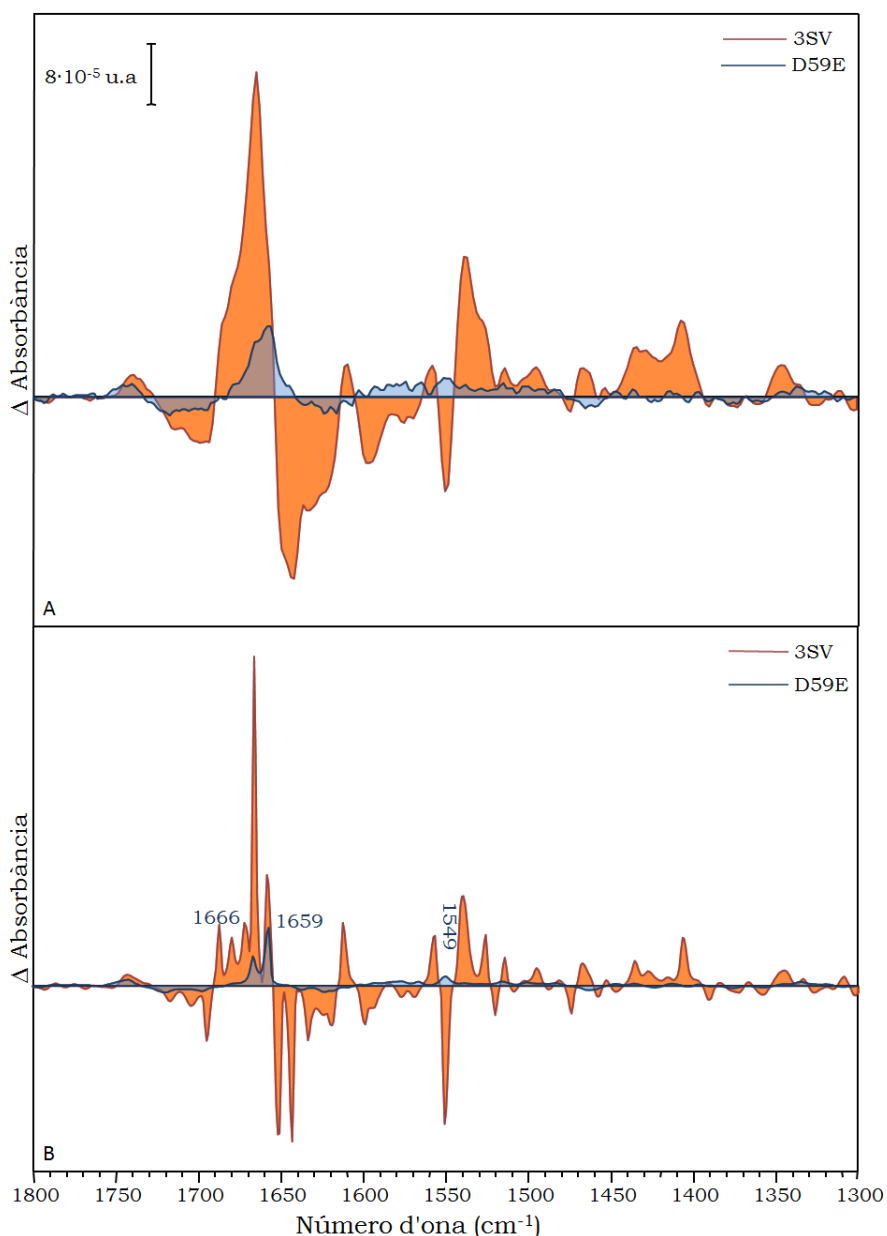
#### 4.3.2.4 Espectre de diferència del D59E induït per melibiosa en presència de protó

En la figura 4.12A podem veure l'espectre de diferència del mutant D59E (espectre blau) respecte el 3SV (espectre taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó com a catió. Aquesta diferència és molt petita i per tant es pot concloure que aquesta mutació presenta una unió molt reduïda o inexistent de melibiosa.

Segons estudis previs aquest mutant conserva transport acoblat, tant amb sodi com amb protó (ZANI *et al.* 1994). En l'apartat anterior ja s'ha vist que el mutant D59E no uneix sodi, i en el cas de l'espectre de melibiosa només es pot observar una diferència molt petita que només ens permet veure les bandes més intenses. Tots aquests resultats es poden explicar degut a la forta disminució que sofreix aquest mutant en la seva afinitat tant pel sodi com pels sucres (ZANI *et al.* 1994).

Al realitzar la desconvolució de l'espectre de diferència del D59E (figura 4.12B, espectre en blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (figura 4.12B, espectre en taronja) es pot observar que el pic  $1659\text{ cm}^{-1}$  quasi no perd intensitat mentre el pic  $1666\text{ cm}^{-1}$  perd intensitat i quasi desapareix.

Podem concloure que aquest mutant no és capaç d'unir melibiosa en les condicions de treball utilitzades. És interessant veure que al substituir aquest residu àcid aspàrtic per una cisteïna, permet que hi hagi unió de melibiosa en aquestes condicions (veure figura 4.11), mentre la substitució de l'àcid aspàrtic per un àcid glutàmic no permet la unió de la melibiosa (veure figura 4.12). Això demostra que el residu Asp 59 es troba molt proper o formant part del lloc d'unió de la melibiosa. Tot i que la substitució del Asp 59 per Glu manté el grup carboxilat en la cadena lateral, aquesta substitució provoca la manca d'unió de la melibiosa. Pot ser que al tenir la cadena lateral més llarga, l'àcid glutàmic provoqui impediments estèrics o mala orientació del grup carboxilat que impedeixen la unió de la melibiosa.

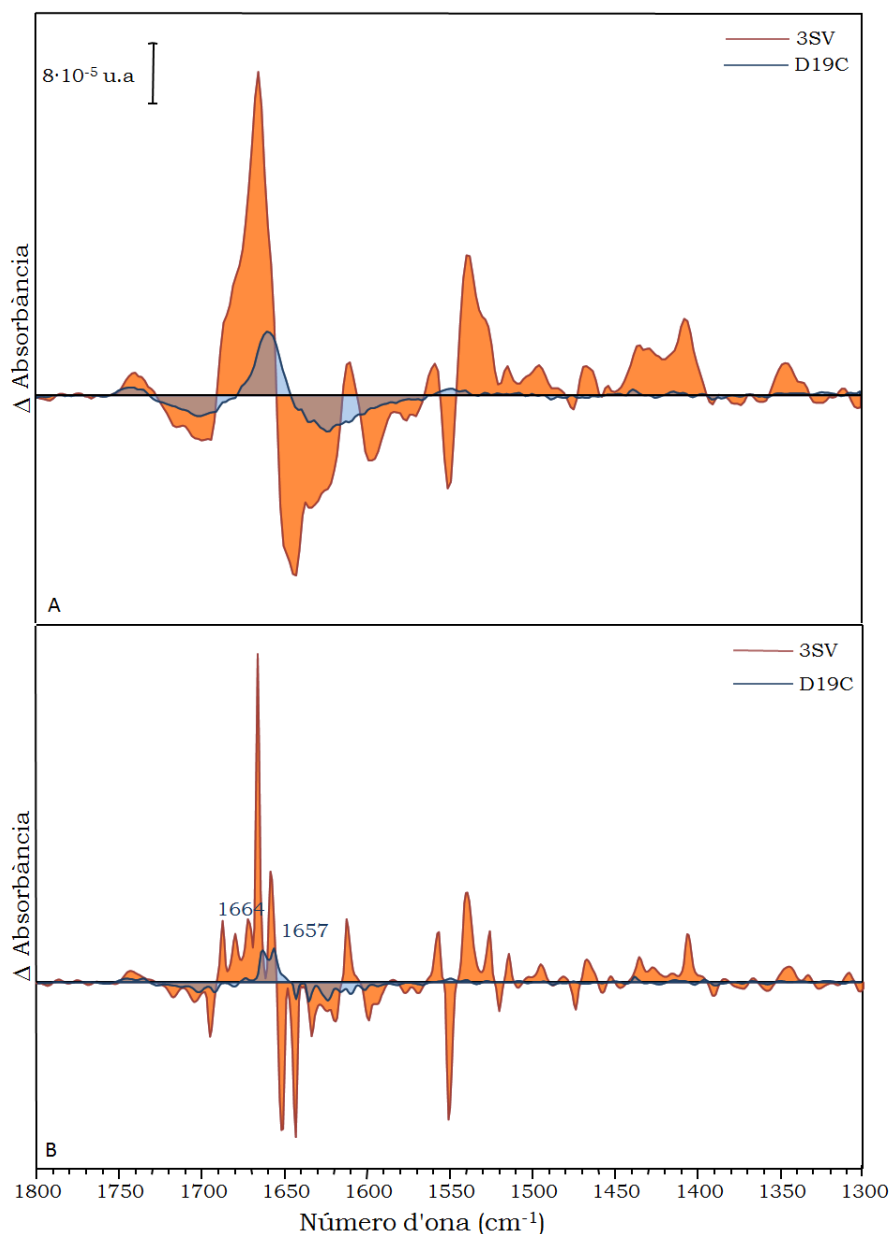


**Figura 4.12** **A:** Espectre de diferència del D59E (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induïts per melibiosa 50 mM en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 43 (desviació estàndard del soroll 2,4·10<sup>-6</sup>). **B:** Espectre de diferència desconvulat del D59E (blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètode.

#### 4.3.2.5 Espectres de diferència del D19C i del D124C induïts per melibiosa en presència de protó

En la figura 4.13A podem veure l'espectre de diferència del D19C degut a la presència de melibiosa 50 mM, amb el protó com a catió. A l'igual que

amb el mutant D59E, aquesta diferència és molt petita i només poden observar-se bandes a la regió de l'amida I.



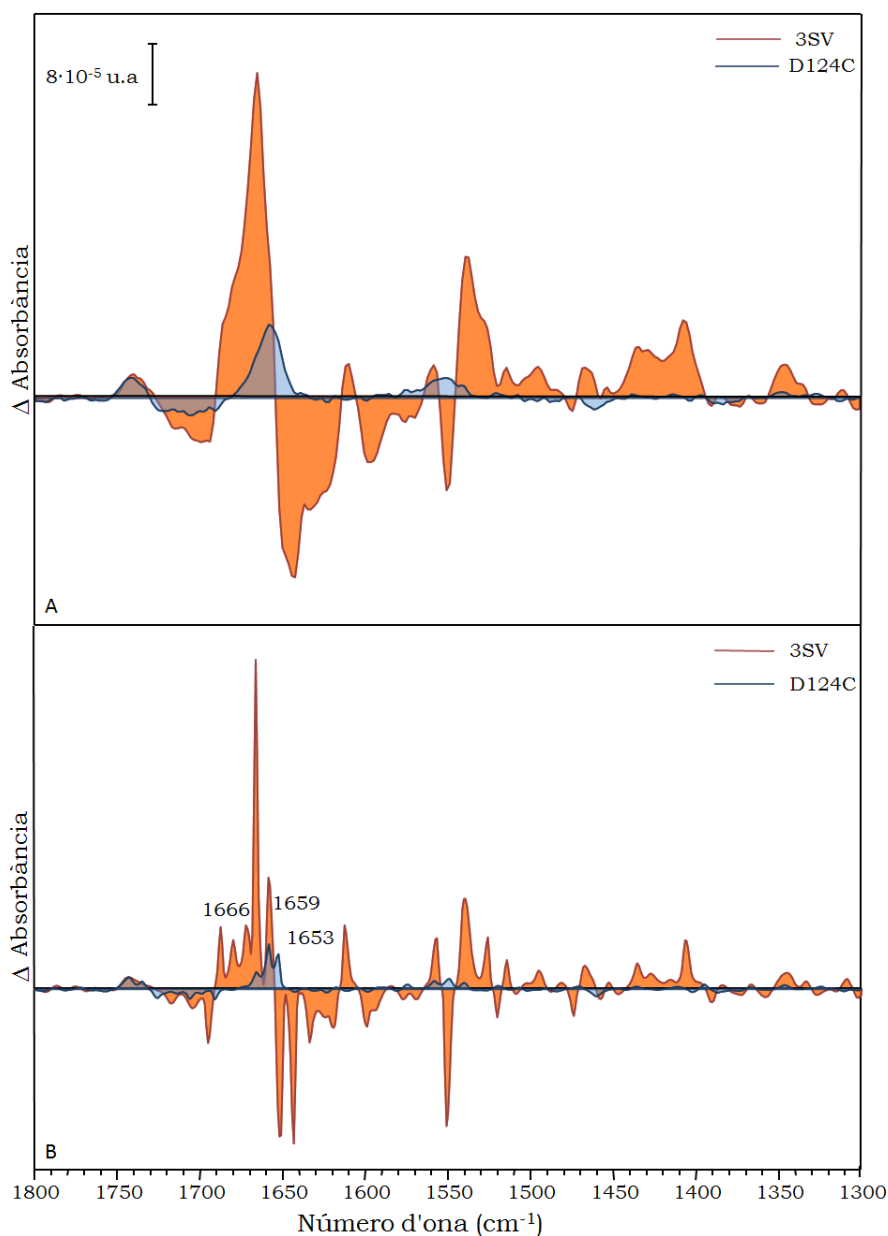
**Figura 4.13 A:** Espectre de diferència del D19C (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. Espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 92 (desviació estàndard del soroll 1,9·10<sup>-6</sup>). **B:** Espectre de diferència desconvulat del D19C (blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

En aquest cas s'observen dos pics a 1664 i 1657  $\text{cm}^{-1}$ , molt possiblement corresponents als pics del 3SV a 1666 i 1659  $\text{cm}^{-1}$  que han sofert un desplaçament a números d'ona menor, degut a un canvi d'inclinació o canvi conformacionals. El desplaçament observat també podria ser un artefacte, causat per dificultats del procés de desconvolució en separar completament les dues bandes per la baixa relació senyal/soroll de l'espectre del D19C.

En la figura 4.14A es presenta l'espectre de diferència del mutant D124C induït per melibiosa 50 mM en presència de protó (figura 4.14A, espectre en blau) comparat amb l'espectre de diferència del 3SV (figura 4.14A, espectre en taronja). Aquest espectre de diferència també és molt poc intens i només podem observar les bandes més intenses de l'espectre.

Al fer la desconvolució de l'espectre (veure figura 4.14B, espectre blau) es poden observar tres petits pics a 1666, 1659 i 1653  $\text{cm}^{-1}$  que s'han assignat a hèlix  $\alpha$ . Els dos primers, també es troben en l'espectre desconvulat del 3SV (figura 4.14B espectre taronja), encara que el pic a 1666  $\text{cm}^{-1}$  és pràcticament residual. El pic a 1653  $\text{cm}^{-1}$  mostra un signe oposat en el mutant D124C respecte el 3SV.

Aquests dos mutants tampoc són capaços d'unir la melibiosa en presència de protó de manera eficient. Tenint en compte que tots dos són capaços d'unir el sodi, no sembla que el problema sigui degut a la manca d'unió del mutant amb el catió. Per tant els residus Asp 19 i 124 deuen estar implicats en la unió de melibiosa. Aquesta implicació podria ser directa (interaccionant directament com a lligands de la melibiosa), o indirecta (induint una conformació que permeti la unió del sucre).

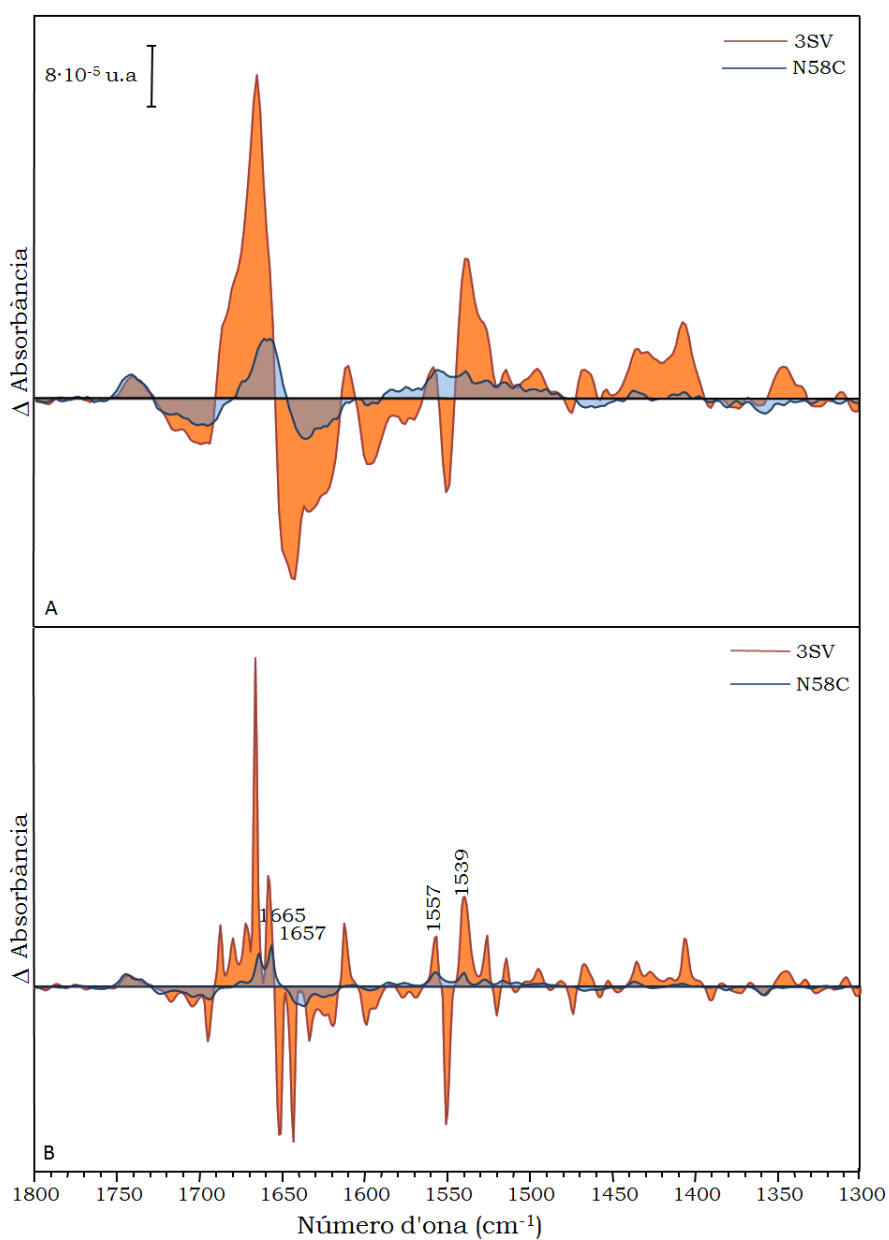


**Figura 4.14** **A:** Espectre de diferència del D124C (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 61 (desviació estàndard del soroll 2,0·10<sup>-6</sup>). **B:** Espectre de diferència desconvulat del D124C (blau) comparat amb l'espectre desconvulat del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

#### 4.3.2.6 Espectre de diferència del N58C induït per melibiosa en presència de protó

Finalment estudiarem l'espectre de diferència del mutant N58C induït per melibiosa en presència de protó (figura 4.15A, espectre blau). Aquest

espectre també mostra una intensitat molt reduïda comparat amb el 3SV (figura 4.15A, espectre taronja).



**Figura 4.15** **A:** Espectre de diferència del N58C (blau) comparat amb l'espectre del 3SV (taronja) induïts per melibiosa 50 mM en presència de protó. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb Tampó **R** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sucre 50**. Resolució 4 cm<sup>-1</sup>, 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 48 (desviació estàndard del soroll 2,7·10<sup>-6</sup>). **B:** Espectre de diferència desconvolut del N58C (blau) comparat amb l'espectre desconvolut del 3SV (taronja). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

En estudis previs s'ha observat que al substituir aquest aminoàcid per un altre polar com la serina o glutamina hi ha una disminució de l'afinitat pel sodi i que el transport acoblat a protó presenta un valor molt reduït respecte al WT. En canvi, una substitució neutre com l'alanina o la leucina inhibeix el transport acoblat a sodi, però el transport acoblat a protó es veu menys afectat (FRANCO i WILSON 1996). Per tant la disminució de l'espectre de diferència pel N58C concorda amb aquests resultats.

Al desconvular l'espectre de diferència del N58C (figura 4.15B espectre blau) es pot observar que els pics de les hèlix  $\alpha$  es troben desplaçats a números d'ona menor 1665 i 1657  $\text{cm}^{-1}$ . Aquest desplaçament que ja hem observat en altres mutants pot ser degut a algun petit canvi estructural generat per la mutació. El desplaçament observat també podria ser un artefacte, causat per dificultats del procés de desconvolució en separar completament les dues bandes per la baixa relació senyal/soroll de l'espectre del N58C.

#### *4.3.2.7 Comparació quantitativa dels mutants amb el 3SV*

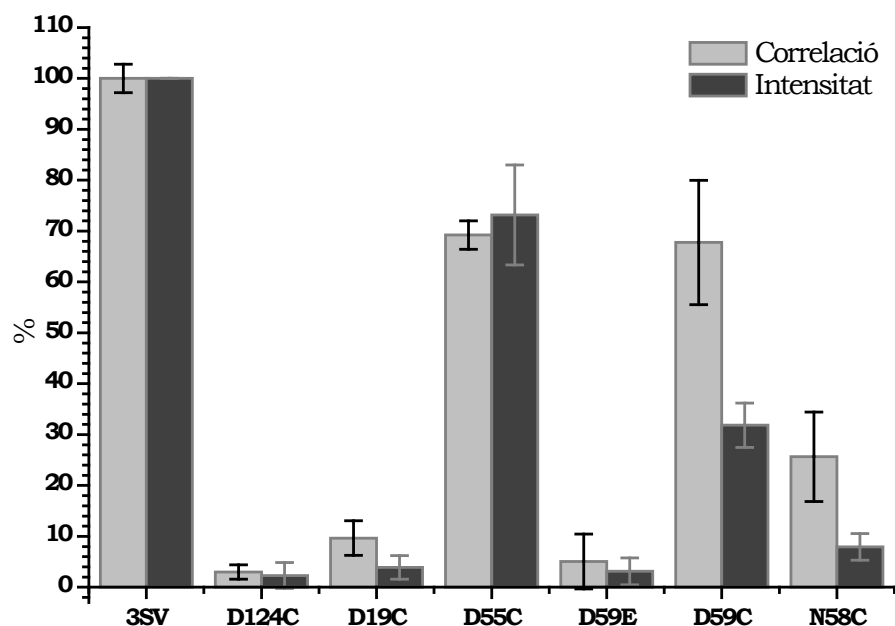
Després de realitzar una comparació qualitativa, s'ha realitzat una anàlisi quantitativa dels espectres (veure Materials i Mètodes). S'han obtingut les correlacions dels espectres de diferència respecte al 3SV, el qual dóna un valor que indica la semblança de l'espectre del mutant al 3SV. També s'ha realitzat un estudi de la intensitat de l'espectre de diferència, després de normalitzar l'espectre de diferència de cada mutant per la concentració de proteïna de cadascun.

Els resultats d'aquesta comparació es mostren a la figura 4.16. Es pot observar que l'espectre de diferència induït per melibiosa del mutant D55C és el que mostra una major intensitat (73% respecte al 3SV), seguit del D59C (32%) i del N58C (8%). Per a la resta de mutants la intensitat relativa respecte al 3SV és menor d'un 4%.

En referència a la semblança dels espectres de diferència dels mutants respecte al 3SV, cal dir que els mutants D55C i D59C són els que donen una major correlació, propera al 70%. El N58C té una correlació del 25%



mentre que per la resta de mutants és inferior al 10%. En l'espectre de diferència del N58C induït per la melibiosa-H<sup>+</sup> (figura 4.15) és difícil apreciar aquesta semblança degut a la diferent intensitat respecte al 3SV. Tot i així no es pot descartar que hi hagi una interacció de melibiosa defectuosa que provoqui un espectre tan poc intens que faci difícil de poder observar-lo.



**Figura 4.16** Quantificació de la correlació i intensitat dels espectres de diferència induïts per la melibiosa amb el protó com a catió per a cada mutant respecte el 3SV.

Segons aquests resultats, podem concloure que els mutants D55C i D59C interaccionen amb la melibiosa en presència de protó. Sembla doncs evident que l'Asp 55 no és un residu important per aquesta interacció. L'Asp 59, encara que presenta algun defecte no sembla necessari perquè es produeixi interacció de la melibiosa. Al mutar l'Asp 59 a Glu no s'observa cap recuperació de la unió de sodi (veure apartat anterior). Al contrari, la interacció de la melibiosa amb el D59E es troba altament disminuïda en comparació amb el mutant D59C. Tot i que l'àcid aspàrtic i l'àcid glutàmic comparteixen un grup carboxilat en la cadena lateral, el Glu té una cadena més llarga. Aquest augment de la longitud de la cadena pot provocar tant efectes estèrics com un possible canvi d'orientació del grup carboxilat. Sembla que els canvis generats per la substitució de l'àcid aspàrtic a un

més voluminosos àcid glutàmic són perjudicials per la interacció de la melibiosa amb la MelB.

Els mutants D19C i D124C presenten una interacció molt pobre amb melibiosa en presència de protó. Els dos mutants presentaven unió amb sodi, però no són capaços d'unir melibiosa. La manca d'interacció amb melibiosa pot ser degut a que els residus Asp 19 i 124 participen directa o indirectament en la unió del sucre.

Per últim el mutant N58C, presenta una interacció molt petita amb melibiosa. El mutant N58C no presenta unió de sodi. L'Asn 58 podria formar part de la interacció entre el lloc del catió i el sucre, de manera que la mutació d'aquest residu afecta tant a la unió del sodi, com a la unió de la melibiosa.

### **4.3.3 Anàlisi dels espectres de diferència induïts per melibiosa en presència de sodi**

Un cop analitzats els espectres de diferència de melibiosa en presència de protó ara s'analitzaran en presència de sodi, per tal d'observar com l'increment d'afinitat pel sucre en presència de sodi que s'observa al WT i al 3SV (acoblament sodi-melibiosa) es veu afectat per les diferents mutacions estudiades.

Igual que en l'apartat anterior, cal recordar que en aquestes condicions a part de formar-se el complex ternari MelB-sucre-catió també es pot produir la translocació (per al mutants que conserven aquesta capacitat). Per tant en aquest cas en l'espectre de diferència poden contribuir diferents etapes del cicle, tant la unió de la melibiosa, com la translocació del complex.

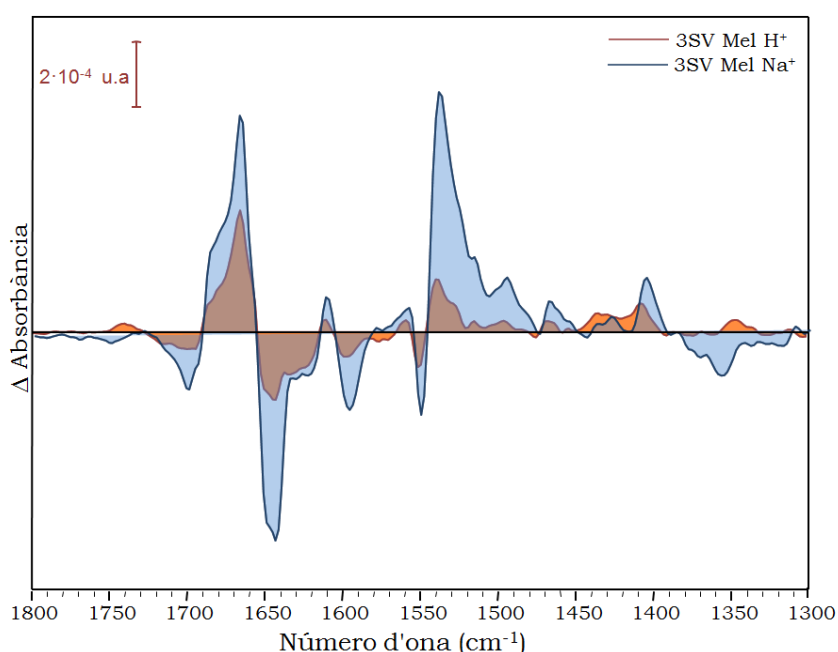
Els espectres de diferència dels mutants s'han realitzat amb melibiosa 50 mM i sodi 10 mM, tal com està descrit a Materials i Mètodes. S'ha augmentat la concentració de melibiosa degut a què la majoria dels mutants presenten poc o cap efecte per la presència del sodi, a excepció del mutant D19C. Per aquest mutant encara que l'espectre de diferència de sodi és molt semblant al 3SV, l'espectre de diferència de melibiosa amb protó és molt petit (apartat 4.3.2.5), i la bibliografia indica que aquest mutant no és capaç de transportar amb cap catió (DING i WILSON 2001a). Per tant, sense l'efecte del sodi que augmenta l'afinitat per la melibiosa, les concentracions saturants seran les mateixes que amb protó.

#### *4.3.3.1 Espectre de diferència del 3SV induït per melibiosa amb el sodi com a catió*

Primer farem un breu resum de l'espectre de diferència de melibiosa en presència de sodi del 3SV (figura 4.17). Aquest espectre és 2,4 cops més intens que l'espectre de diferència de melibiosa amb protó i 5,6 cops que l'espectre de sodi.

En la figura 4.17 es pot observar que l'espectre de diferència induït per la melibiosa en presència de sodi augmenta considerablement d'intensitat

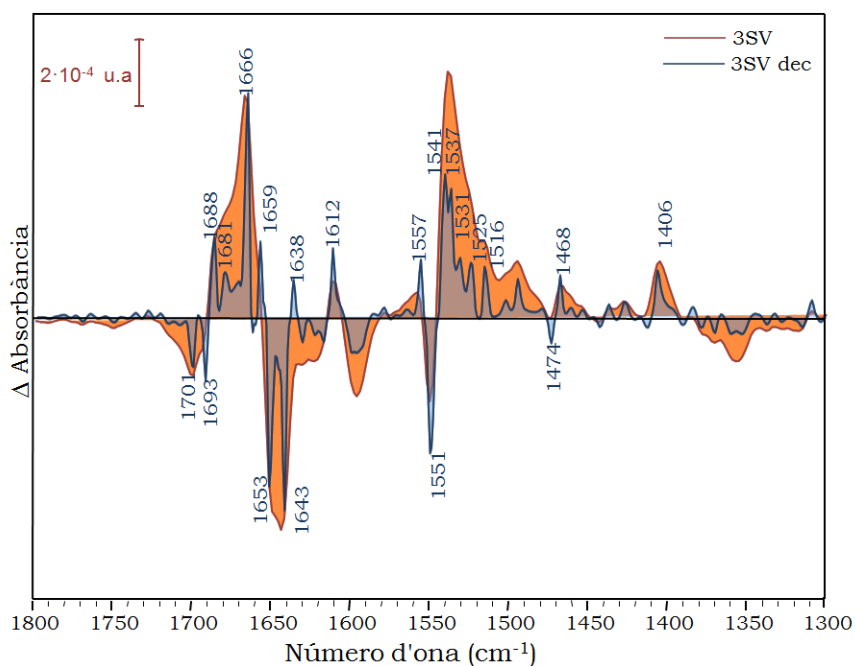
comparat amb l'espectre de diferència en presència de protó. Aquest augment d'intensitat no pot ser degut a un augment de l'afinitat que incrementi la fracció de proteïna amb melibiosa unida, ja que en ambdós casos estem treballant en concentracions saturants. Una possible explicació de la diferència d'intensitats és que la unió del catió afavoreix la unió del sucre, augmentant l'afinitat de la MelB pel sucre, a la vegada que el sucre afavoreix la unió del catió. Degut a què l'efecte de la unió del sodi és molt més eficient que el del protó, els canvis conformacionals que afavoreixen la unió del sucre seran més grans. Per aquesta raó es produeix un augment considerable del senyal de la diferència.



**Figura 4.17** Comparació dels espectres de diferència del 3SV induïts per la melibiosa en presència de sodi i en presència de protó. Espectre blau, espectre de diferència induït per melibiosa 10 mM en presència de sodi 10 mM; Espectre taronja, espectre de diferència induït per melibiosa 50 mM, sense sodi. Resolució  $4\text{ cm}^{-1}$ , 25000 escombrats i la relació senyal/soroll de 289 (desviació estàndard del soroll  $5,6 \cdot 10^{-6}$ ).

S'ha realitzat la desconvolució de l'espectre (figura 4.18, espectre en blau), per poder veure els pics que es troben solapats. S'observa que aquest espectre desconvulat presenta moltes similituds amb l'espectre desconvulat de melibiosa i protó (veure figura 4.9). Per tant només es comentaran les variacions respecte l'espectre de diferència induït per la melibiosa en

presència de protó. Degut a l'augment d'intensitat de l'espectre tots els pics, s'observen més intensos, però en conjunt no hi ha variacions en l'amida I, només en els pics a  $1634$  i a  $1619$   $\text{cm}^{-1}$  que són menys intensos, i un pic positiu que apareix a  $1638$   $\text{cm}^{-1}$ . En l'amida II la banda de  $1539$   $\text{cm}^{-1}$  que s'observa en protó es resol aquí en dos pics a  $1541$  i  $1537$   $\text{cm}^{-1}$ . També es pot observar un pic a  $1531$   $\text{cm}^{-1}$  que en l'espectre de protó no es podia veure.



**Figura 4.18** Espectre de diferència del 3SV (taronja) induït per melibiosa en presència de sodi com a catió. L'espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb tampó **Sodi 10** al l'espectre d'absorció amb tampó **Sodi i Sucre 10**. Resolució  $4$   $\text{cm}^{-1}$  i 25000 escombrats. Sobreposat en blau tenim l'espectre desconvulat amb els pics més importants (dividit amb un factor de 4). El procés de desconvulat està detallat a Materials i Mètodes.

En conjunt no hi ha variacions important en el pics, només un augment important de la intensitat de l'espectre que ens permet veure pics que en l'espectre de protó quedaven amagats.

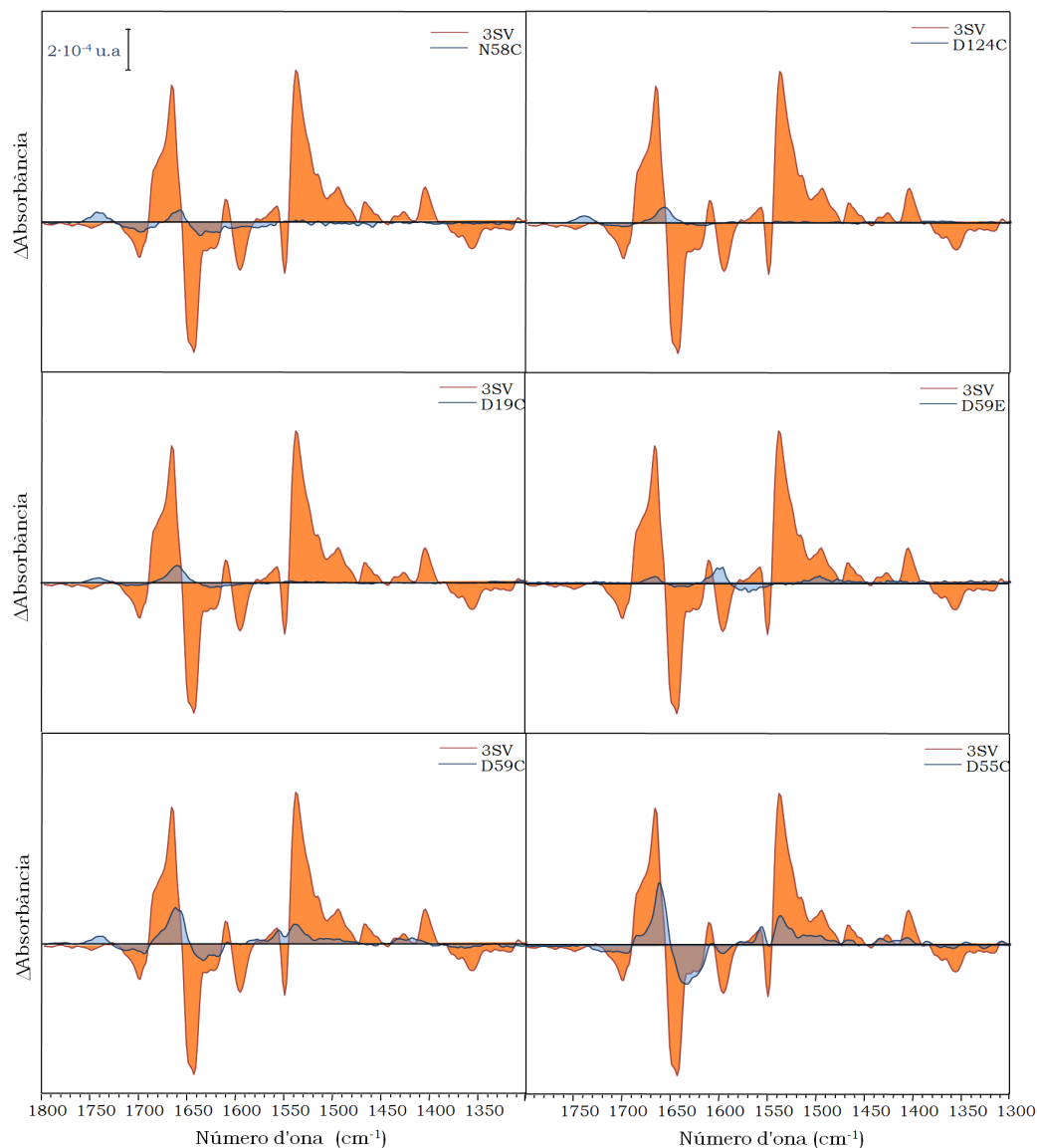
### 4.3.3.2 Espectres de diferència induïts per melibiosa amb el sodi com a catió en els mutants

Els espectres de diferència dels mutants presenten una intensitat molt baixa comparada amb l'espectre de melibiosa-Na<sup>+</sup> del 3SV (veure figura 4.19), i això fa difícil comparar els espectres. Els espectres de diferència de melibiosa-H<sup>+</sup> i de melibiosa-Na<sup>+</sup> de cada mutant tenen una intensitat similar, i la comparació ens permetrà obtenir informació de l'efecte del sodi en presència de melibiosa. Per aquesta raó, a continuació s'ha realitzat una comparació de cada mutant amb el seu espectre de diferència de melibiosa i protó.

L'espectre de diferència de cada mutant s'ha obtingut al restar l'espectre d'absorció del mutant amb també **Sodi 10** a l'espectre d'absorció del mutant amb també **Sodi i Sucre 50**. En la taula 4.2 es presenta la relació senyal soroll (SNR) de cada espectre de diferència dels mutants. En aquesta taula es pot observar el poc senyal dels espectres de diferència dels mutants D19C, N58C, D59E i D124C comparat amb la senyal del 3SV.

Mutant	SNR	Soroll (10 <sup>-6</sup> ) u.a.
3SV	289	5,6
D19C	98	1,2
D55C	317	1,7
D59C	101	2,6
D59E	58	2,3
D124C	45	3,2
N58C	76	1,6

**Taula 4.2** Relació senyal soroll dels espectres de diferència dels mutants en presència de melibiosa amb el sodi com a catió. SNR (relació senyal soroll).

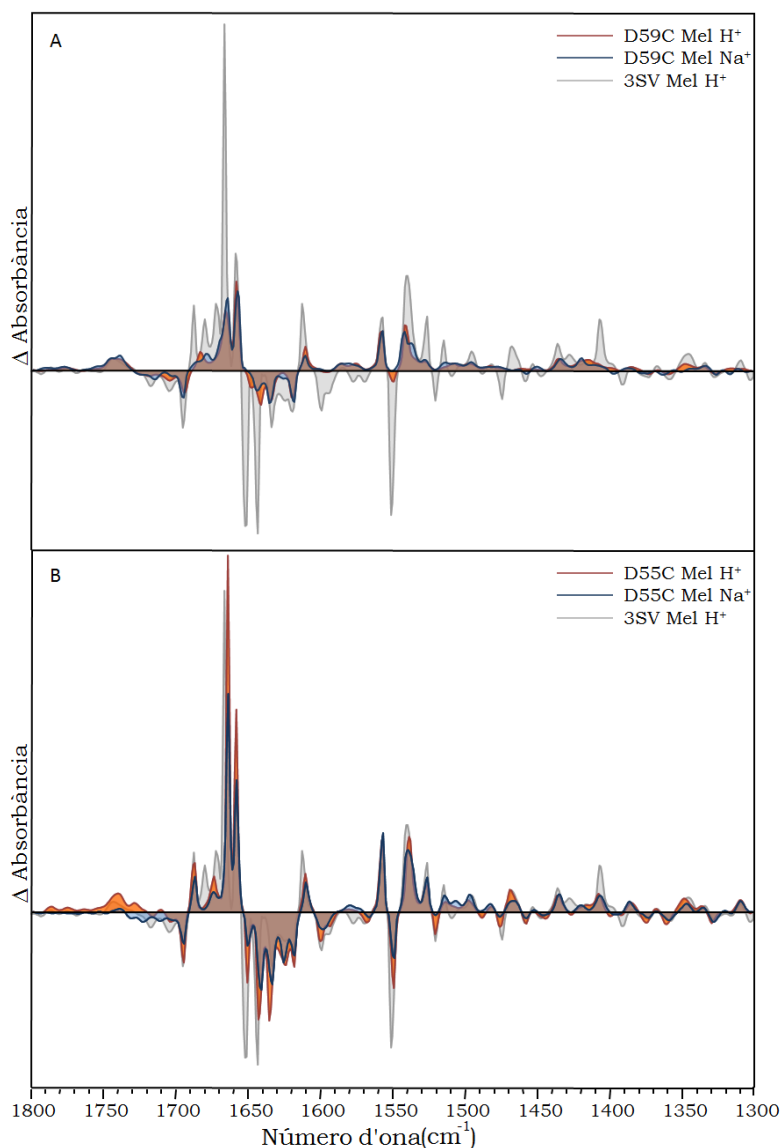


**Figura 4.19** Espectres de diferència dels mutants (en blau) induïts per melibiosa 50 mM utilitzant el sodi 10 mM com a catió, comparats amb l'espectre de diferència del 3SV (taronja) degut a la melibiosa 10 mM i sodi 10 mM. Cada espectre de diferència s'ha obtingut restant l'espectre d'absorció amb tampó **sodi 10** a l'espectre d'absorció amb tampó **sodi i sucre 50** (o tampó **sodi i sucre 10** en el 3SV). Resolució 4 cm<sup>-1</sup> i 25000 escombrats.

#### 4.3.3.3 Espectres de diferència induïts per melibiosa amb el sodi com a catió dels mutants D59C, D59E i D55C

En el cas dels mutants D55C i D59C s'observa una gran similitud entre els espectres induïts per la melibiosa-Na<sup>+</sup> i melibiosa-H<sup>+</sup> (veure figura 4.20). En canvi, els espectres de diferència del 3SV induïts per la melibiosa-Na<sup>+</sup> i melibiosa-H<sup>+</sup> presenten molta similitud en la forma, però l'espectre de diferència melibiosa-Na<sup>+</sup> mostra un fort increment de la intensitat que no

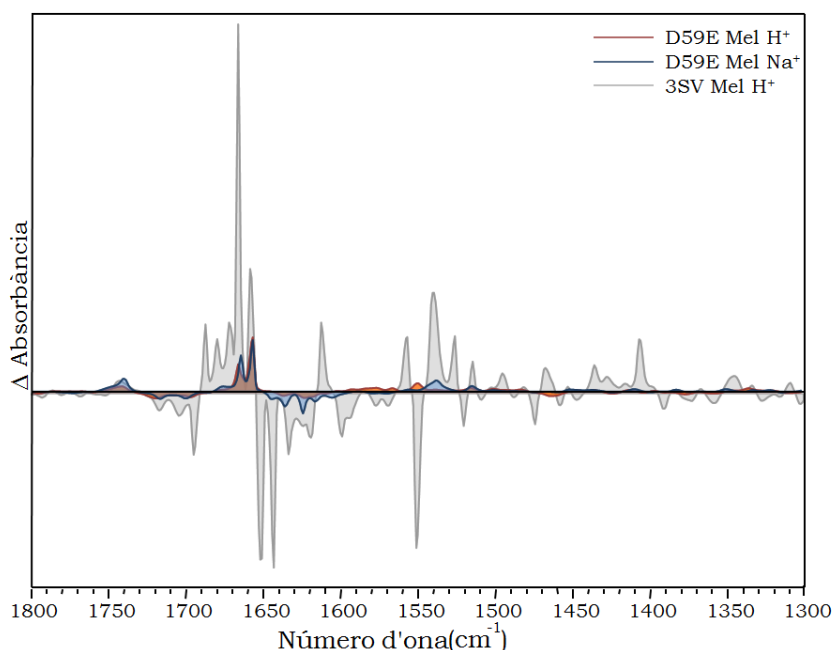
s'observa en aquests mutants (veure figura 4.17). Segons aquests resultats, els mutants D55C i D59C no uneixen sodi, ni en absència (veure figura 4.5) ni en presència de melibiosa (veure figura 4.20). És a dir, no s'observa l'efecte cooperatiu que fa augmentar l'afinitat del sodi en presència de melibiosa (GANEVA *et al.* 2001).



**Figura 4.20** **A:** Espectre de diferència desconvulat del D59C (blau) induït per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del D55C (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. **B:** Espectre de diferència desconvulat del D55C (blau) induït per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del D55C (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. En ambdues gràfiques s'ha representat l'espectre del 3SV de diferència induït per la melibiosa 50 mM en presència de protó (en gris). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.



El mutant D59E presenta un espectre molt similar en presència i absència de sodi. S'ha descrit que aquest mutant presenta transport de melibiosa induït per sodi, però l'afinitat pels substrats d'aquest mutant es troba molt reduïda (ZANI *et al.* 1994). Aquesta disminució important de l'afinitat pels substrats pot causar la manca d'efecte del sodi en els espectres de diferència induïts per melibiosa. És a dir, aquest mutant a l'igual que el D59C no mostra ni unió del sodi ni l'efecte cooperatiu degut al sodi i la melibiosa en les condicions de treball utilitzades.

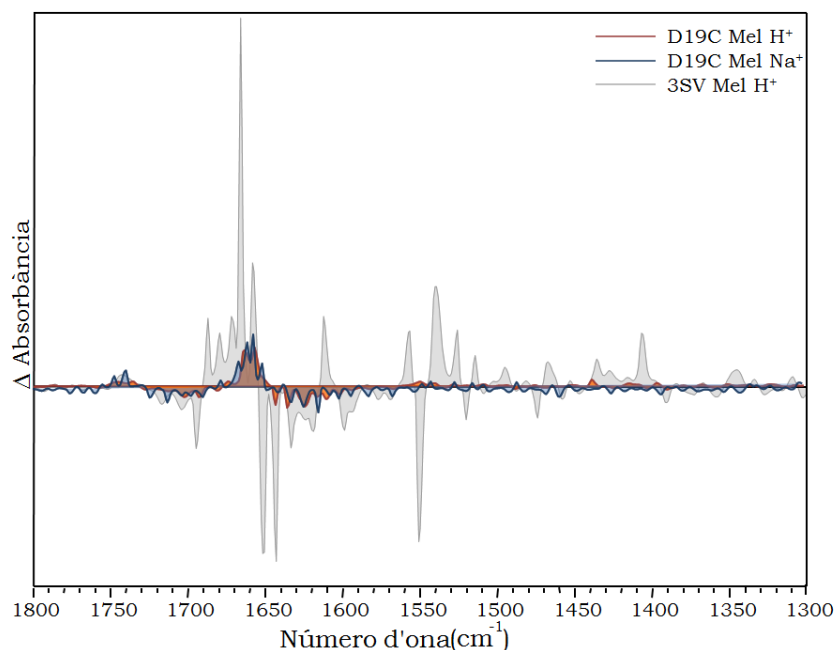


**Figura 4.21** Espectre de diferència desconvulat del D59E (blau) induït per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del D59E (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. S'ha representat l'espectre del 3SV de diferència induït per la melibiosa 50 mM en presència de protó (en gris). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

#### 4.3.3.4 Espectres de diferència dels mutants D19C, N58C i D124C induïts per melibiosa amb el sodi com a catió

En l'espectre de diferència del D19C de melibiosa- $\text{Na}^+$  (figura 4.22, espectre blau), presenta una intensitat similar a l'espectre de diferència de melibiosa- $\text{H}^+$  (figura 4.22, espectre taronja). Aquests espectres tenen una intensitat molt baixa i només es poden observar els pics de l'amida I, que no

presenten diferències en presència o absència de sodi. Aquest mutant tot i que és capaç d'unir sodi (veure figura 4.6), no és capaç d'unir melibiosa de manera efectiva ni en presència de protó ni de sodi. Aquest resultat concorden amb els estudis previs del mutant D19C on no s'observa transport amb cap catió (DING i WILSON 2001a)

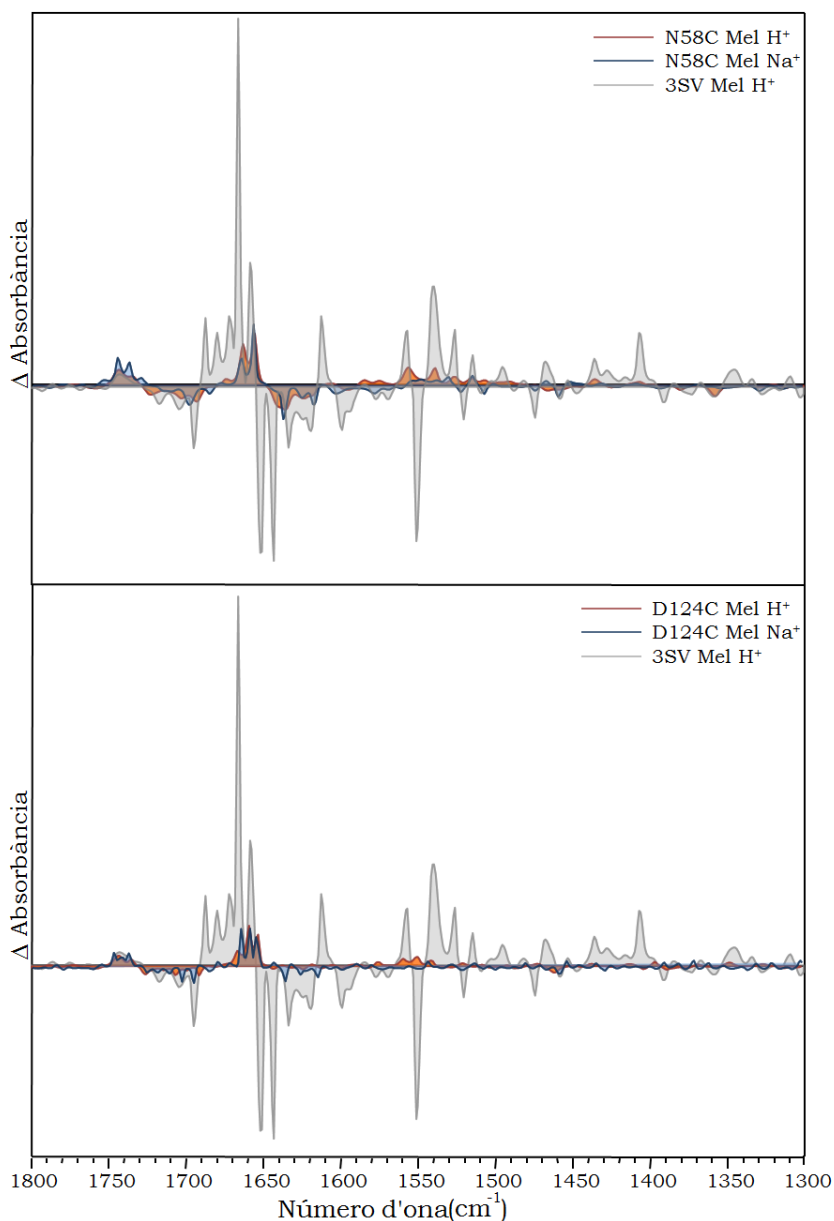


**Figura 4.22** Espectre de diferència desconvulat del D19C(blau) induït per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del D19C (taronja) induïts per melibiosa 50 mM en presència de protó. S'ha representat l'espectre del 3SV de diferència induït per la melibiosa 50 mM en presència de protó (en gris). Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

Els espectres de diferència dels mutant N58C i D124C amb melibiosa- $\text{Na}^+$  (figura 4.23A i B, espectre blau) comparat amb l'espectre de diferència de melibiosa- $\text{H}^+$  (figura 4.23A i B, espectre taronja), no presenten canvis.

El mutant N58C no uneix sodi, segons l'espectre de diferència induït per sodi (veure figura 4.5). A més tampoc s'observa un efecte significatiu de la melibiosa, ni en presència ni en absència de sodi (veure figura 4.23A), és a dir, el N58C no és capaç d'unir ni sodi ni melibiosa de manera eficient. En canvi el mutant D124C sí uneix sodi, encara que presenta variacions important respecte el 3SV (veure figura 4.7). Tot i poder unir sodi, no és

capaç d'unir melibiosa de manera eficient ni en presència ni en absència de sodi (veure figura 4.23B).



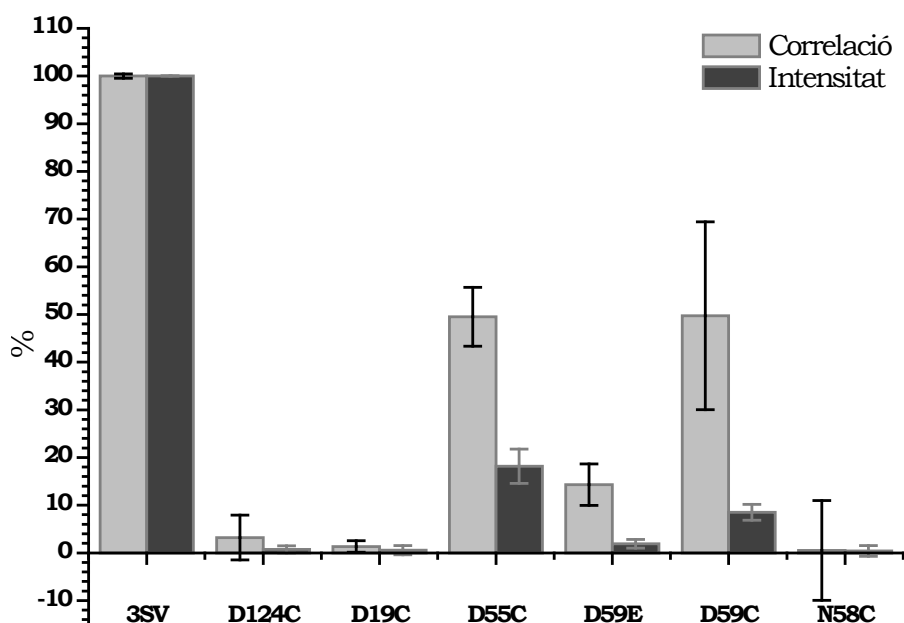
**Figura 4.23** **A:** Espectre de diferència desconvulat del N58C (blau) induïts per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del N58C (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. **B:** Espectre de diferència desconvulat del D124C (blau) induïts per melibiosa 50 mM en presència de sodi 10 mM comparat amb l'espectre del D124C (taronja) induït per melibiosa 50 mM en presència de protó. Els paràmetres de desconvolució estan detallats a Materials i Mètodes.

En resum, cap dels mutants estudiats no presenta cap efecte degut a la presència de sodi en l'espectre de diferència de melibiosa.

#### 4.3.3.5 Comparació quantitativa dels espectres de diferència degut a melibiosa en presència de sodi dels mutants amb el 3SV

Finalment s'ha realitzat un estudi quantitatiu sobre les similituds i intensitat d'aquests espectres amb l'espectre del 3SV en les mateixes condicions (veure figura 4.24).

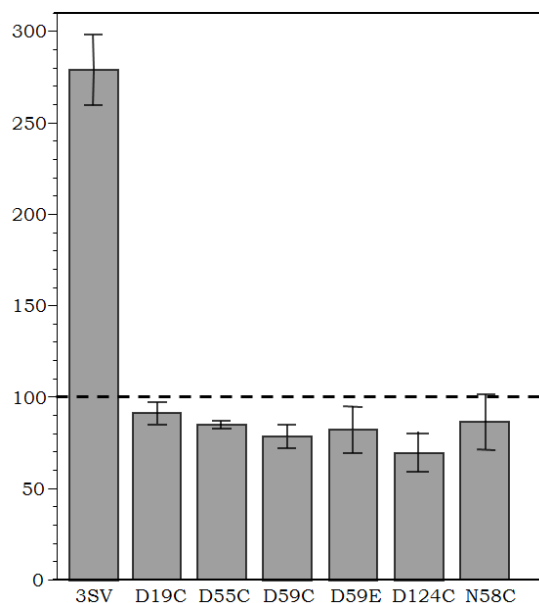
S'ha obtingut la correlació d'aquests espectres de diferència respecte al 3SV. Això ens dóna un valor que ens indica la semblança de l'espectre del mutant a l'espectre del 3SV. També s'ha realitzat un estudi de la intensitat de l'espectre de diferència. Per poder comparar l'espectre de diferència de cada mutant s'ha normalitzat per la concentració de proteïna de cadascun.



**Figura 4.24** Quantificació de la correlació i intensitat dels espectres de diferència induïts per melibiosa en presència de sodi per a cada mutant respecte al 3SV.

En la figura 4.24 es pot observar que tots els mutants tenen una intensitat molt baixa comparada amb el 3SV i només els mutants D55C i D59C tenen una intensitat superior al 10%. La correlació d'aquests mutants és d'un 50% respecte al 3SV, en canvi la correlació dels espectres de diferència induïts per melibiosa-H<sup>+</sup> d'aquests mutants respecte al 3SV és del 70% (veure figura 4.16). Aquests resultats concorden amb els resultat

observats en els espectres de diferència induïts per la melibiosa d'aquests mutants on no s'observa efecte del sodi. La resta de mutants presenta una intensitat inferior al 4% i la correlació inferior al 5%, excepte el D59E que presenta una correlació del 15%. Tot i així aquest valor de correlació no és prou intens per indicar una semblança significativa entre aquest mutant i el 3SV.



**Figura 4.25** Quantificació de la intensitat dels espectres de diferència de cada mutant en presència de melibiosa amb sodi com a catió comparat amb els espectres en presència de melibiosa amb protó (línea discontinua). Espectres normalitzats per la concentració de proteïna en cada condició.

En la figura 4.25 es presenta una quantificació de l'increment de la intensitat dels espectres induït per melibiosa en presència de sodi prenent com a referència l'espectre de diferència de melibiosa de cada mutant amb protó (línea discontinua). Es pot observar que les variacions d'intensitat entre les dues condicions són molt petites comparades amb l'increment d'intensitat que sofreix el 3SV. Per tant, l'origen d'aquest augment d'intensitat, que lògicament està relacionat amb l'acoblament, no s'observa en cap dels mutants estudiats.

Els resultats obtinguts en la quantificació, tant de les intensitats com les semblances dels espectres de diferència dels mutants induïts per melibiosa

en presència de sodi, concorden amb l'estudi qualitatiu realitzat prèviament. Cap dels mutants presenta diferències significatives respecte els espectres de diferència induïts per melibiosa en presència de protó. Segons els resultats obtinguts no es pot descartar que aquests residus estiguin implicats en la unió de la melibiosa o molt propers al lloc d'unió i generin distorsions importants en l'entorn al mutar-los. Només en el cas del residu Asp55 no s'observen evidències de la seva implicació en la unió de la melibiosa en aquest estudi, tot i que investigacions prèvies demostren que el mutant D55E també presenta una disminució de l'afinitat a l'igual que el mutant D59E (ZANI *et al.* 1994).

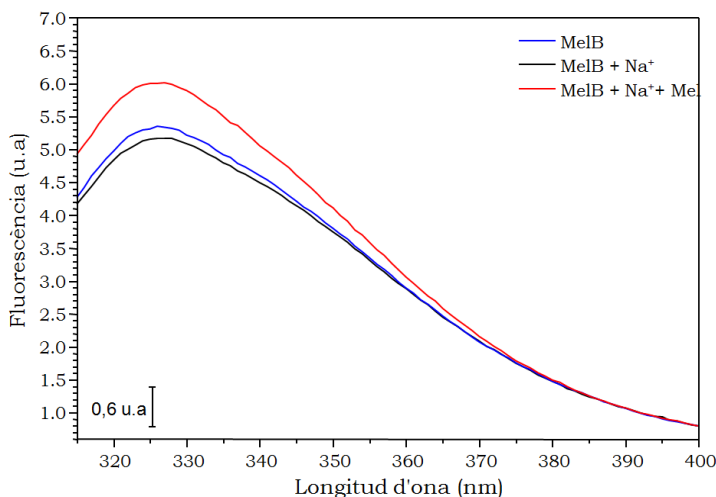
## 4.1 Estudi dels mutants de la MelB per espectroscòpia de fluorescència

### 4.3.4 Estudi de les mutacions puntuals de la MelB per fluorescència intrínseca de la proteïna

La fluorescència intrínseca generada pels triptòfans de la permeasa de melibiosa és modificada selectivament per la interacció dels substrats, catió i/o sucre (MUS-VETEAU *et al.* 1995). S'ha descrit que la interacció del sodi produeix una disminució de la intensitat de fluorescència dels triptòfans, mentre que la interacció de la melibiosa n'augmenta la intensitat (MEYER-LIPP *et al.* 2006).

Degut a l'alta sensibilitat que presenta la fluorescència, la quantitat de mostra necessària per treballar és més baixa (30-45 µg) que la utilitzada amb infraroig (120 µg). El medi de treball difereix també, ja que en infraroig la mostra es troba formant multicapes obertes dels proteoliposomes fixades al cristall, mitjançant interaccions electrostàtiques entre l'última capa i el cristall, mentre en fluorescència la proteïna es troba inserida en liposomes dispersos en una suspensió aquosa.

Primer es van mesurar els espectres d'emissió de fluorescència del mutant 3SV per poder realitzar la comparació amb la resta dels mutants. Cal recalcar que tots els espectres d'emissió i totes les cinètiques mostrades han estat normalitzades per la concentració de proteïna. En la figura 4.26 s'observa que el mutant 3SV presenta un comportament igual a la MelB silvestre. Es pot observar la disminució produïda pel sodi 10 mM (espectre negre) i l'increment de la fluorescència degut a la melibiosa 10 mM (espectre vermell).

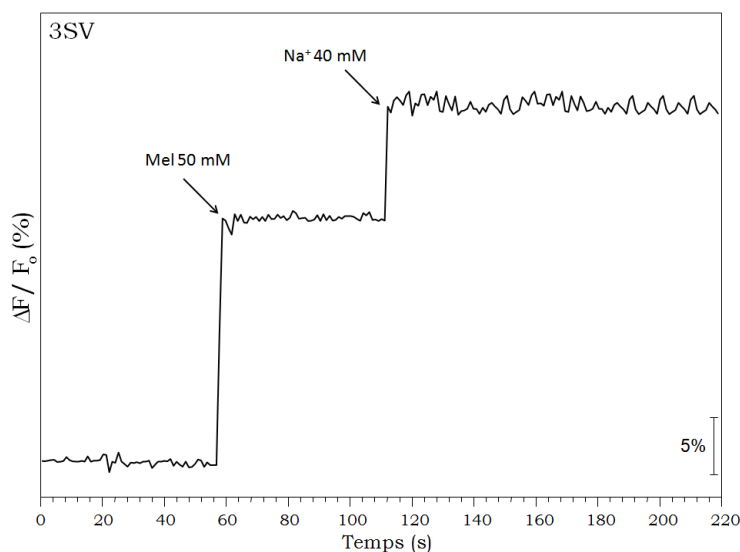


**Figura 4.26** Espectre d'emissió de fluorescència del 3SV (KPi 100 mM, pH 7.0) excitació a 290 nm, 3SV sense substrats afegits (espectre blau), 3SV amb sodi 10 mM (espectre negre), i 3SV amb sodi 10 mM i melibiosa 10 mM (espectre vermell). Cadascun d'aquests espectres és la mitja de 3 experiments individuals. Concentració de proteoliposomes del 3SV 30 µg/ml.

Per observar millor el canvi de fluorescència dels Trp causat pels substrats es va realitzar una cinètica (figura 4.27), excitant a 290 nm i mesurant l'emissió a 335 nm, en el màxim de l'espectre d'emissió de fluorescència (figura 4.26). En estudis previs es va calcular les constants de saturació mitja ( $K_{0,5}$ ) pel sodi i la melibiosa en el 3SV (MEYER-LIPP *et al.* 2006) que és el mutant que utilitzarem per comparar amb els altres mutants. El 3SV presenta una constant de saturació més alta per la melibiosa en absència de sodi ( $K_{0,5}^{melbiosa} = 50 \text{ mM}$ ) que el WT ( $K_{0,5}^{melbiosa} = 22 \text{ mM}$ ).

En la cinètica de la figura 4.27 s'observa un increment del 20% de la fluorescència a l'afegir melibiosa 50 mM. A continuació s'afegeix sodi 40 mM i s'observa un increment del 10% més de la fluorescència. Aquest augment és degut a l'augment de l'afinitat de la melibiosa en presència de sodi, que permet arribar a concentracions saturants i obtenir el màxim efecte dels substrats. Per evitar l'efecte de dilució en els espectres de fluorescència s'ha utilitzat la melibiosa en pols (degut a la seva baixa solubilitat en aigua no es pot preparar una solució prou concentrada) i pel sodi s'ha utilitzat 1 µl d'una solució concentrada de NaCl (4M).





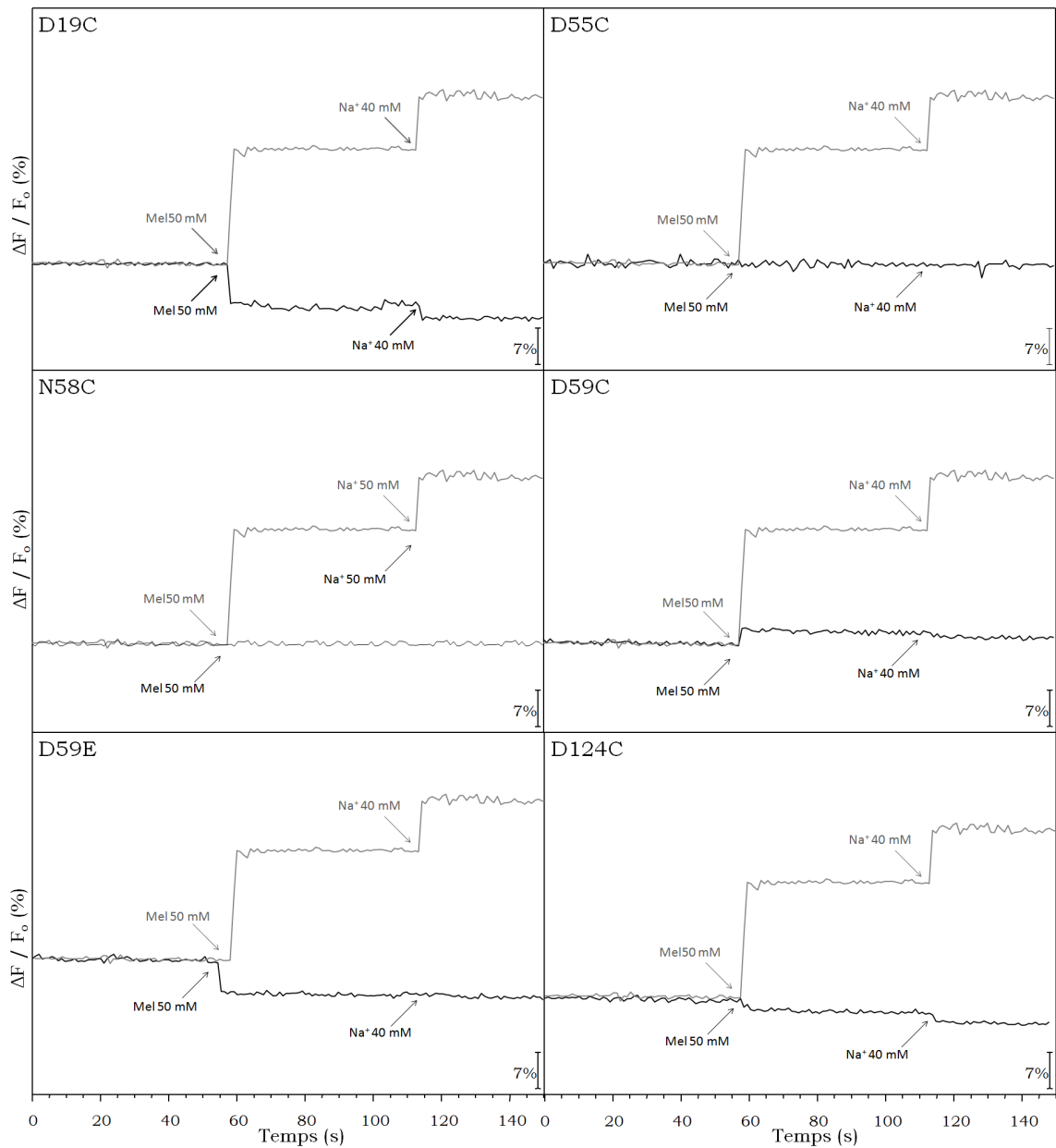
**Figura 4.27** Cinètica d'emissió de fluorescència del 3SV (KPi 100 mM pH 7), excitant a 290 nm i mesurant a 335 nm. S'indica amb fletxes l'addició de melibiosa 50 mM i Na<sup>+</sup> 40 mM. Concentració de proteliposomes del 3SV 30 µg/ml. F<sub>0</sub> és el màxim de fluorescència de l'espectre d'emissió dels Trp del 3SV.

En la figura 4.28 es poden observar les cinètiques dels mutants a l'afegir melibiosa 50 mM i després a l'afegir sodi 40 mM. El mutant D59C presenta un 2% d'increment a l'afegir melibiosa 50 mM. La causa d'aquest pobre increment de fluorescència en aquest mutant no és degut a una manca d'afinitat segons estudis previs (POURCHER *et al.* 1993). Per tant, pot ser que la mutació provoqui variacions en l'entorn dels Trp responsables de produir aquest increment. Segons els resultats d'infraroig, aquest mutant és capaç d'unir la melibiosa tot i que presenta algunes variacions respecte al 3SV.

El mutant D55C no presenta cap efecte de la melibiosa en la fluorescència, tot i que s'ha observat mitjançant els espectres d'infraroig que pot unir melibiosa de manera molt semblant al 3SV. Aquesta mutació a l'igual que en el cas del D59C deu provocar canvis en l'entorn dels Trp responsables de l'increment de la fluorescència o provocar una unió defectuosa. Els mutants D59C i D55C no presenten cap efecte degut a la unió del sodi com en els espectres d'infraroig.

El mutant N58C no presenta cap efecte degut a la melibiosa ni degut al sodi. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per infraroig, on aquest

mutant no presenta unió de sodi ni de melibiosa en les condicions de treball utilitzades.



**Figura 4.28** Canvis en la intensitat de fluorescència dels Trp dels mutants (en negre) comparat amb el 3SV (en gris) a l'afegir melibiosa 50 mM i després  $\text{Na}^+$  40 mM, excitant a 290 nm i recollint l'emissió a 335 nm (KPi 100 mM pH7). S'ha normalitzat per la concentració de proteïna i s'ha realitzat com a mínim 2 cops en cada condició (veure Materials i Mètodes). Concentració de proteoliposomes 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Els mutants D19C, D59E mostren una disminució de la fluorescència del 5% a l'afegir la melibiosa. Aquesta disminució deu ser causada per un canvi

d'entorn de triptòfans. Ja s'ha observat en estudis previs una disminució de la fluorescència causada pel canvi d'entorn del Trp 54 a l'afegir el sodi (CORDAT *et al.* 2000). En el mutant D19C s'observa una disminució de la fluorescència (2%) causada pel sodi a l'unir-se a la MelB sense coordinar-se amb la melibiosa. Aquest efecte també s'observa en el 3SV (MEYER-LIPP *et al.* 2006).

El mutant D124C presenta una lleugera disminució de la fluorescència tant a l'afegir melibiosa com sodi. L'efecte del sodi, tot i ser petit, és semblant a la disminució del 2% observada en el 3SV (MEYER-LIPP *et al.* 2006). La lleugera disminució (1%) a l'afegir melibiosa en aquest mutant pot ser deguda a un canvi d'entorn dels Trp, tot i que aquesta disminució és molt petita i no es pot considerar com a evidència de que aquest mutant sigui capaç d'unir melibiosa.

Per tant, segons els resultats obtinguts s'observa un efecte d'unió de sodi en els mutant D19C i D124C, però no hi ha acoblament del sodi amb el sucre. La resta de mutants no presenten cap efecte ni d'unió del sodi ni d'acoblament. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per infraroig.

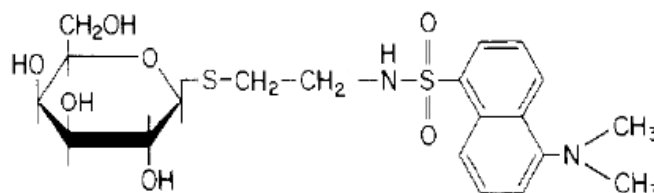
El mutant D59C presenta un increment reduït de la fluorescència a l'unir la melibiosa. Aquest resultat també concorda amb el resultat d'infraroig. En canvi, el mutant D55C no mostra cap variació de fluorescència a l'afegir melibiosa, mentre sí que s'observa un espectre de diferència d'IR induït per la melibiosa en presència de protó molt semblant al 3SV (70% de similitud). Aquest cas il·lustra com la fluorescència, al dependre de canvis d'entorn del triptòfans, no es sempre sensible a la unió de substrats ni als canvis conformacions induïts per aquesta unió. En estudis previs s'ha descrit que aquest mutant és capaç de transportar melibiosa acoblada a protó (POURCHER *et al.* 1993). Aquesta manca d'efecte del mutant D55C pot ser degut a un canvi d'entorn d'alguns dels Trp responsables d'aquests canvis de fluorescència. Pot ser que el mutant variï l'entorn del Trp o que variï l'entorn de la melibiosa impeding que aquesta provoqui cap efecte sobre els Trp.

Els mutants D59E i D19C presenten una disminució de la fluorescència. Aquest efecte deu ser generat per la unió de la melibiosa anòmala (fora del lloc funcional ) que provoca canvis d'entorn dels Trp diferents als generats pel 3SV. Mentre els mutants N58C i D124C no presenten cap efecte significatiu a l'afegir la melibiosa, possiblement degut a què no són capaços d'unir adequadament la melibiosa i no hi ha canvis en l'entorn dels Trp.

#### 4.3.5 Estudi de les mutacions puntuals de la MelB per FRET entre els Trp de la MelB i el sucre fluorescent dansil-galactòsid

Un cop analitzat l'efecte dels substrat en la fluorescència dels Trp dels mutants. S'ha realitzat un estudi de fluorescència mitjançant un anàleg de sucre fluorescent. La fluorescència d'aquest anàleg ens permetrà obtenir informació del lloc d'unió del sucre, ja que la longitud d'ona de la seva fluorescència és molt sensible a canvis en el seu entorn.

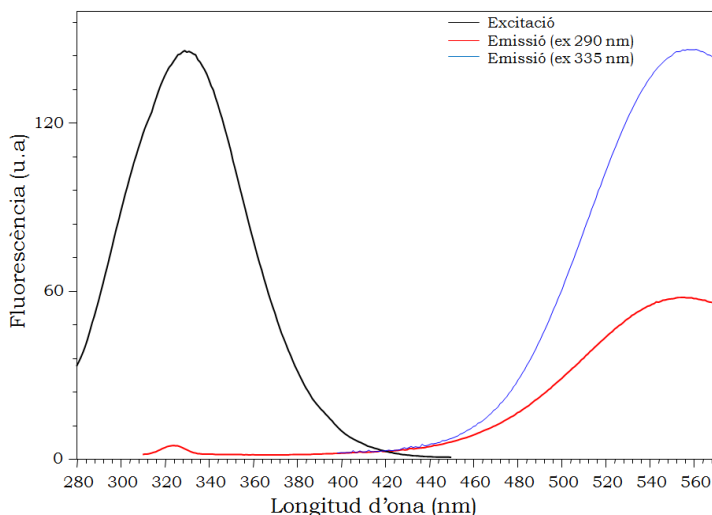
Aquest anàleg és un  $\beta$ -galactòsid amb un grup dansil (figura 4.29), que abreviarem com Dns<sup>2</sup>-S-Gal (2'(N-dansyl) aminoethyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside). És un substrat d'alta afinitat de la MelB, amb un  $K_d$  de 14  $\mu$ M sense sodi, i de 1,3  $\mu$ M en presència de Na<sup>+</sup> 10 mM. Com a comparació, la melibiosa mostra una  $K_d$  d'11 mM sense sodi, i d'1,3 mM en presència de Na<sup>+</sup> 10 mM (MUS-VETEAU *et al.* 1995; MAEHREL *et al.* 1998).



**Figura 4.29** Estructura del Dns<sup>2</sup>-S-Gal

El Dns<sup>2</sup>-S-Gal presenta un desplaçament del màxim d'absorció en funció de si es troba unit a la MelB (465 nm) o si es troba lliure (540 nm). A més, en cas que es trobi unit, es pot produir transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) entre els Trp de la MelB i el sucre. En la figura 4.30 es pot observar l'espectre d'excitació del Dns<sup>2</sup>-S-Gal (línea en negre) recollint al màxim d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en solució (500 nm), és a dir, en un medi molt polar. També s'ha analitzat l'espectre d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en solució aquosa, excitant a 290 nm (figura 4.30, espectre en vermell) i a 335 nm (figura 4.30, espectre en blau). S'observa que excitant el Dns<sup>2</sup>-S-Gal a 290 nm (la longitud d'ona d'excitació dels Trp) es produeix un 40% de la intensitat d'emissió que s'obté excitant a 335 nm. Aquesta

contribució de fluorescència del sucre en solució (no unit) a l'excitar a 290 nm s'haurà de restar en els espectres d'emissió del triptòfans per mesurar el FRET amb el Dns<sup>2</sup>-S-Gal que es presentaran posteriorment. Tanmateix, al no coincidir el màxim d'emissió del sucre fluorescent en solució amb el pic d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb la MelB, no inferirà en el resultat i a més, es pot restar sense dificultat.

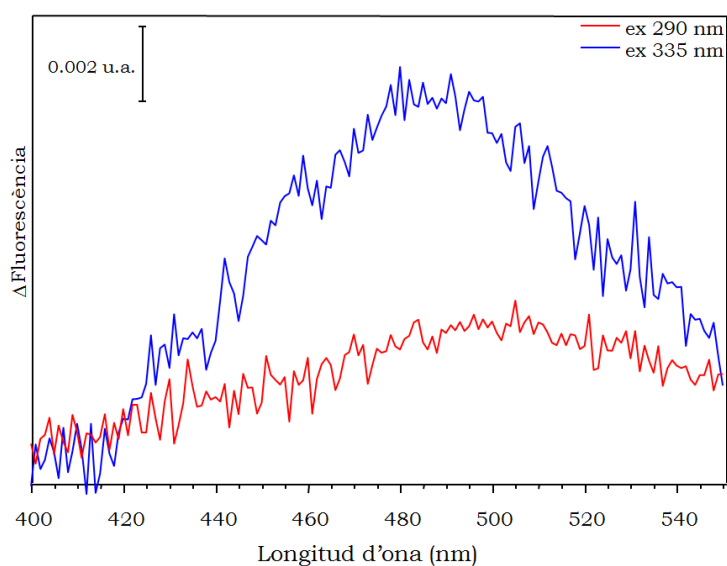


**Figura 4.30** Espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en medi aquós (100 mM KP<sub>i</sub> 100 mM KCl pH 7). En negre l'espectre d'excitació (emissió a 550 nm), en vermell l'espectre d'emissió (excitació a 290 nm), i en blau l'espectre d'emissió (excitació a 335 nm). Concentració del Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15 µM

Per tal de mesurar possibles canvis de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal per la seva interacció inespecífica amb els liposomes es va comparar el senyal de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en presència i absència de liposomes (figura 4.31). Aquests espectres s'han obtingut restant l'espectre d'emissió mesurat amb liposomes de lípids d'*E.Coli* (0,1 mg/ml) i Dns<sup>2</sup>-S-Gal (15 µM) de l'espectre d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal sol, excitant tant a 290 nm (espectre vermell) com a 335 nm (espectre blau). Tots els espectres estan normalitzats per la concentració de lípids, prenent com a referència el màxim d'emissió dels Trp dels proteoliposomes amb una concentració de lípids de 0,1 mg/ml.

Tal com es pot observar en la figura 4.31, el sucre fluorescent que interacciona amb els lípids mostra un màxim d'emissió a 490 nm, excitant a 290 nm o 335 nm. S'observa un increment del 0,0015 u.a de la

fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb els lípids, excitant a 290 nm i un 0,007 u.a. d'increment si excita a 335 nm. Hem de concloure que el senyal generat per la interacció del sucre fluorescent amb els lípids és molt petit. A més, presenta el màxim a una longitud d'ona lleugerament diferent al senyal de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal quan interacciona amb la MelB (veure figura 4.32). Per tant, el senyal degut a la interacció dels lípids amb Dns<sup>2</sup>-S-Gal no interferirà amb el senyal que obtindrem de la interacció del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb els mutants.



**Figura 4.31** Espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal (15  $\mu$ M) interaccionant amb liposomes (KP<sub>i</sub> 100 mM KCl 100 mM pH 7). Els espectres s'han obtingut de la resta dels espectres d'emissió abans i després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal, excitant a 290 nm (vermell) i a 335 nm (blau). Concentració de lípids 0,1 mg/ml en els liposomes.

#### 4.3.5.1 Espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb 3SV reconstituït en liposomes

Primer presentarem els resultats obtinguts amb el 3SV, la forma silvestre sense cisteïnes, que és la referència per comparar el comportament dels mutants estudiats. Cal recordar que cap dels mutants conté les Cys de la MelB silvestre.

Es va utilitzar 50  $\mu$ g/ml de proteoliposomes del mutant 3SV en tamp ó KP 100 mM pH 7, i l'espectre d'emissió es va adquirir excitant a 335 nm i a 290 nm. Després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15  $\mu$ M (concentració final), es va afegir Na<sup>+</sup>

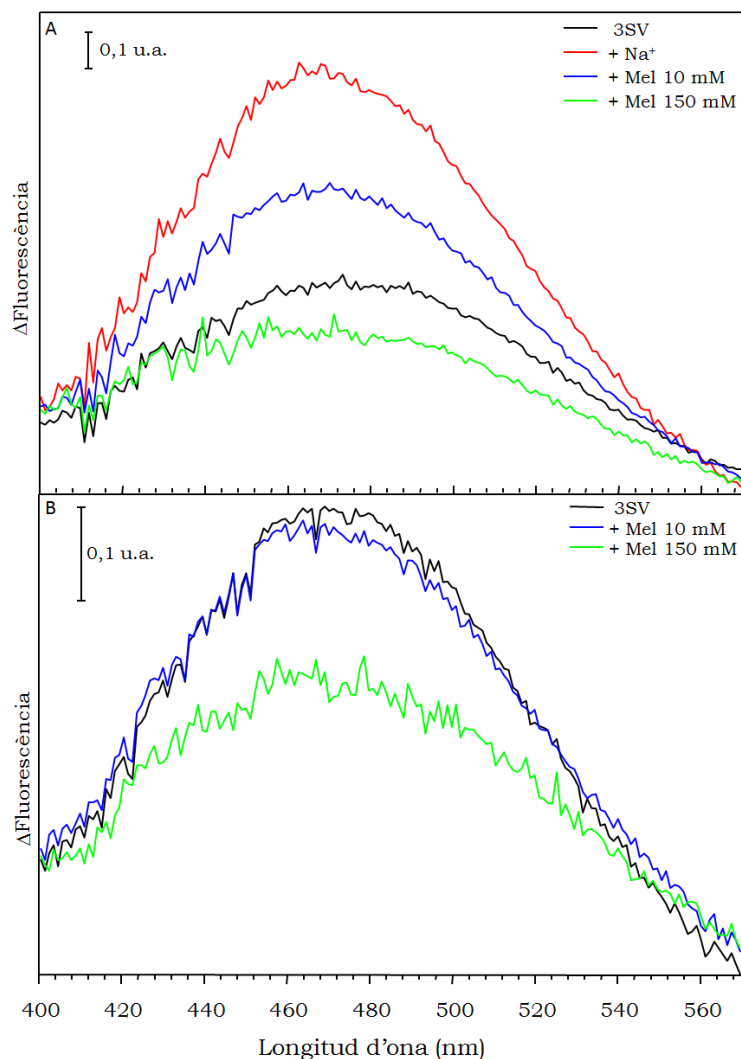
10 mM i melibiosa 150 mM consecutivament, adquirint un espectre d'emissió a cada pas. Tant excitant a 335 nm com a 290 nm que es produeix una emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en solució (figura 4.30), per això s'ha de restar aquesta contribució.

En la figura 4.32A s'observen els espectres d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal unit al 3SV. Aquests espectres s'obtenen excitant directament el sucre fluorescent (335 nm), restant la contribució dels proteoliposomes (la dispersió generada pels liposomes) a l'espectre d'emissió del 3SV. També s'ha restat la contribució del sucre fluorescent en medi aquós (figura 4.30). Tots els espectres estan normalitzats per la concentració de proteoliposomes, prenent com a referència el màxim d'emissió dels Trp.

Segons l'espectre d'emissió de la figura 4.32A (espectre negre), el Dns<sup>2</sup>-S-Gal unit al 3SV genera un pic de fluorescència amb una intensitat del 0,05 u.a i un màxim a 466 nm. A l'afegir sodi 10 mM, aquest pic augmenta d'intensitat fins un 0,1 u.a. i el màxim es desplaça cap a 460 nm (figura 4.32A, espectre vermell). Si després afegim melibiosa 10 mM, es produeix una disminució de la intensitat del pic i un desplaçament del màxim cap a 466 nm (figura 4.32A espectre blau). Tot i que hi ha un desplaçament del Dns<sup>2</sup>-S-Gal per la melibiosa 10 mM, encara s'observa unió de Dns<sup>2</sup>-S-Gal (intensitat del pic del 0,07 u.a). A l'afegir melibiosa 150 mM, s'observa una disminució important del pic del Dns<sup>2</sup>-S-Gal com a conseqüència del seu desplaçament del lloc d'unió actiu per la melibiosa. Tot i això, el Dns<sup>2</sup>-S-Gal encara mostra una intensitat del 0,03 u.a., evidència de que una fracció del Dns<sup>2</sup>-S-Gal encara es manté unida a la MelB (figura 4.32A espectre verd).

En la figura 4.32B s'han realitzat els mateixos espectres d'emissió en absència de sodi. Primer s'afegeix Dns<sup>2</sup>-S-Gal, i s'observa un pic amb una intensitat del 0,05 u.a. i un màxim a 466 nm (figura 4.32B, espectre negre). En aquest cas no hi ha cap desplaçament del Dns<sup>2</sup>-S-Gal a l'afegir melibiosa 10 mM (figura 4.32B, espectre blau), però sí que hi ha desplaçament a l'afegir melibiosa 150 mM (figura 4.32B, espectre verd). Tot i això, s'observa un espectre d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal d'una intensitat del 0,02 u.a. que no es perd a l'afegir melibiosa 150 mM.





**Figura 4.32** Espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb el 3SV, excitant a 335 nm (K<sub>P</sub>i 100 mM KCl 100 mM pH 7). **A:** Espectres d'emissió després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15 μM (espectre negre), afegint a continuació Na<sup>+</sup> 10 mM (espectre vermell), després melibiosa 10 mM (espectre blau), i finalment melibiosa 150 mM (espectre verd). **B:** Espectres després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15 μM (espectre negre), a continuació s'afegeix 10 mM melibiosa (espectre blau) i finalment melibiosa 150 mM (espectre verd). S'ha restat la contribució del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en medi aquós.

En resum, s'observa el pic de fluorescència generat per la unió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal a la MelB, que augmenta d'intensitat a l'afegir el sodi. L'augment provocat pel sodi és degut tant a l'augment de l'afinitat del Dns<sup>2</sup>-S-Gal generat pel sodi com al canvi a un entorn menys polar que provoca la unió del sodi. Finalment s'observa la disminució d'intensitat del pic a l'afegir melibiosa, ja que aquesta desplaça el Dns<sup>2</sup>-S-Gal. Tanmateix la melibiosa no és capaç de desplaçar completament el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, ni tan sols amb 150

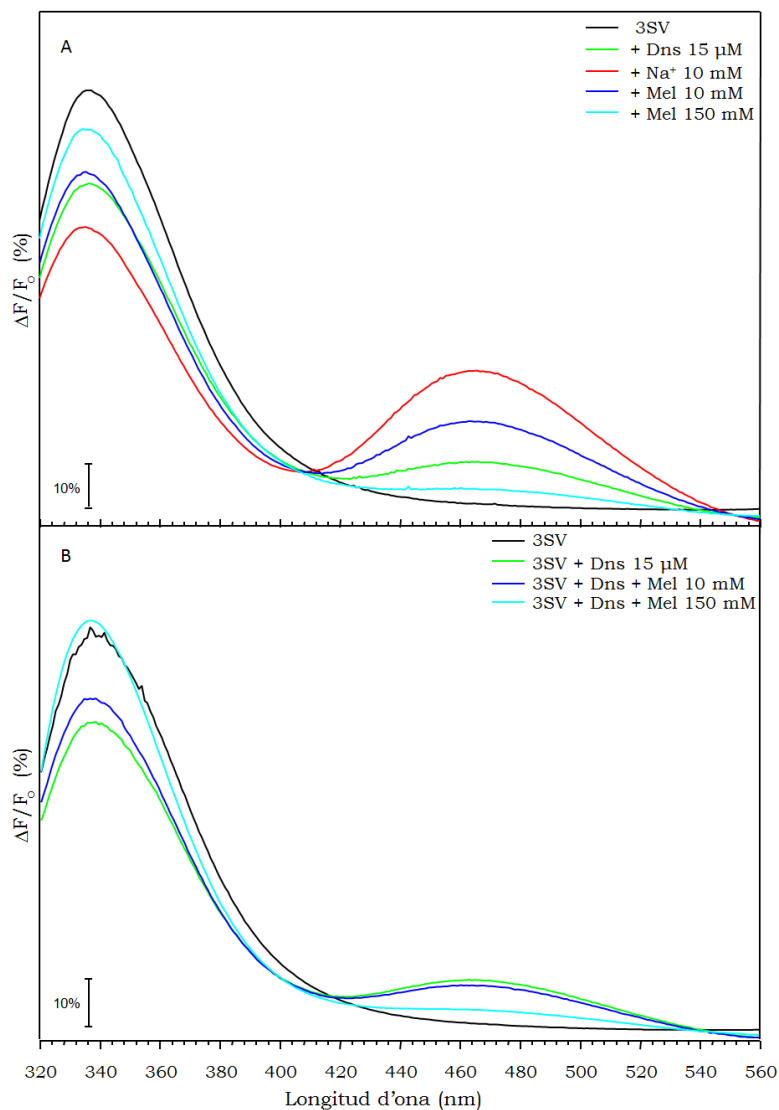
mM. Això pot ser degut a què la MelB té una afinitat molt menor per la melibiosa que pel Dns<sup>2</sup>-S-Gal, o també perquè un determinat percentatge del sucre fluorescent s'uneix a la MelB de manera diferent. És a dir el Dns<sup>2</sup>-S-Gal s'uneix a la MelB no competint amb la melibiosa. Aquesta unió estaria en un ambient similar al lloc d'unió de la melibiosa, ja que no s'observa un canvi d'entorn del Dns<sup>2</sup>-S-Gal com demostra que el fet que la longitud d'ona del seu màxim d'emissió no variï.

Segons aquests resultats, el lloc d'unió del catió provoca canvis en d'entorn del sucre. Posat que la fluorescència generada pel sucre fluorescent presenta, tant diferent intensitat com diferent longitud d'ona del màxim, depenent del catió que està unit. Tal com s'observa, el màxim del grup dansil es desplaça cap a longituds d'ona menors, indicant un entorn més hidrofòbic en presència del sodi. També s'observa que la melibiosa no és capaç de desplaçar tot el sucre fluorescent i una petita part d'aquest es queda retingut.

En la figura 4.33A s'observen els espectres d'emissió dels Trp i el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal excitant a 290 nm, on s'ha restat la contribució del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en solució. A l'espectre negre s'observa la fluorescència inicial dels Trp, que utilitzarem com a referència. A l'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal al 3SV es produeix una disminució de la fluorescència dels Trp del 20% (espectre en verd), i alhora apareix el pic de FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb el màxim a 460 nm (13% d'intensitat inicial). Després d'afegir sodi 10 mM (espectre vermell), la fluorescència dels Trp disminueix un 12% més, alhora que el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal augmenta al 34%. En l'espectre blau s'observa que a l'afegir melibiosa 10 mM la fluorescència dels Trp es recupera parcialment (augment d'intensitat del 12% respecte la inicial), i el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal cau del 34% a un 20%. Per últim a l'afegir melibiosa 150 mM (espectre cian), la fluorescència dels Trp és un 90% respecte la inicial i el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal cau fins un 6% de la fluorescència inicial

Segons aquests resultats, la presència de sodi augmenta la intensitat de FRET del sucre fluorescent. Aquest augment de la intensitat d'emissió també s'ha vist en la fluorescència intrínseca de la MelB o en la fluorescència directa del sucre fluorescent. Per tant l'augment del FRET del

Dns<sup>2</sup>-S-Gal en presència de sodi deu ser degut tant a un augment de l'afinitat de la MelB pel sucre fluorescent com a un canvi d'entorn dels Trp o/i Dns<sup>2</sup>-S-Gal.



**Figura 4.33** Espectres de fluorescència dels Trp i el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb 3SV, excitant a 290 nm (100 mM KP<sub>i</sub> 100 mM KCl pH 7). **A:** Espectres abans i després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15  $\mu$ M (espectre negre i verd, respectivament), afegint a continuació 10 mM Na<sup>+</sup> (espectre vermell), després afegint 10 mM melibiosa (espectre blau) i finalment afegint melibiosa 150 mM (espectre cian). **B:** Espectres abans i després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal 15  $\mu$ M (espectres negre i verd, respectivament), a continuació s'afegeix 10 mM melibiosa (espectre blau), per últim melibiosa 150 mM (espectre cian). Concentració de 3SV 50  $\mu$ g/ml. S'ha restat la contribució del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en medi aquós.

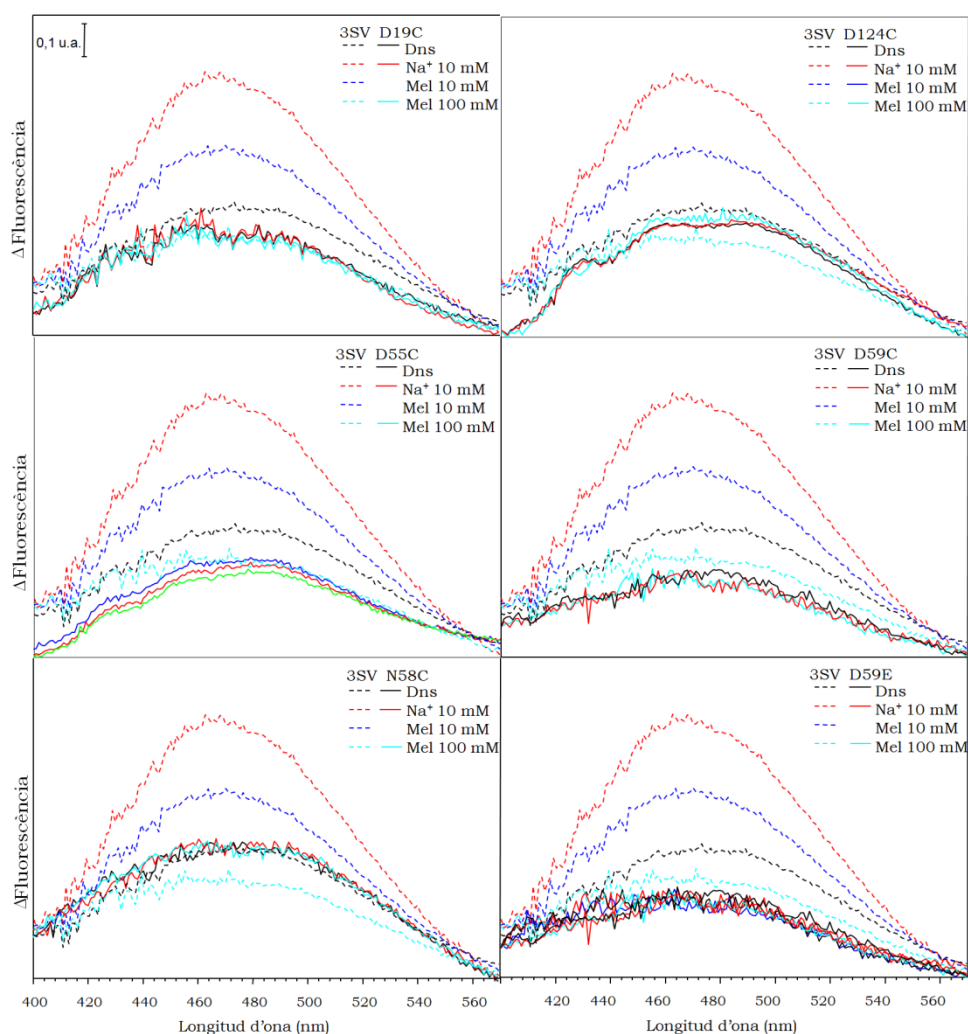
A la figura 4.33B s'observa el mateix experiment però en absència de sodi. L'espectre en negre representa al 3SV sol, i en verd a l'afegir el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, que naturalment dóna la mateixa fluorescència que l'espectre verd de la figura 4.33A. L'espectre en blau és el 3SV amb Dns<sup>2</sup>-S-Gal i melibiosa 10 mM que no provoca cap desplaçament del Dns<sup>2</sup>-S-Gal tal com era d'esperar. Ja que l'afinitat de la MelB per la melibiosa en presència de protó és més baixa. Finalment a l'afegir melibiosa 150 mM s'observa un desplaçament del Dns<sup>2</sup>-S-Gal (6% d'intensitat respecte l'inicial). Aquest senyal residual deu ser degut a una interacció inespecífica del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb la MelB o a una petita quantitat de Dns<sup>2</sup>-S-Gal que no és desplaçat per la melibiosa. Ja que dóna FRET, aquest Dns<sup>2</sup>-S-Gal no desplaçable amb melibiosa ha de estar unit prop del lloc d'unió de la melibiosa, o en un altre lloc d'unió proper a algun triptòfan.

Segons aquests resultats, que concorden amb els obtinguts prèviament pel laboratori del Dr. Leblanc (MAEHREL *et al.* 1998), el Dns<sup>2</sup>-S-Gal unit al 3SV presenta un FRET molt més intens a l'utilitzar el sodi com a catió que a l'utilitzar el protó. També s'observa que la melibiosa és capaç de desplaçar el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, encara que en excés de melibiosa es manté una petita quantitat de FRET, indicant que no tot el Dns<sup>2</sup>-S-Gal es desplaça i part es manté unit. Aquesta transferència d'energia entre Trp i Dns<sup>2</sup>-S-Gal residual (espectre cian) ha de produir-se amb el grup dansil interaccionant directament amb la MelB, com es pot deduir pel fet que el senyal de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal excitant a 290 nm interaccionant amb els liposomes sense MelB és mínima. Una altra evidència de la interacció directa del Dns<sup>2</sup>-S-Gal no desplaçat amb la MelB és la longitud d'ona del seu màxim de fluorescència, que coincideix amb el màxim del Dns<sup>2</sup>-S-Gal unit al lloc d'unió actiu de la melibiosa.

#### *4.3.5.2 Espectres de fluorescència dels Trp i del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb els mutants D19C, D55C, N58C, D59C, D59E i D124C*

Al realitzar els espectres de fluorescència excitant directament el sucre fluorescent (335 nm), es pot observar el pic d'emissió generat per la unió del

Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb els mutants (D19C, N58C, D55C, D59C, D59E i D124C). Aquests pics presenten una intensitat (0,02-0,03 u.a) similar a l'observada pel 3SV després de desplaçar el Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb melibiosa 150 mM (0,02 u.a). Això sembla indicar que aquests mutants no uneixen el sucre fluorescent de manera eficient (figura 4.34). La causa d'aquest d'interacció inespecífica dels mutants es pot explicar per la disminució de l'afinitat que pateixen aquests mutants pels  $\beta$ -galactòsids. (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993; FRANCO i WILSON 1996).



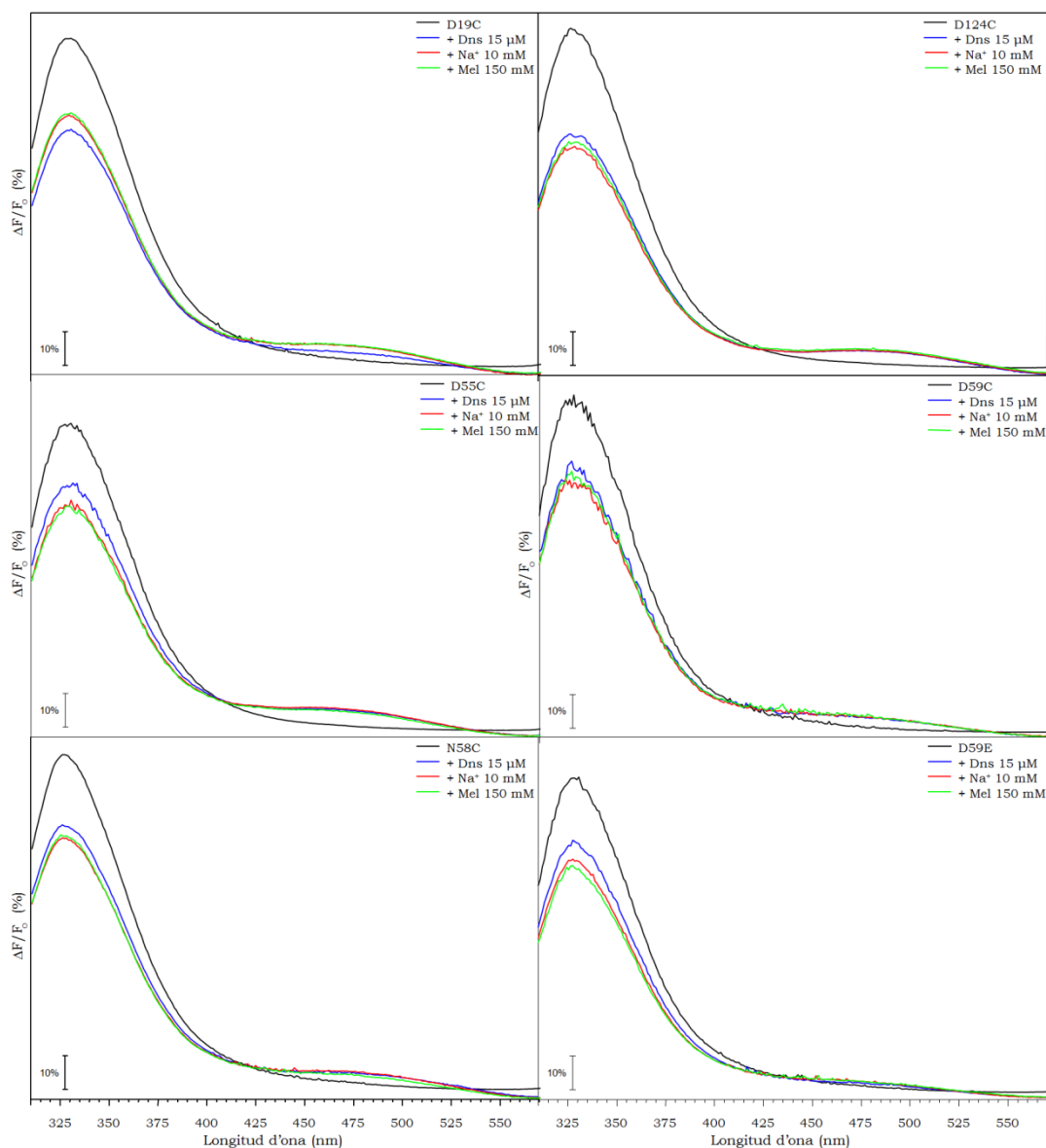
**Figura 4.34** Espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb els mutants, excitant a 335 nm (KPi 100 mM KCl 100 mM pH 7). L'espectre negre després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal (15  $\mu$ M), l'espectre vermell després d'afegir Na<sup>+</sup> (10 mM) i l'espectre cian després d'afegir melibiosa (150 mM). S'ha restat la contribució del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en medi aquós. S'ha representat els espectres de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb el 3SV com a referència.

El màxim d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb els mutants es troba a 466 nm, que coincideix amb el màxim del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb el 3SV en presència de protó. Això podria indicar que encara que el Dns<sup>2</sup>-S-Gal pot interaccionar amb aquests mutants no ho fa al lloc d'unió actiu de la melibiosa, ja que la melibiosa no és capaç de desplaçar-lo. És poc probable que la manca de desplaçament sigui degut a una disminució de l'afinitat de la melibiosa, ja que s'ha descrit que alguns dels mutants presenten una afinitat per la melibiosa semblant al WT (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993, 1994). Per tant aquesta interacció del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb els mutants, tot i esta proper al lloc d'unió del sucre no es produeix en el lloc natiu d'unió del sucre.

En cap dels mutant s'observa un increment de la fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal a l'afegir sodi 10 mM. Per tant aquests mutants no mostren l'efecte cooperatiu generat per la unió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal i el sodi. Tant perquè no poden unir el sodi en el cas del D55C, N58C, D59C, D59E com perquè no hi ha cap efecte del sodi sobre el Dns<sup>2</sup>-S-Gal en el cas del D19C i D124C.

Per últim, a l'afegir la melibiosa 150 mM no es produeix cap canvi en la fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal. Per tant la melibiosa no pot desplaçar el Dns<sup>2</sup>-S-Gal del seu lloc d'unió a la MelB. Això concorda amb la hipòtesis que el Dns<sup>2</sup>-S-Gal no s'uneix en el lloc d'unió actiu del sucre en aquests mutants. Aquesta interacció del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb els mutants es produeix, però en un entorn molt similar al natiu, ja que no hi ha desplaçament de la longitud d'ona en l'espectre d'emissió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal respecte al 3SV.

La figura 4.35 mostra els espectres de fluorescència dels Trp de cada mutant excitant a 290 nm, junt amb el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal que es troba interaccionant amb els mutants. Primer, s'adquireix l'espectre fluorescència dels Trp dels proteoliposomes amb la MelB mutada (espectre en negre), després s'afegeix Dns<sup>2</sup>-S-Gal (espectre en blau), a continuació s'afegeix sodi 10 mM (espectre en vermell) i per últim s'afegeix melibiosa 150 mM (espectre en verd). Tots els espectres estan normalitzats per la concentració de proteïna utilitzant el màxim d'emissió dels Trp.



**Figura 4.35** Espectres de fluorescència dels Trp i el FRET del Dns<sup>2</sup>-S-Gal interaccionant amb els mutants, excitant a 290 nm (KPi 100 mM KCl 100 mM pH 7). Espectre negre abans d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal, espectre verd després d'afegir Dns<sup>2</sup>-S-Gal (15 μM), espectre vermell després d'afegir Na<sup>+</sup> (10 mM) i l'espectre blau després d'afegir melibiosa (150 mM). S'ha restat la contribució del Dns<sup>2</sup>-S-Gal en el medi aquós.

Com es pot veure a la figura 4.35, la intensitat d'emissió a 460 nm deguda a la transferència d'energia entre els Trp dels diferents mutants i el sucre fluorescent és molt baixa (comparar amb la figura 4.33). Aquesta disminució del FRET suggereix manca o deficiències en la unió del sucre en els mutants estudiats. Aquestes deficiències podrien ser degudes a què les mutacions provoquen canvis conformacionals que impedeixen la correcta unió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal, o bé la seva unió no es dona prou a prop de cap dels

Trp de la MelB mutada perquè es produeixi FRET. Aquests valors concorden amb els obtinguts en els espectres de fluorescència directa del Dns<sup>2</sup>-S-Gal.

Segons els resultats obtinguts amb l'anàleg de sucre Dns<sup>2</sup>-S-Gal, tant per la seva fluorescència directa com per el seu FRET amb els triptòfans de la proteïna, la unió d'aquest anàleg als mutants no es produeix en el lloc d'unió natiu de la MelB. S'ha observat que en el cas dels mutants la unió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal no competeix amb la melibiosa, i no presenta FRET significatiu amb els Trp de la MelB. Aquests mutants deuen patir algun canvi conformacional que impedeix que el Dns<sup>2</sup>-S-Gal s'uneixi al lloc d'unió actiu de la MelB. En cap cas s'observa cap canvi de fluorescència deguda a la unió del sodi. Aquest resultat coincideix amb els obtinguts per infraroig on la interacció de la melibiosa amb la MelB no està afectada per la presència de sodi.



#### 4.3.6 Marcatge de les Cys dels mutants mitjançant MIANS

El 2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6-sulfònic àcid (MIANS) és una sonda fluorescent que reacciona amb els grups tiol. Això fa que sigui molt útil per poder estudiar les cisteïnes que s'han introduït en els diferents mutants (GUPTÉ i LANE 1979).

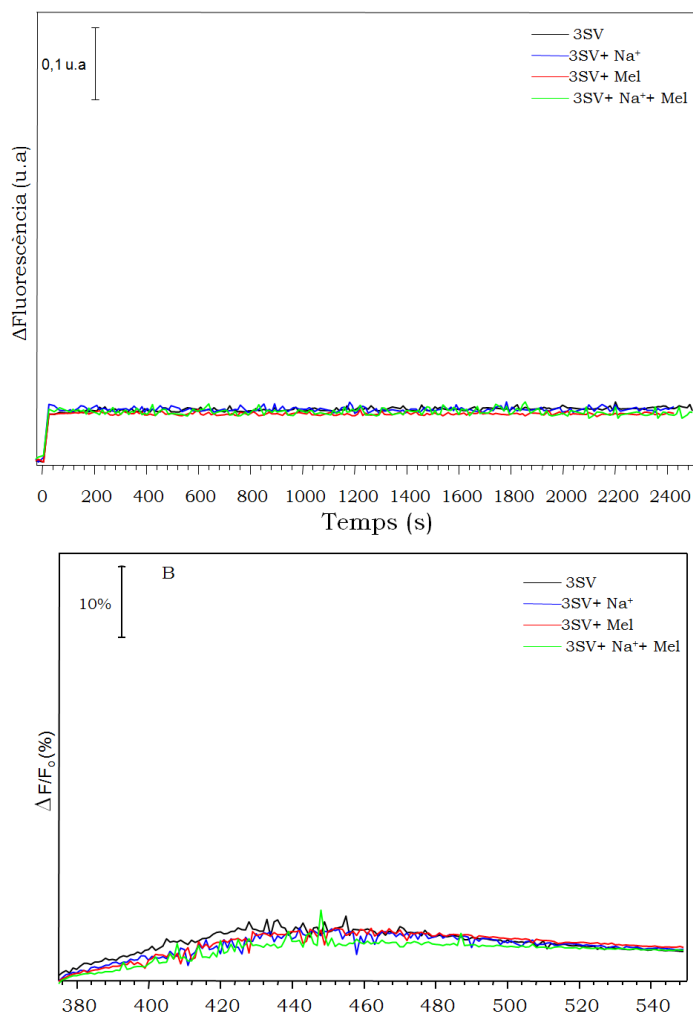
Aquesta sonda presenta molt poca fluorescència fins que no ha reaccionat amb el grup tiol. Per tant ens permet fer un seguiment de la cinètica de la reacció del MIANS amb les cisteïnes de la proteïna, i aquesta cinètica dependrà de la seva accessibilitat (WEITZMAN *et al.* 1995; HOGLAND i JAY 2002). A més, la sonda presenta una forta sensibilitat al medi en què es troba i produeix fluorescència més intensa en entorns hidrofòbics, amb un màxim d'emissió desplaçat a longituds d'ona menors, permetent obtenir informació de l'entorn de la Cys reaccionant. Tots els mutants estudiats en aquest treball només tenen la Cys que s'ha introduït per mutagènesi dirigida, per tant aquesta sonda ens donarà informació de la situació d'aquest aminoàcid.

Tal com s'ha descrit a Materials i Mètodes, l'estudi es realitza amb una solució de proteoliposomes de les MelB mutades (0,4 µM) amb KPi 100 mM pH 7. A aquesta solució se li afegeix la sonda fluorescent MIANS (16 µM), és a dir, a una concentració 40 vegades superior a la concentració de la cisteïna amb la que pot reaccionar. A continuació es realitza el seguiment de la reacció recollint l'emissió a 415 nm a l'excitar a 335 nm.

Tots els mutants tenen una única cisteïna per reaccionar, i la sonda es troba en una concentració saturant. Per tant, durant la reacció la concentració de MIANS no variarà significativament.

Aquesta sonda és molt sensible a l'entorn, i podrien donar-se contribucions independents a la reacció amb la Cys dels mutants. Per aquesta raó es va realitzar l'experiment del MIANS amb 3SV, que no conté cap Cys. Es va realitzar la reacció amb presència i absència de substrats. S'observa una interacció inespecífica, encara que molt petita. Per aquest

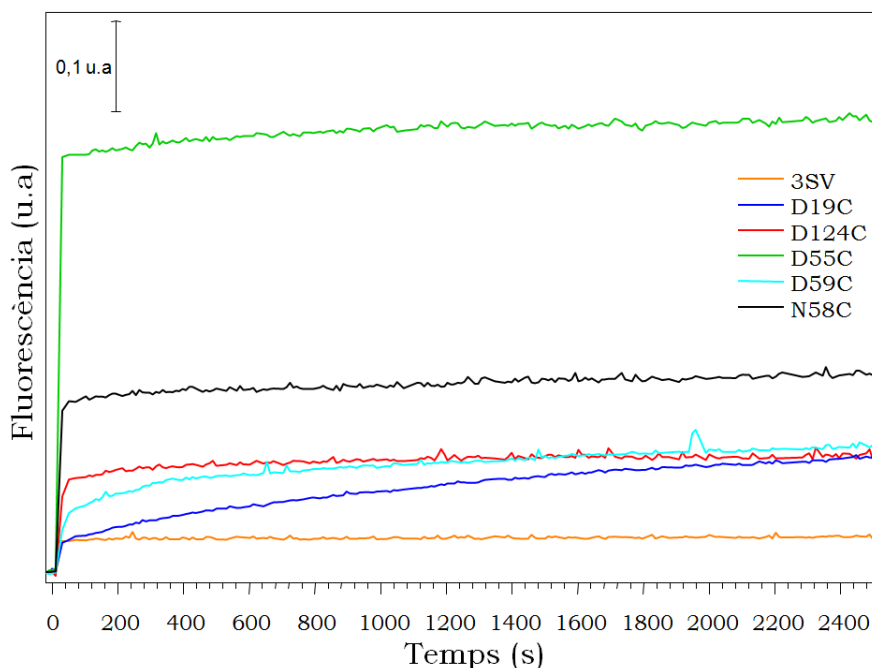
motiu s'ha restat el senyal de 3SV a cadascun dels mutants en els espectres finals d'emissió.



**Figura 4.36** Reacció del 3SV amb MIANS ( $KP_i$  100 mM KCl 100 mM pH 7). **A:** Cinètica de la reacció del MIANS 16  $\mu$ M amb el 3SV en presència i absència de substrats (10 mM). Excitació a 335 nm i emissió a 415 nm. **B:** Espectre de fluorescència del MIANS interaccionant amb el 3SV al finalitzar la cinètica, excitació a 335 nm.

En primer lloc analitzem la reacció de les Cys en cada un dels mutants (veure figura 4.37). S'ha representat la intensitat de fluorescència del MIANS-Cys respecte el temps. S'observa que en el mutant 3SV la fluorescència no varia en funció del temps, com era d'esperar, ja que aquest mutant no conté Cys. La fluorescència que s'observa és deguda a una interacció inespecífica. En canvi, el mutant D19C presenta un increment lent de la fluorescència en funció del temps. Això ens indica la baixa

accessibilitat de la cisteïna d'aquest mutant. El mutant D59C també té un increment lent de la fluorescència, encara que és major que la del D19C.



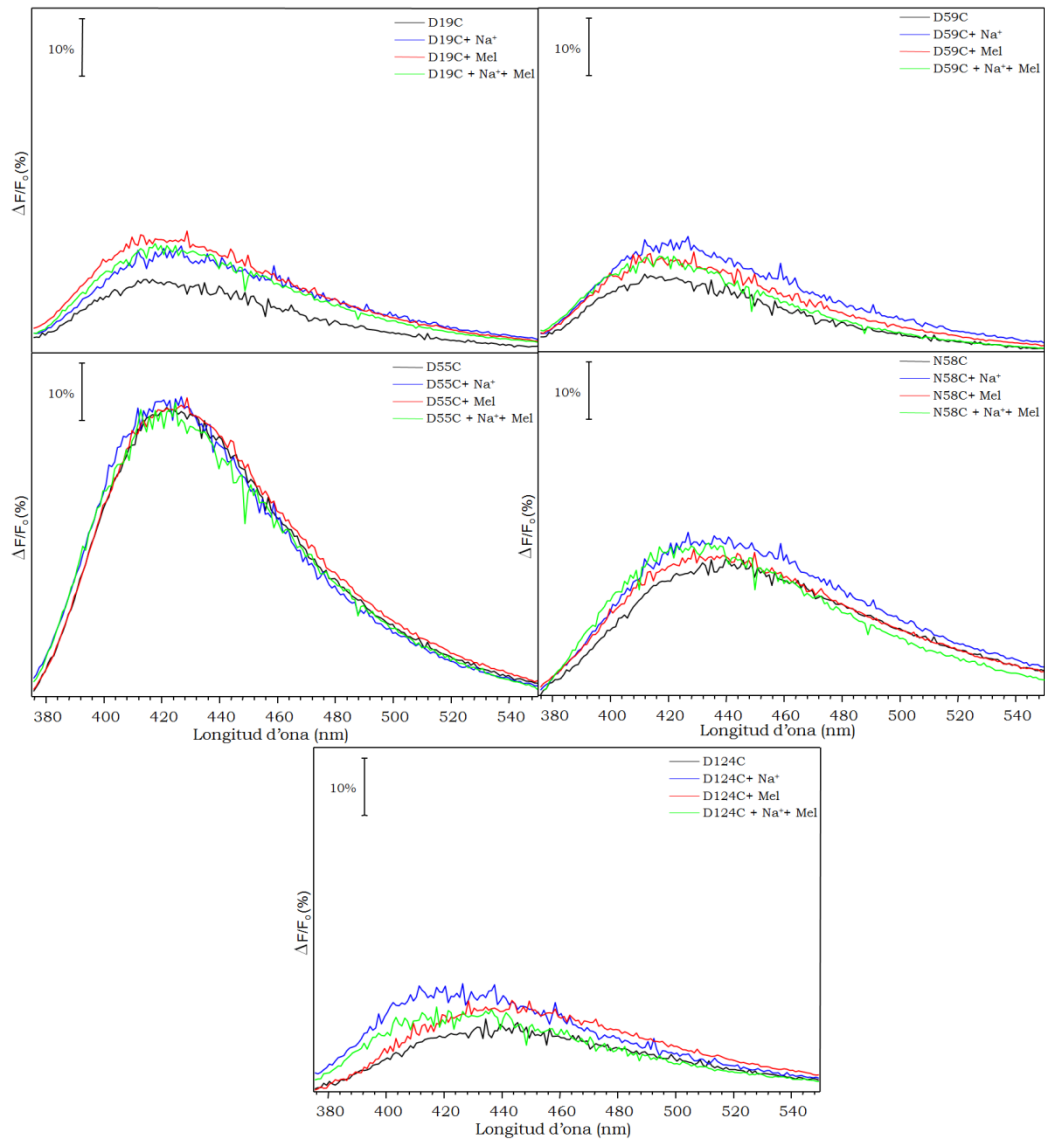
**Figura 4.37** Reacció de les cisteïnes dels mutants amb MIANS respecte la fluorescència del Cys-MIANS ( $KP_i$  100 mM KCl 100 mM pH 7), emissió 415 nm i excitació 335 nm. Concentració dels proteoliposomes 30  $\mu$ g/ml, cada mutant està representat per un color, cada cinètica està normalitzada per la concentració de proteïna.

Els mutants D55C, N58C i D124C mostren un increment fort de la fluorescència a l'inici de la reacció. Això deu ser degut a què la velocitat de reacció d'aquests residus és molt ràpida i no es poden observar els increments inicials. Aquests residus deuen ser molt accessibles. Així l'ordre de accessibilitat dels mutant seria D19C<D59C<N58C~D124C~D55C.

En la figura 4.38i ha representat l'espectre d'emissió del MIANS de cada mutant al final de la reacció. Aquests espectres s'han obtingut restant a l'espectre final de la reacció amb MIANS l'espectre inicial abans d'afegir el MIANS. Cal dir que aquests espectres estan normalitzats per la concentració de proteïna utilitzant la fluorescència inicial dels triptòfans.

La major fluorescència de MIANS s'observa en el D55C, que a més presenta un màxim d'emissió a 421 nm. No s'observen canvis ni d'intensitat ni del màxim d'emissió en l'espectre d'emissió del MIANS en presència de sodi ni de melibiosa. El següent mutant amb una intensitat de fluorescència

del MIANS major és el N58C. El mutant N58C presenta una fluorescència similar en presència i absència dels substrats, amb el màxim a 433 nm. Sembla que el residu Cys 58 es troba en un entorn menys hidrofòbic que la Cys 55, ja que el màxim es desplaça a longituds d'ona majors

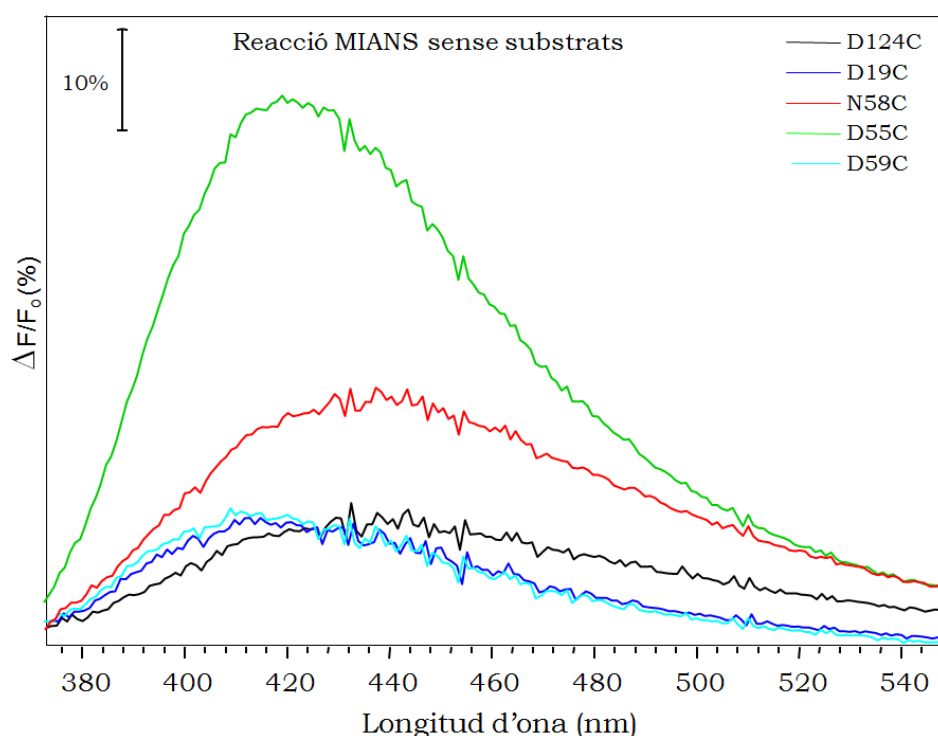


**Figura 4.38** Espectres de fluorescència del MIANS (16  $\mu\text{M}$ ) unit a la Cys dels mutants ( $\text{KPi}$  100 mM  $\text{KCl}$  100 mM pH 7), excitant a 335 nm. Els espectres esta normalitzats per la concentració de proteïna.

A l'observar els pics d'emissió del MIANS dels mutants D19C i D59C es troben a longituds d'ona més baixes (418 nm), indicant un entorn hidrofòbic. Per tant les Cys d'aquests mutants són les menys accessibles i

més hidrofòbiques. Tal com es pot observar en la figura 4.38 no varia l'entorn de les Cys 19 ni Cys 59 en funció dels substrats de la MelB

El mutant D124C és el que presenta major variació de la fluorescència en funció de la presència dels substrats al medi. Presenta un màxim a 433 nm en absència de substrats al medi o en presència de melibiosa. En canvi en presència de sodi, o en presència de sodi i melibiosa, presenta un màxim a 421 nm. Sembla doncs que un canvi conformacional relacionat amb la unió del sodi produeix un canvi d'aquest residu a un entorn més hidrofòbic.



**Figura 4.39** Espectres d'emissió del MIANS unit a les Cys de cada mutant en absència de substrats al final de la reacció. Emissió a 415 nm, excitació a 335 nm.

La figura 4.39 representa els espectres d'emissió del MIANS en cada mutant sense substrats, excitant 335 nm. En aquesta figura s'observa que els mutants D55C, D19C i D59C tenen el màxim a longituds menors, mentre el D124C i N58C el tenen a longituds majors. Així els mutants D124C i N58C en absència de substrats es troben en un entorn menys hidrofòbic que els mutants D55C, D59C i D19C.

Segons tots els resultats obtinguts amb la reacció del MIANS amb les Cys dels mutants, tenim que: 1) el residu Asp 55 és el més accessible i es troba en un entorn més hidrofòbic; 2) el residu Asn 58 és també accessible, però es troba en un entorn menys hidrofòbic; 3) els residus Asp 19 i Asp 59 presenten una accessibilitat baixa, però una hidrofobicitat alta; i 4) el residu Asp 124 presenta una accessibilitat alta, i l'entorn del Asp 124 canvia en presència de sodi, fent-lo més hidrofòbic.

## Discusió General

## 5 Discussió general

En aquest treball s'ha aprofundit en l'estudi dels residus implicats en la unió del catió en la permeasa de melibiosa (MelB). Les investigacions prèvies realitzades per altres grups, es van fer mitjançant estudis d'unió per la tècnica de diàlisis de flux i estudis de transport per la tècnica de filtració ràpida, utilitzant melibiosa o NPG radioactius. Aquests estudis s'han realitzat tant en cèl·lules transformades amb MelB, com en vesícules de membrana. El problema d'aquestes mesures és que no permeten observar directament la unió del catió, només s'observa l'efecte del catió sobre la unió o transport del sucre. A més no aporten informació sobre els canvis que tenen lloc a la proteïna durant la unió i el transport dels substrats. Tanmateix s'ha de tenir en compte que en alguns casos la concentració de sucre radioactiu utilitzat és baixa (MATSUZAKI *et al.* 1999) i en mutants en els que no es detecta transport podria produir-se per una disminució de l'afinitat.

També hem de tenir en compte que encara que la pèrdua del lloc d'unió del sodi farà perdre la capacitat de transportar melibiosa acoblada a un gradient de sodi, la pèrdua de la capacitat de transport no implica necessàriament la pèrdua del lloc d'unió. Per tant, tècniques sensibles només a la unió o transport del sucre presenten importants limitacions per identificar els residus implicats en la unió del sodi. Igualment en les mesures d'unió del sucre radioactiu, s'ha de tenir en compte que es pot produir una interacció entre el sucre radioactiu i la MelB fora del lloc d'unió actiu. Encara que no demostrat, és probable que el sucre interaccioni amb la MelB en la superfície abans d'arribar al lloc actiu d'unió, tal com s'observa amb els substrats del transportador de leucina (SINGH *et al.* 2008). Totes aquestes raons han fet difícil fins ara concloure quins són els residus implicats en la unió del sodi, i només s'ha pogut proposar un possible model.

Les tècniques utilitzades en aquest treball aporten informació estructural i dinàmica sobre la unió tant del sodi, com del sucre, i per tant



complementen les mancances d'estudis previs. Els espectres de diferència d'IR, alternant solucions amb i sense substrat, permeten observar si un mutant és capaç d'unir tant sodi, com melibiosa en presència o absència de sodi, i quantificar els canvis estructurals induïts per aquesta unió. Si la interacció és poc específica o feble, no produirà canvis conformacionals importants en la MelB. Per tant, aquesta tècnica és una eina molt potent per poder estudiar la unió específica tant del sodi com del sucre.

Per altra banda, els espectres de fluorescència intrínseca de la MelB permeten veure l'efecte de la unió dels substrats sobre la fluorescència dels triptòfans de la MelB. La fluorescència d'aquests Trp és sensible a canvis en el seu entorn, que poden ser provocats com a conseqüència dels canvis estructural derivats de la unió dels substrats.

En el present treball s'ha estudiat la importància dels quatre aspàrtics proposats com a lloc d'unió dels cations (Asp 19, Asp 55, Asp 59 i Asp 124). S'ha estudiat la implicació aquest residus en la unió del sodi i de la melibiosa, mitjançant la seva mutació a Cys. La detecció de la unió de sodi i melibiosa en els diferents mutants s'ha dut a terme mitjançant l'ús de l'espectroscòpia d'infrarroig de diferència, i de l'espectroscòpia de fluorescència. La mutació a Cys es va dur a terme per coherència amb la major part d'estudis anteriors. Així mateix, la mutació a Cys presenta l'avantatge de poder realitzar una reacció específica amb reactius de grups tiol que poden donar-nos informació de la accessibilitat del residu mutat.

També es va introduir el mutant D59E en el nostre estudi. La comparació del fenotip del mutants D59C i D59E pot ampliar molt els coneixements de la implicació d'aquest residu en la unió del sodi, ja que el mutant D59E conserva el grup funcional (àcid carboxílic) i el mutant D59C conserva la mida de la cadena lateral.

Tot i centrar el nostre estudi en els Asp de la MelB implicats en el lloc d'unió del catió, molt proper a ells hi ha l'Asn 58. En estudis previs es va realitzar la mutació de l'Ala de MelB<sub>KP</sub> a Asn i es va observar que es recupera el transport acoblat a sodi, mentre que la MelB<sub>KP</sub> nativa només presenta transport actiu acoblat a protó (HAMA i WILSON 1994). Seguint

aquestes evidències, es va incloure el mutant N58C en el nostre treball per estudiar la seva implicació en el lloc d'unió del sodi en el cas de la MelB.

## 5.1 L'Asp 19 no és necessari per la unió del sodi, però sí per a la unió de melibiosa.

Estudis previs de transport de la MelB, havien proposat la implicació de l'Asp19 en la unió del sodi (POOLMAN *et al.* 1996), ja que el mutant D19C no és capaç de transportar activament melibiosa amb cap catió. Per altra banda es va trobat que el doble mutant K18C/D19N recupera el transport de melibiosa amb sodi, encara que no amb protó. Per aquesta raó s'ha proposat la presència d'un pont salí entre la Lys 18 i l'Asp 19 (DING i WILSON 2001a). També és molt possible que la Lys 18 estigui implicada en un pont salí amb algun altre residu i per tant, la manca de transport del mutant K18C sigui degut a un efecte estructural. Però els resultats obtinguts en aquest treball evidencien que el mutant D19C no presenta cap canvi estructural significatiu, tal i com es pot deduir per la absència de canvis en l'espectre d'absorbància en l'amida I i II d'aquest mutant respecte al 3SV. Cal recordar que l'espectre d'absorbància de les amides I i II que són sensibles al canvis d'estructura secundària de la proteïna. A més, el mutant D19C és capaç d'unir sodi, tal com demostren els espectres de diferència induïts pel sodi. Aquestes raons fan poc probable que el requeriment d'aquest residu per conservar el transport de melibiosa sigui només estructural.

L'espectre de diferència d'infraroig induït per sodi és molt semblant en intensitat i forma a l'obtingut per a 3SV. Aquesta semblança ens ha permès concloure que el mutant D19C és capaç d'unir sodi, i que aquesta unió genera canvis en la proteïna molt similars als que es produeixen al 3SV. Així mateix, els estudis de fluorescència d'aquest mutant confirmen els resultats obtinguts pels espectres d'infraroig. A l'analitzar la fluorescència intrínseca dels Trp a l'afegir sodi s'observa una reducció de l'1% de la fluorescència, que és la meitat de l'efecte de sodi observat en el 3SV. Sembla per tant confirmat que aquest residu no és essencial per la unió del sodi.

Un cop vist que l'Asp 19 no contribueix a la unió del sodi, es va mesurar per al D19C l'espectre de diferència induït per melibiosa 50 mM, tant en

presència de sodi com de protó. Els espectres de diferència resultants presenten una intensitat inferior al 5% respecte al 3SV, evidència clara que aquesta mutació dóna un fenotip deficient en la unió de sucre. Al comparar els espectres de diferència induïts per la melibiosa en presència de protó i de sodi no s'observen diferències significatives, es a dir, la capacitat d'unir melibiosa no s'incrementa amb la presència de sodi. Per tant hem de concloure que encara que aquest mutant preserva la unió del sodi (amb els seus canvis conformacionals) la unió de la melibiosa en el D19C és defectuosa. Es probable que l'Asp 19 estigui implicat directament en la unió de la melibiosa.

Els estudis de fluorescència d'aquest mutant confirmen els resultats obtinguts per espectroscòpia infraroig. A l'analitzar la fluorescència intrínseca dels Trp de la MelB s'observa una disminució de la fluorescència del 5% a l'afegir 50 mM melibiosa en presència de protó, mentre al 3SV s'observa un increment del 20%. El canvi de la senyal de fluorescència és oposat al observat al 3SV, suggerint que tot i que podria haver unió del melibiosa al D19C, aquesta duu a canvis estructurals diferents als nadius. A més aquests canvis estructurals també s'haurien d'observar en els espectres d'infraroig. Per tant és molt probable que la interacció que provoca aquest petit canvi de fluorescència sigui superficial i només generi un canvi d'entorn d'algun Trp, però no generi cap canvi estructural important.

Els experiments de fluorescència s'han completat amb l'ús d'un l'anàleg de sucre fluorescent, el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, que presenta alta afinitat per la MelB. Recordem que el màxim d'emissió de fluorescència d'aquest anàleg és molt sensible a la naturalesa de l'entorn, i això permet detectar la seva unió. En el cas del mutant D19C s'observa un senyal reduït que també s'observa en el 3SV, on una petita part del Dns<sup>2</sup>-S-Gal no és desplaçat per la melibiosa. No s'observa cap variació a l'afegir sodi o a l'afegir 150 mM de melibiosa. Tampoc s'observa transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) entre l'anàleg fluorescent i els Trp en el mutant D19C. Segons aquests resultats, el D19C no és capaç d'unir l'anàleg en el lloc d'unió actiu del sucre ni en presència ni en absència de sodi. És possible que aquesta unió, que també s'observa en el 3SV inclús després d'afegir melibiosa 150

mM, es generi per una interacció superficial de l'anàleg amb la MelB. Aquesta interacció no es trobaria en el lloc d'unió actiu, i per tant no competiria amb la unió de melibiosa.

Finalment s'ha utilitzat la reacció amb la sonda fluorescent MIANS per obtenir informació sobre l'accessibilitat de la cisteïna del D19C, i si aquesta accessibilitat és modificada per la interacció amb els substrats. El MIANS és una sonda fluorescent que reacciona selectivament amb els grups tiols, per exemple amb les cisteïnes accessibles de les proteïnes. La seva fluorescència és molt sensible a l'entorn i per tant pot donar informació sobre l'entorn de la cisteïna amb la que ha reaccionat. La reacció del D19C amb MIANS es va realitzar en diverses condicions: sense substrats, en presència de melibiosa, en presència de sodi, i en presència de melibiosa i sodi. En totes les condicions, la reacció és més lenta que en la resta dels mutants estudiants en aquest treball, i no varia en presència dels substrats. L'espectre d'emissió del MIANS al final de la reacció presenta un màxim d'emissió a 421 nm, indicant que l'entorn del residu 19 de la MelB és molt hidrofòbic.

Segons aquest conjunt de resultats, el residu Asp 19 no interacciona ni forma part del lloc d'unió del sodi. En canvi, sí que es troba implicat en la unió del sucre: aquest residu es troba molt probablement interaccionant directament amb el sucre, o bé és un residu necessari per tal que el lloc d'unió del sucre adopti una conformació correcta.

## **5.2 L'Asp 124 no és essencial per a la unió del sodi però és important per l'acoblament entre el transport del sodi i de la melibiosa.**

Degut a la pèrdua del transport de melibiosa del mutant D124C, s'ha proposat que aquest residu forma part del lloc d'unió del sodi. El mutant D124C tot i no realitzar el transport actiu acoblat a catió, presenta una afinitat pels  $\alpha$ -galactòsids similar a la MelB nativa en presència de protó (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993). Mentre el D124E presenta transport dels  $\alpha$ -galactòsids acoblat a sodi, però amb una afinitat pel sodi i per la melibiosa reduïdes (ZANI *et al.* 1994; HASTINGS WILSON i WILSON 1998). Si tenim en compte que la longitud de la cadena lateral de l'aspàrtic és similar a la de la cisteïna, mentre la del glutàmic és més llarga però conserva el grup carboxil. Aquests resultats fan pensar que la longitud de la cadena del residu 124 seria important per la unió del sucre, mentre la presència d'un grup carboxil a la posició 124 seria important per l'acoblament del sodi al transport del sucre. El residu Asp 124 sembla també implicat o molt proper al lloc d'unió del sucre, ja que s'ha proposat un possible pont salí entre l'Asp 124 i la Lys 377. Aquesta lisina es troba en l'hèlix XI, i sembla participar en la unió del sucre (HASTINGS WILSON i WILSON 1998).

La caracterització del mutant es va iniciar per l'espectre de diferència induït pel sodi. Com en el cas del D19C, el D124C també presenta espectre d'infraroig de diferència induït per sodi, i per tant, aquest mutant és capaç d'unir sodi. Tot i això, l'espectre de diferència del D124C és sensiblement diferent a l'espectre del 3SV, tant en la forma de l'espectre (50% de correlació amb el 3SV) com en la seva intensitat (20% respecte al 3SV). Això voldria dir que encara que l'Asp 124 no és imprescindible per a la unió del sodi, la seva presència seria important per assolir la totalitat dels canvis conformacionals associats a la unió del Na<sup>+</sup> en la forma nativa. En els estudis de fluorescència intrínseca dels triptòfans, s'observa una disminució de la fluorescència del D124C al afegir sodi al medi, igual com s'observa en

el 3SV o en el WT. Aquest resultat confirma que el mutant D124C conserva la capacitat d'unir sodi.

A continuació s'analitzà la implicació d'aquest residu en la unió de la melibiosa. Els espectres de diferència induïts per melibiosa en presència de protó i en presència de sodi presenten una intensitat molt baixa, inferior al 5% respecte al 3SV. Per tant, aquest mutant no és capaç d'unir melibiosa de manera eficient. Als estudis de fluorescència intrínseca dels triptòfans no s'observa cap increment de fluorescència a l'afegir melibiosa. Aquests resultats confirmen absència d'unió de melibiosa per aquest mutant.

L'estudi de la unió del sucre mitjançant l'anàleg fluorescent Dns<sup>2</sup>-S-Gal, mostra que aquest mutant interacciona amb el Dns<sup>2</sup>-S-Gal de forma similar al 3SV en presència de Dns<sup>2</sup>-S-Gal i melibiosa 150 mM, i al D19C. Tampoc s'observa l'efecte del sodi en la fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal unit, ni el seu desplaçament a l'afegir un excés de melibiosa, comportament igual al del D19C. Sembla que aquest mutant és capaç d'unir Dns<sup>2</sup>-S-Gal de manera no competitiva amb la melibiosa. Ja que, una vegada unit el Dns<sup>2</sup>-S-Gal no és capaç de realitzar FRET amb els Trp de la MelB, aquesta interacció no es troba en el lloc d'unió funcional de la melibiosa.

Per últim es va realitzar la reacció amb MIANS per estudiar l'entorn i accessibilitat de la Cys 124. En aquest cas la reacció és molt més ràpida que la observada en el cas del mutant D19C. Per tant aquest residu presenta una accessibilitat relativament alta. El màxim del pic d'emissió sofreix un desplaçament a longituds menors al realitzar la reacció en presència de sodi, indicant un ambient més hidrofòbic en presència de sodi.

Segons aquests resultats, el residu Asp 124 no és essencial per la unió del sodi, tot i que és necessari per assolir tots els canvis conformacionals que genera el sodi a l'unir-se a la MelB. En canvi sí que és essencial per la unió de la melibiosa. Per tant aquest residu sembla estar implicat en la unió del sucre, i en l'acoblament del catió al transport del sucre. Segurament està implicat en els canvis conformacionals necessaris tant per la unió del sucre com pel transport acoblat a catió.

### 5.3 Els Asp 55 i 59 són essencials per la unió del sodi.

Estudis previs d'aquests residus han demostrat que els mutants D55C i D59C no presenten transport acoblat a sodi. En canvi el mutant D55C sí que presenta transport acoblat a protó, alhora que el mutant D59C presenta transport de melibiosa sense acoblament, és a dir, a favor de gradient (transport passiu). Aquests mutants presenten una afinitat pels  $\alpha$ -galactòsids semblant al WT, i una baixa afinitat pels  $\beta$ -galactòsids, indicant que aquest residus són més important per la unió dels  $\beta$ -galactòsids que pels  $\alpha$ -galactòsids (POURCHER *et al.* 1991; ZANI *et al.* 1993). Les mutacions d'aquests residus a Glu presenten una afinitat molt baixa pel sodi, i l'afinitat pel sucre també es troba reduïda (ZANI *et al.* 1994). En estudis previs s'ha proposat que l'Asp 59 forma un pont salí amb la Lys 377 (FRANCO *et al.* 2001). Aquest pont salí seria important per l'acoblament entre el catió i el sucre (FRANCO *et al.* 2001).

Per comprovar la possible implicació dels Asp 55 i 59 en la unió del sodi es van mesurar els espectres de diferència d'IR induïts pel sodi. Els espectres de diferència resultants no mostren cap senyal, tot i que es va arribar a augmentar la concentració de sodi fins a 50 mM per descartar un problema d'afinitat reduïda. Els estudis per espectroscòpia de fluorescència tampoc mostren cap efecte del sodi en aquests mutants, ni en presència ni en absència de melibiosa. Per tant, podem concloure que aquests dos aspàrtics estan interaccionant directament amb el sodi i són essencials per a la unió del catió, ja que la mutació de qualsevol d'ells elimina totalment la capacitat d'unir sodi.

Per analitzar la possible implicació d'aquests residus en la unió de la melibiosa, es van obtenir espectres de diferència induïts per la melibiosa. En presència de protó es va obtenir un senyal que, en el cas del mutant D55C presenta una intensitat del 72% respecte el 3SV. Al comparar la forma dels espectres de diferència d'aquest mutant amb el 3SV s'observa una gran similitud (correlació del 70%). El mutant D59C també presenta espectre de diferència induït per melibiosa en presència de protó amb una similitud



amb el 3SV semblant a la del D55C, però amb una intensitat menor que el 3SV (intensitat del 30%). Aquesta disminució de la intensitat pot ser deguda a la pèrdua d'acoblament amb el protó. Cal recordar que en el cas del 3SV, l'acoblament amb sodi produeix una augment important de la intensitat de l'espectre de diferència induït per la melibiosa (2,5 cops més intens l'espectre amb sodi que amb protó). Així mateix, és possible que l'acoblament del protó amb la melibiosa també contribueixi a la intensitat de l'espectre de diferència, encara que aquesta contribució no és possible d'avaluar per al 3SV per la presència inevitable de protons en el medi. En el cas del mutant D55C es manté l'acoblament amb protó, i per tant és normal que presenti una intensitat similar a l'espectre de diferència del 3SV amb melibiosa-protó. Mentre que per al mutant D59C, que perd l'acoblament de la melibiosa amb protó (ZANI *et al.* 1993), no es estrany observar una intensitat reduïda.

Al realitzar els espectres de diferència induïts per la melibiosa en presència de sodi pels dos mutants, s'observa que presenten un espectre similar als espectres de diferència en presència de protó, tant en intensitat com en forma. No s'observa cap efecte del sodi en aquests espectres induïts per la melibiosa, com era d'esperar per la seva incapacitat d'unir sodi. Segons els resultats obtinguts, combinats amb estudis previs, podem concloure que el D55C uneix melibiosa en presència de protó, estant d'acord amb el fet que aquest mutant transporta melibiosa acoblada a protó però no a sodi. Per altra banda, el D59C uneix la melibiosa amb una afinitat molt reduïda, d'acord també amb el fet que transporta melibiosa sense acoblament a cap catió (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993).

En l'estudi d'aquests mutants per fluorescència intrínseca dels Trp no s'observa l'efecte de la melibiosa. El mutant D55C no mostra cap increment de la fluorescència a l'afegir melibiosa (50 mM). En canvi el mutant D59C presenta un petit increment de la fluorescència del 2% (recordem que per al 3SV hi ha un augment del 20% en la fluorescència a l'afegir melibiosa 50 mM en absència de sodi). Hem de concloure que aquests dos mutants presenten unió de melibiosa amb canvis conformacionals que no afecten a l'ambient dels triptòfans, i que per tant no canvien la seva fluorescència.

L'estudi del residu Asp 59 es va complementar amb la caracterització del mutant D59E. S'ha descrit que aquest mutant manté el transport acoblat a sodi, encara que presenta una afinitat pel catió molt reduïda (ZANI *et al.* 1994).

En els nostres estudis, l'espectre de diferència induït pel sodi per al D59E no va donar cap senyal. Per tant la substitució de l'Asp 59 per Glu no conserva la unió del sodi, o podria causar una forta disminució de l'afinitat del lloc d'unió pel sodi. Al mesurar l'espectre de diferència induït per la melibiosa aquest mutant no presenta quasi senyal, ni amb protó ni amb sodi. Sembla que la substitució del Asp59 per Glu té com a efecte secundari la pèrdua del lloc d'unió de la melibiosa. S'ha descrit que l'Asp 59 forma un pont salí amb la Lys 377 (FRANCO *et al.* 2001) i podria ser que la mutació D59E provoqués alguna distorsió a causa de la diferència de mida del Asp i Glu, impeding la formació d'aquest pont i desestabilitzant la unió de la melibiosa. Això també explicaria perquè l'afinitat pel sucre del mutant D59C és similar al WT, però el D59E presenta una afinitat reduïda, segons estudis previs (ZANI *et al.* 1994).

Els estudis de fluorescència dels mutants de D59C, D59E i D55C realitzats mitjançant l'anàleg de sucre Dns<sup>2</sup>-S-Gal mostren una interacció amb el Dns<sup>2</sup>-S-Gal similar als mutants anteriors i al 3SV en excés de melibiosa, és a dir, aquests mutants no són capaços d'unir Dns<sup>2</sup>-S-Gal en el lloc d'unió funcional de la melibiosa. S'ha descrit que l'Asp 55 i l'Asp 59 són importants per la unió dels  $\beta$ -galactòsids, als que pertany el Dns<sup>2</sup>-S-Gal (POURCHER *et al.* 1993; ZANI *et al.* 1993). Per tant, la quasi absència de senyal en l'espectre de fluorescència per la unió del Dns<sup>2</sup>-S-Gal confirmaria la seva implicació en la unió dels  $\beta$ -galactòsids. Això pot indicar que els  $\beta$ -galactòsids presenten una unió diferent als  $\alpha$ -galactòsids com la melibiosa, on l'hèlix II presenti un paper important en aquesta unió

Per últim, es va realitzar l'estudi dels mutants mitjançant la reacció del MIANS amb les cisteïnes de cada mutant. En aquest estudi es va observar que el mutant D55C presenta una reacció ràpida amb el MIANS i una senyal de fluorescència molt intensa. Això ens indica una elevada accessibilitat del residu i un ambient molt hidrofòbic. El residu Cys59 del

D59C presenta una reacció molt lenta, encara que no tant lenta com la Cys19 del mutant D19C. Si observem el màxim d'emissió del MIANS reaccionat amb aquest mutants, es troba a longituds d'ona baixos, indicant que en els dos casos presenten un entorn molt hidrofòbic.

Segons aquest resultat, podem concloure que els Asp 59 i 55 formen part del lloc d'unió del sodi. Tot i així, el residu Asp 59 sembla estar també molt proper o implicat en la unió del sucre, ja que el mutant D59E no és capaç d'unir la melibiosa. A més, en aquests mutants no s'observa efecte del sucre en la fluorescència del Trp, però sí en els espectres de diferència d'infraroig. Això, indica la proximitat dels residus al lloc d'unió al sucre. També sembla que aquests residus es troben implicats en la unió dels  $\beta$ -galactòsids, ja que els mutants D55C i D59C poden unir melibiosa però no Dns<sup>2</sup>-S-Gal.

## 5.4 L'Asn 58 és essencial per la unió del sodi

La MelB de *Klebsiella pneumoniae* no és capaç de transportar melibiosa utilitzant el gradient electroquímic del sodi (només pot utilitzar protó), però sí quan l'Ala58 es muta a Asn (HAMA i WILSON 1993). Aquests resultats semblen indicar que en la MelB d'*E. Coli* l'Asn 58 estaria implicada en el lloc d'unió del sodi. A més, aquest residu es troba molt proper en seqüència als Asp 55 i 59, que ja hem confirmat que formen part del lloc d'unió del sodi. En estudis previs es van realitzar la substitució de l'Asn58 a Ala, Leu, Ser, Gln (FRANCO i WILSON 1996). En tots els casos l'afinitat del sodi es va trobar reduïda. S'observa transport acoblat a protó en les substitucions neutres, però en canvi les substitucions polars mantenen transport acoblat a sodi, encara que molt reduït. També és interessant que en aquest estudi no s'observa transport de  $\beta$ -galactòsids en cap mutant (FRANCO i WILSON 1996). Per tant, aquest residu no només pot formar part del lloc d'unió del catió, sinó que també pot intervenir en la unió del sucre.

Per totes les raons exposades ens va semblar important estudiar espectroscòpicament la implicació de l'Asn58 en la unió del sodi i del sucre. Es va estudiar el mutant N58C per espectroscòpia d'infraroig de diferència induït pel sodi, sense obtenir cap senyal de diferència ni amb sodi 10 mM ni amb sodi 50 mM. En l'estudi de la fluorescència intrínseca dels Trp tampoc s'observa cap efecte del sodi. Per tant, aquest mutant no és capaç d'unir sodi, i podem concloure que l'Asn 58 forma part del lloc d'unió del sodi junt amb els Asp 55 i 59.

Després es van mesurar els espectres de diferència induïts per melibiosa, tant en presència de protó com de sodi. Els espectres de diferència en ambdós casos van ser molt petits (intensitat menor al 10% respecte al 3SV). Tot i així, l'espectre de diferència de melibiosa-protó presenta una semblança amb l'espectre del 3SV que és petita però apreciable (25%). És possible que hi hagi un mínim d'unió de melibiosa amb protó, llindant la detectabilitat per l'IR. A l'analitzar l'espectre de diferència induït per melibiosa amb sodi s'observa que aquest espectre és semblant al que s'obté

amb protó, en coherència amb la manca d'espectre de diferència induït per sodi sol. A més, en l'estudi de la fluorescència intrínseca dels Trp no s'observa cap efecte de la melibiosa ni en presència ni en absència de sodi. Tot això sembla indicar que el mutant N58C presenta una pèrdua important de la unió de la melibiosa. Sembla que aquest residu no només és important per la unió del catió, sinó també per la interacció amb el sucre.

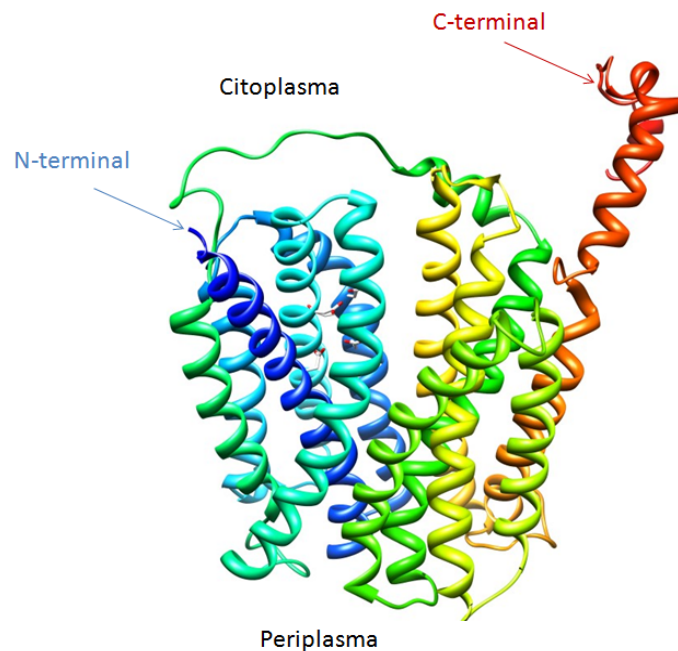
A continuació es va realitzar l'estudi de fluorescència del Dns<sup>2</sup>-S-Gal, que va mostrar una senyal de fluorescència semblant a la fluorescència de la interacció no competitiva del Dns<sup>2</sup>-S-Gal amb el 3SV. Aquest senyal no augmenta en presència de sodi, i el sucre fluorescent interaccionant no pot ser desplaçat per la melibiosa 150 mM. A més no s'observa FRET entre el Dns<sup>2</sup>-S-Gal i els Trp. Per tant tot i que aquest mutant sembla capaç d'unir el Dns<sup>2</sup>-S-Gal, aquesta interacció no competeix amb la melibiosa.

Per últim es va realitzar la reacció amb MIANS, per obtenir informació de l'entorn del residu. En aquest cas la reacció amb el MIANS és molt ràpida, tal com es pot deduir pel ràpid increment de fluorescència, i per tant el residu és accessible. La intensitat de la fluorescència del MIANS reaccionat és prou alta, encara que no tant com la de la Cys55 del mutant D55C. Si mirem els espectres d'emissió al finalitzar la reacció, s'observa que la Cys58 es troba en un entorn menys hidrofòbic que els residus estudiats prèviament, amb un màxim d'emissió a 433 nm.

Segons tots aquests resultats, podem dir que aquest residu està implicat en la unió de sodi. També està implicat en la unió del sucre o la interacció del lloc del catió i del sucre, ja que el mutant N58C no és capaç d'unir la melibiosa de manera eficient. Aquest residu Asn58 és accessible i es troba en un ambient més polar que l'Asp 59 o l'Asp55.

## 5.5 Model del lloc de unió del catió

La modelització molecular per obtenir la predicció de l'estructura de les proteïnes ha avançat molt en els darrers anys (FLEISHMAN *et al.* 2006; ZHANG 2008b, 2009). Aquests models junt amb els estudis experimentals com l'espectroscòpia d'infraroig o de fluorescència poden complementar-se per estudiar les estructures de les proteïnes.

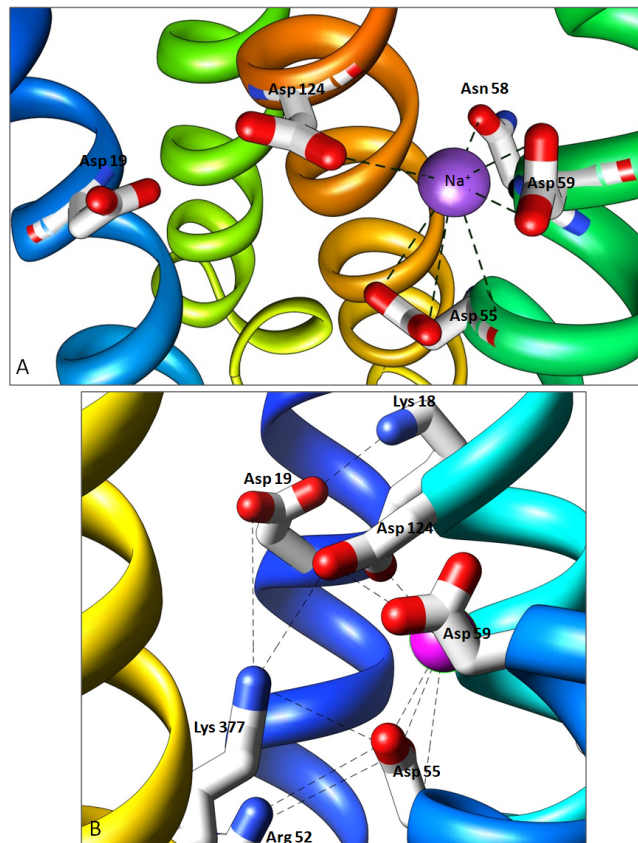


**Figura 5.1** Model de la MelB realitzat per I-TASSER. Aquest model prediu 12 hèlix transmembrana i l'extrem N i C-terminal cap al mateix costat que s'ha descrit que és el citoplasmàtic (HACKSELL *et al.* 2002). Les Hèlixs blaves pertanyen a l'extrem N-terminal on s'uneix el catió, mentre les verdes i vermelles pertanyen a l'extrem C-terminal on s'uneix el sucre.

S'ha utilitzat el servidor I-TASSER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>) per realitzar una predicció de la estructura atòmica de la MelB. Aquest servidor realitza una predicció basant-se en l'estructura d'altres proteïnes, l'estat de menor energia, i els impediments estèrics entre d'altres paràmetres (ZHANG 2008a). Utilitza sistemes de modelització molecular per obtenir a partir de la seqüència de la proteïna les 5 estructures que considera més probables. En la figura 5.1 es pot veure una de les

estructures predites per aquest servidor, la que s'ajusta millor als estudis previs realitzats per mutagènesi dirigida, i les conclusions obtinguts en aquest treball.

En figura 5.2A, ampliem la imatge del model per veure la zona d'unió del catió i la posició dels residus estudiats en aquest treball. El primer que es pot observar és que el residu Asp 19 és el més allunyat dels residus implicats en la unió del sodi. Això concorda amb els resultats obtinguts, on s'ha vist que l'Asp 19 no és necessari per unir el sodi, encara que podria estar implicat en la interacció del lloc del catió amb el lloc del sucre. D'acord amb els nostres resultats, els Asp 55 i 59 i l'Asn 58 serien els lligands principals del sodi, conclusió que és coherent amb el model.



**Figura 5.2** **A:** Model del lloc de unió del catió, **B:** Model on s'observa la proximitat de l'Asp 124 i l'Asp 19 a la Lys 377 que forma part del lloc d'unió del sucre. Models obtinguts pel servidor I-TASSER

Segons els resultats experimentals obtinguts, l'Asp 124 està implicat en la unió del sodi, encara que el sodi és capaç d'unir-se en el mutant D124C. A més a més, sembla estar implicat en la interacció del lloc del catió i del sucre (figura 5.2B). Segons els nostres resultats tant experimentals com pel model, l'Asp 124 estaria implicat en la interacció del lloc del sucre i el lloc del catió, mentre l'Asp19 estaria implicat només en la unió del sucre. Una hipòtesi atractiva consisteix en atorgar a l'Asp 124 el paper fonamental en el mecanisme d'acoblament entre el transport de sodi i de melibiosa. Així, el canvi conformacional induït per la unió del sodi podria estar produït per la interacció de l'Asp 124 amb el sodi, una vegada que aquest s'ha unit al lloc format pels residus 55, 58 i 59. Això explicaria que el D124C uneix sodi, però amb uns canvis conformacionals reduïts en comparació amb el 3SV. Per altra banda, podem observar també que el model prediu la proximitat de la Lys 377 a l'Asp 124 i també a l'Asp19, d'acord amb resultats previs (HASTINGS WILSON i WILSON 1998; DING i WILSON 2001b).

Segons els resultats obtinguts podem concloure que el lloc d'unió del catió està format pels Asp 55, Asp 59 i l'Asn 58. Estudis realitzats amb èters corona indiquen que el sodi necessita 5 àtoms d'oxigen per formar el clúster de coordinació, mentre l'hidroni ( $\text{H}_3\text{O}^+$  que és la forma del protó en solució) només en necessita 3 (BEHR *et al.* 1982; HILGENFELD i SAENGER 1982). Per aquesta raó la mutació d'algun dels residus encara permet la unió del protó, però no la unió del sodi. També s'ha demostrat la interacció del lloc del sucre i el catió i la seva proximitat. Alguns dels residus Asp que formen el lloc del catió, també interaccionen amb residus del lloc del sucre.



Conclusions

## 6 Conclusions

**1.** El mutant D19C uneix sodi amb un comportament similar a la forma nativa. Per tant, l'Asp 19 no és essencial ni important per a la unió del sodi a la MelB.

**2.** El mutant D124C uneix sodi, però els canvis conformacionals induïts per la seva unió són menors dels observats en la proteïna nativa. Encara que l'Asp 124 està implicat en la unió del sodi, no és un residu essencial per aquesta. És molt possiblement un residu responsable dels canvis conformacionals associats a la unió de sodi que duen a un augment de l'afinitat pel sucre en la forma nativa.

**3.** Els mutants D55C, D59C, D59E i N58C no uneixen sodi. Per tant, els Asp 55, Asp 59 i Asn 58 són part essencial del lloc d'unió del sodi i en l'efecte del catió que provoca l'augment de l'afinitat del sucre.

**4.** Els mutants D19C i D124C no poden unir melibiosa eficientment ni en presència de protó ni en presència de sodi. Degut a que els mutants D19C i D124C són capaços d'unir sodi, sembla que aquests mutants no poden realitzar algun canvi conformacional posterior a la unió del catió que impedeix la correcta unió del sucre.

**5.** Els mutants D55C i D59C poden unir melibiosa en presència de protó, però no s'observa cap efecte del sodi en l'afinitat de la melibiosa. En canvi el mutant D59E no és capaç d'unir melibiosa ni en presència de protó ni de sodi. L'Asp 59 es troba molt proper o implicat en la unió del sucre.

**6.** El mutant N58C no és capaç d'unir melibiosa en presència o absència de sodi. L'Asn 58 no només es troba implicada en la unió del sodi, sinó que també intervé directa o indirectament en la unió del sucre.

**7.** Per als mutants D19C, D55C, N58C, D59C, D59E i D124C, tot i que poden interaccionar dèbilment amb el dansil- $\beta$ -galactòsid, no

s'observa l'efecte del sodi en la fluorescència d'aquest i no pot ser desplaçat per la melibiosa. La interacció del dansil- $\beta$ -galactòsid amb els mutants no es produeix en el lloc actiu del sucre en la MelB.

**8.** El residus Asp 19 i Asp 59 són els menys accessibles de tots a la sonda fluorescent MIANS, i presenten un entorn hidrofòbic. Els residus Asp 55 i Asp 124 són molt accessibles segons els resultats obtinguts de la reacció del MIANS amb els mutants D55C i D124C.. L'Asp 55 es troba també en un entorn hidrofòbic. L'Asp 124 es troba en un entorn hidrofòbic en presència de sodi igual que els residus Asp 19, 59 i 55, mentre en absència es troba en un entorn menys hidrofòbic. El residu Asn 58 és molt accessible i presenta un entorn menys hidrofòbic que la resta.

## Referències

## 7 Referències

### A

- ABDEL-DAYEM, M., C. BASQUIN, T. POURCHER, E. CORDAT i G. LEBLANC (2003). "Cytoplasmic loop connecting helices IV and V of the melibiose permease from *Escherichia coli* is involved in the process of Na<sup>+</sup>-coupled sugar translocation." J Biol Chem **278**(3): 1518-24.
- ABRAMSON, J., I. SMIRNOVA, V. KASHO, G. VERNER, H. R. KABACK i S. IWATA (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." Science **301**(5633): 610-5.
- ALVAREZ, J., D. C. LEE, S. A. BALDWIN i D. CHAPMAN (1987). "Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter." J Biol Chem **262**(8): 3502-9.
- AMBROISE, Y., G. LEBLANC i B. ROUSSEAU (2000). "Active-site-directed photolabeling of the melibiose permease of *Escherichia coli*." Biochemistry **39**(6): 1338-45.
- ARKIN, I. T., W. P. RUSS, M. LEBENDIKER i S. SCHULDINER (1996). "Determining the secondary structure and orientation of EmrE, a multi-drug transporter, indicates a transmembrane four-helix bundle." Biochemistry **35**(22): 7233-8.
- ARRONDO, J. L. i F. M. GOÑI (1999). "Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy." Prog Biophys Mol Biol **72**(4): 367-405.

### B

- BAENZIGER, J. E. i J. P. CHEW (1997). "Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor mainly involves a structural change in solvent-accessible regions of the polypeptide backbone." Biochemistry **36**(12): 3617-24.
- BARTH, A. (2000). "The infrared absorption of amino acid side chains." Prog Biophys Mol Biol **74**(3-5): 141-73.
- BARTH, A. i C. ZSCHERP (2000). "Substrate binding and enzyme function investigated by infrared spectroscopy." FEBS Lett **477**(3): 151-6.
- BARTH, A. i C. ZSCHERP (2002). "What vibrations tell us about proteins." Q Rev Biophys **35**(4): 369-430.

- BASSILANA, M., T. POURCHERiG. LEBLANC (1987). "Facilitated diffusion properties of melibiose permease in Escherichia coli membrane vesicles. Release of co-substrates is rate limiting for permease cycling." J Biol Chem **262**(35): 16865-70.
- BASSILANA, M., T. POURCHERiG. LEBLANC (1988). "Melibiose permease of Escherichia coli. Characteristics of co-substrates release during facilitated diffusion reactions." J Biol Chem **263**(20): 9663-7.
- BEHR, J. P., J. M. LEHN, A. C. DOCKiD. MORAS (1982). "Crystal structure of a polyfunctional macrocyclic K<sup>+</sup> complex provides a solid-state model of a K<sup>+</sup> channel." Nature **295**(5849): 526-7.
- BOTFIELD, M. C., K. NAGUCHI, T. TSUCHIYAiT. H. WILSON (1992). "Membrane topology of the melibiose carrier of Escherichia coli." J Biol Chem **267**(3): 1818-22.
- BOTFIELD, M. C.iT. H. WILSON (1988). "Mutations that simultaneously alter both sugar and cation specificity in the melibiose carrier of Escherichia coli." J Biol Chem **263**(26): 12909-15.
- BOTFIELD, M. C.iT. H. WILSON (1989). "Peptide-specific antibody for the melibiose carrier of Escherichia coli localizes the carboxyl terminus to the cytoplasmic face of the membrane." J Biol Chem **264**(20): 11649-52.

## C

- CABIAUX, V., K. A. OBERG, P. PANCOSKA, T. WALZ, P. AGREiA. ENGEL (1997). "Secondary structures comparison of aquaporin-1 and bacteriorhodopsin: a Fourier transform infrared spectroscopy study of two-dimensional membrane crystals." Biophys J **73**(1): 406-17.
- CLARK, A. H., D. H. SAUNDERSONiA. SUGGETT (1981). "Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels." Int J Pept Protein Res **17**(3): 353-64.
- CORDAT, E., G. LEBLANCiI. MUS-VETEAU (2000). "Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of Escherichia coli melibiose permease." Biochemistry **39**(15): 4493-9.
- CORDAT, E., I. MUS-VETEAUiG. LEBLANC (1998). "Structural studies of the melibiose permease of Escherichia coli by fluorescence resonance energy transfer. II. Identification of the tryptophan residues acting as energy donors." J Biol Chem **273**(50): 33198-202.

## D

- DAMIANO-FORANO, E., M. BASSILANA, *et al.* (1986). "Sugar Binding Properties of DAMIANO-FORANO, E., M. BASSILANA i G. LEBLANC (1986). "Sugar binding properties of the melibiose permease in Escherichia coli membrane vesicles. Effects of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> concentrations." J Biol Chem **261**(15): 6893-9.
- DAVE, N., V. A. LÓRENZ-FONFRÍA, J. VILLAVERDE, R. LEMONNIER, G. LEBLANC i E. PADRÓS (2002). "Study of amide-proton exchange of Escherichia coli melibiose permease by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: evidence of structure modulation by substrate binding." J Biol Chem **277**(5): 3380-7.
- DAVE, N., A. TROULLIER, I. MUS-VETEAU, M. DUNACH, G. LEBLANC i E. PADRÓS (2000). "Secondary structure components and properties of the melibiose permease from Escherichia coli: a fourier transform infrared spectroscopy analysis." Biophys J **79**(2): 747-55.
- DEGRIP, W. J., D. GRAY, J. GILLESPIE, P. H. BOVEE, E. M. VAN DEN BERG, J. LUGTENBURG i K. J. ROTHSCHILD (1988). "Photoexcitation of rhodopsin: conformation changes in the chromophore, protein and associated lipids as determined by FTIR difference spectroscopy." Photochem Photobiol **48**(4): 497-504.
- DING, P. Z. (2003). "An investigation of cysteine mutants on the cytoplasmic loop X/XI in the melibiose transporter of Escherichia coli by using thiol reagents: implication of structural conservation of charged residues." Biochem Biophys Res Commun **307**(4): 864-9.
- DING, P. Z. (2004). "Loop X/XI, the largest cytoplasmic loop in the membrane-bound melibiose carrier of Escherichia coli, is a functional re-entrant loop." Biochim Biophys Acta **1660**(1-2): 106-17.
- DING, P. Z., M. C. BOTFIELD i T. H. WILSON (2000). "Sugar recognition mutants of the melibiose carrier of Escherichia coli: possible structural information concerning the arrangement of membrane-bound helices and sugar/cation recognition site." Biochim Biophys Acta **1509**(1-2): 123-30.
- DING, P. Z., A. C. WEISSBORN i T. H. WILSON (2001). "Cysteine substitutions for individual residues in helix VI of the melibiose carrier of Escherichia coli." J Membr Biol **183**(1): 33-8.
- DING, P. Z. i T. H. WILSON (2000). "Physiological evidence for an interaction between helix XI and helices I, II, and V in the melibiose carrier of Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun **268**(2): 409-13.

- DING, P. Z.iT. H. WILSON (2001a). "Cysteine mutagenesis of the amino acid residues of transmembrane helix I in the melibiose carrier of *Escherichia coli*." Biochemistry **40**(18): 5506-10.
- DING, P. Z.iT. H. WILSON (2001b). "The effect of modifications of the charged residues in the transmembrane helices on the transport activity of the melibiose carrier of *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **285**(2): 348-54.
- DING, P. Z.iT. H. WILSON (2001c). "The proximity between helix I and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli* as determined by cross-linking." Biochim Biophys Acta **1514**(2): 230-8.

## F

- FLEISHMAN, S. J., V. M. UNGERiN. BEN-TAL (2006). "Transmembrane protein structures without X-rays." Trends Biochem Sci **31**(2): 106-13.
- FRANCO, P. J., A. B. JENAiT. H. WILSON (2001). "Physiological evidence for an interaction between helices II and XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1510**(1-2): 231-42.
- FRANCO, P. J.iT. H. WILSON (1996). "Alteration of Na(+)-coupled transport in site-directed mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1282**(2): 240-8.
- FRANCO, P. J.iT. H. WILSON (1999). "Arg-52 in the melibiose carrier of *Escherichia coli* is important for cation-coupled sugar transport and participates in an intrahelical salt bridge." J Bacteriol **181**(20): 6377-86.

## G

- GANEA, C., T. POURCHER, G. LEBLANCiK. FENDLER (2001). "Evidence for intraprotein charge transfer during the transport activity of the melibiose permease from *Escherichia coli*." Biochemistry **40**(45): 13744-52.
- GLUSKER, J. P. (1991). "Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins." Adv Protein Chem **42**: 1-76.
- GOORMAGHTIGH, E., V. CABIAUXiJ. M. RUYSSCHAERT (1994). "Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures." Subcell Biochem **23**: 405-50.



- GOORMAGHTIGH, E., V. RAUSSENSI, J. M. RUYSSCHAERT (1999). "Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes." Biochim Biophys Acta **1422**(2): 105-85.
- GOSWITZ, V. C., R. J. BROOKER (1995). "Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily." Protein Sci **4**(3): 534-7.
- GUAN, L., O. MIRZA, G. VERNER, S. IWATAI, H. R. KABACK (2007). "Structural determination of wild-type lactose permease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15294-8.
- GUPTA, S. S., L. K. LANE (1979). "Reaction of purified (Na,K)-ATPase with the fluorescent sulfhydryl probe 2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene 6-sulfonic acid. Characterization and the effects of ligands." J Biol Chem **254**(20): 10362-9.
- GWIZDEK, C., G. LEBLANC, M. BASSILANA (1997). "Proteolytic mapping and substrate protection of the Escherichia coli melibiose permease." Biochemistry **36**(28): 8522-9.

## H

- HACKSELL, I., J. L. RIGAUD, P. PURHONEN, T. POURCHER, H. HEBERT, G. LEBLANC (2002). "Projection structure at 8 Å resolution of the melibiose permease, an Na-sugar co-transporter from Escherichia coli." Embo J **21**(14): 3569-74.
- HAMA, H., T. H. WILSON (1993). "Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. The amino-terminal portion is crucial for Na<sup>+</sup> recognition in melibiose transport." J Biol Chem **268**(14): 10060-5.
- HAMA, H., T. H. WILSON (1994). "Replacement of alanine 58 by asparagine enables the melibiose carrier of Klebsiella pneumoniae to couple sugar transport to Na<sup>+</sup>." J Biol Chem **269**(2): 1063-7.
- HANAHAN, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- HARDING, M. M. (2004). "The architecture of metal coordination groups in proteins." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 5): 849-59.
- HASTINGS, WILSON, T., D. M. WILSON (1998). "Evidence for a close association between helix IV and helix XI in the melibiose carrier of Escherichia coli." Biochim Biophys Acta **1374**(1-2): 77-82.
- HENDERSON, P. J. (1993). "The 12-transmembrane helix transporters." Curr. Opin. Cell. Biol. **5**: 708-21.

- HEYMANN, J. A., R. SARKER, T. HIRAI, D. SHI, J. L. MILNE, P. C. MALONEYiS. SUBRAMANIAM (2001). "Projection structure and molecular architecture of OxIT, a bacterial membrane transporter." Embo J **20**(16): 4408-13.
- HILGENFELD, R.iW. SAENGER (1982). "Structural chemistry of natural and synthetic ionophores and their complexes with cations." Top Curr Chem **101**: 1-82.
- HIRAI, T.iS. SUBRAMANIAM (2004). "Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter OxIT." Biophys J **87**(5): 3600-7.
- HOGLAND, R. P.iG. JAY (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Eugene, OR, USA, Molecular Probes
- HONIG, B. H.iW. L. HUBBELL (1984). "Stability of "salt bridges" in membrane proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(17): 5412-6.
- HUANG, Y., M. J. LEMIEUX, J. SONG, M. AUERiD. N. WANG (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*." Science **301**(5633): 616-20.
- HUNTE, C., E. SCREPANTI, M. VENTURI, A. RIMON, E. PADANIiH. MICHEL (2005). "Structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH." Nature **435**(7046): 1197-202.

## J

- JACKSON, M.iH. H. MANTSCH (1995). "The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure." Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(2): 95-120.

## K

- KAHN, N., I. MANDEL, J. LICKING, A. WASSERMANiD. MOREA (1969). "Comparison of the effects of parasympathetic nervous stimulation on cat submaxillary gland saliva." Proc Soc Exp Biol Med **130**(1): 314-8.
- KAUPPINEN, J., D. MOFFATT, D. CAMERONiH. MANTSCH (1981a). "Noise in Fourier self-deconvolution." Appl. Opt. **20**: 1866--1879.
- KAUPPINEN, J. K., D. J. MOFFATT, H. H. MANTSCHiD. G. CAMERON (1981b). "Fourier-Transforms in the Computation of Self-Deconvoluted and 1st-Order Derivative Spectra of Overlapped Band Contours." Analytical Chemistry **53**: 1454-1457.
- KAUPPINEN, J. K., D. J. MOFFATT, H. H. MANTSCHiD. G. CAMERON (1981c). "Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands." Applied Spectroscopy **35**(15): 255-334.

KRIMM, S.iJ. BANDEKAR (1986). "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins." Adv Protein Chem **38**: 181-364.

## L

LARRABEE, J. A.iS. CHOI (1993). "Fourier transform infrared spectroscopy." Methods Enzymol **226**: 289-305.

LE COUTRE, J., L. R. NARASIMHAN, C. K. PATELiH. R. KABACK (1997). "The lipid bilayer determines helical tilt angle and function in lactose permease of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10167-71.

LEÓN, X. (2006). Estudi dels canvis estructurals de la permeasa de melibiosa d'Escherichia coli induïts per la unió dels substrats. Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona.

LEÓN, X., R. LEMONNIER, G. LEBLANCiE. PADRÓS (2006). "Changes in secondary structures and acidic side chains of melibiose permease upon cosubstrates binding." Biophys J **91**(12): 4440-9.

LEÓN, X., V. A. LÓRENZ-FONFRÍA, R. LEMONNIER, G. LEBLANCiE. PADRÓS (2005). "Substrate-induced conformational changes of melibiose permease from Escherichia coli studied by infrared difference spectroscopy." Biochemistry **44**(9): 3506-14.

LOCHER, K. P., R. B. BASSiD. C. REES (2003). "Structural biology. Breaching the barrier." Science **301**(5633): 603-4.

LÓRENZ-FONFRÍA, V. A., AND PADRÓS, E. (2005). "Maximum entropy deconvolution of infrared spectra: Use of a novel entropy expression without sign restriction." Applied Spectroscopy **59**: 474-486.

LÓRENZ-FONFRÍA, V. A., J. VILLAVERDE, V. TREZEGUET, G. J. LAUQUIN, G. BRANDOLINiE. PADRÓS (2003). "Structural and functional implications of the instability of the ADP/ATP transporter purified from mitochondria as revealed by FTIR spectroscopy." Biophys J **85**(1): 255-66.

LÓRENZ, V. A., J. VILLAVERDE, V. TREZEGUET, G. J. LAUQUIN, G. BRANDOLINiE. PADROS (2001). "The secondary structure of the inhibited mitochondrial ADP/ATP transporter from yeast analyzed by FTIR spectroscopy." Biochemistry **40**(30): 8821-33.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARRiR. J. RANDALL (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

M

- MAEHREL, C., E. CORDAT, I. MUS-VETEAU i G. LEBLANC (1998). "Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer. I. Evidence for ion-induced conformational change." J Biol Chem **273**(50): 33192-7.
- MANDEL, H. G., S. R. TRIESTER i D. SZAPARY (1970). "Interference of barbiturates with pyrimidine incorporation. 3. Studies on the mechanism of the amobarbital-ototate relationship." Biochem Pharmacol **19**(6): 1879-92.
- MANTELE, W. (1993). "Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms." Trends Biochem Sci **18**(6): 197-202.
- MARSH, D. (1999). "Quantitation of secondary structure in ATR infrared spectroscopy." Biophys J **77**(5): 2630-7.
- MATSUZAKI, S., A. C. WEISSBORN, E. TAMAI, T. TSUCHIYAI i T. H. WILSON (1999). "Melibiose carrier of *Escherichia coli*: use of cysteine mutagenesis to identify the amino acids on the hydrophilic face of transmembrane helix 2." Biochim Biophys Acta **1420**(1-2): 63-72.
- MEYER-LIPP, K. (2005). Time-Resolved Measurements of Sugar-Binding-Induced Conformational Changes in the Melibiose Permease from *Escherichia coli*. Chemische und pharmazeutische Wissenschaften / École Doctorale des Sciences. Frankfurt am Main / Nice, Johann Wolfgang Goethe-Universität / Université de Nice Sophia-Antipolis. **Docteur**.
- MEYER-LIPP, K., C. GANEA, T. POURCHER, G. LEBLANC i K. FENDLER (2004). "Sugar binding induced charge translocation in the melibiose permease from *Escherichia coli*." Biochemistry **43**(39): 12606-13.
- MEYER-LIPP, K., N. SERY, C. GANEA, C. BASQUIN, K. FENDLER i G. LEBLANC (2006). "The inner interhelix loop 4-5 of the melibiose permease from *Escherichia coli* takes part in conformational changes after sugar binding." J Biol Chem **281**(36): 25882-92.
- MUS-VETEAU, I. i G. LEBLANC (1996). "Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of cosubstrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses." Biochemistry **35**(37): 12053-60.
- MUS-VETEAU, I., T. POURCHER i G. LEBLANC (1995). "Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy." Biochemistry **34**(20): 6775-83.

N

NARA, M., M. TASUMI, M. TANOKURA, T. HIRAOKI, M. YAZAWA, A. TSUTSUMI (1994). "Infrared studies of interaction between metal ions and Ca(2+)-binding proteins. Marker bands for identifying the types of coordination of the side-chain COO- groups to metal ions in pike parvalbumin (pI = 4.10)." FEBS Lett **349**(1): 84-8.

O

OBERG, K. A., L. FINK (1998). "A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution." Anal Biochem **256**(1): 92-106.

P

POOLMAN, B., J. KNOL, C. VAN DER DOES, P. J. HENDERSON, W. J. LIANG, G. LEBLANC, T. POURCHER, I. MUS-VETEAU (1996). "Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins." Mol Microbiol **19**(5): 911-22.

POOLMAN, B., W. N. KONINGS (1993). "Secondary solute transport in bacteria." Biochim Biophys Acta **1183**(1): 5-39.

POURCHER, T., M. BASSILANA, H. K. SARKAR, H. R. KABACK, G. LEBLANC (1990). "The melibiose/Na<sup>+</sup> symporter of Escherichia coli: kinetic and molecular properties." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **326**(1236): 411-23.

POURCHER, T., E. BIBI, H. R. KABACK, G. LEBLANC (1996). "Membrane topology of the melibiose permease of Escherichia coli studied by melB-phoA fusion analysis." Biochemistry **35**(13): 4161-8.

POURCHER, T., M. DECKERT, M. BASSILANA, G. LEBLANC (1991). "Melibiose permease of Escherichia coli: mutation of aspartic acid 55 in putative helix II abolishes activation of sugar binding by Na<sup>+</sup> ions." Biochem Biophys Res Commun **178**(3): 1176-81.

POURCHER, T., S. LECLERCQ, G. BRANDOLINI, G. LEBLANC (1995). "Melibiose permease of Escherichia coli: large scale purification and evidence that H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Li<sup>+</sup> sugar symport is catalyzed by a single polypeptide." Biochemistry **34**(13): 4412-20.

POURCHER, T., M. L. ZANI, G. LEBLANC (1993). "Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of Escherichia coli. I. Effect on Na(+)-dependent transport and binding properties." J Biol Chem **268**(5): 3209-15.

PRESTRELSKI, S. J., N. TEDESCHI, T. ARAKAWAI, J. F. CARPENTER (1993). "Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers." *Biophys J* **65**(2): 661-71.

PURHONEN, P., A. K. LUNDBACK, R. LEMONNIER, G. LEBLANC, H. HEBERT (2005). "Three-dimensional structure of the sugar symporter melibiose permease from cryo-electron microscopy." *J Struct Biol* **152**(1): 76-83.

## R

RATH, A., M. GLIBOWICKA, V. G. NADEAU, G. CHEN, C. M. DEBER (2009). "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1760-5.

REIZER, J., A. REIZER, M. H. SAIER, JR. (1994). "A functional superfamily of sodium/solute symporters." *Biochim Biophys Acta* **1197**(2): 133-66.

ROTHSCHILD, K. J. (1992). "FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model." *J Bioenerg Biomembr* **24**(2): 147-67.

ROTHSCHILD, K. J., T. MARTI, S. SONAR, Y. W. HE, P. RATH, W. FISCHER, H. G. KHORANA (1993). "Asp96 deprotonation and transmembrane alpha-helical structural changes in bacteriorhodopsin." *J Biol Chem* **268**(36): 27046-52.

## S

SAARINEN, P. E. K., JYRKI K.1; PARTANEN, JARI O.1 (1995). "New Method for Spectral Line Shape Fitting and Critique on the Voigt Line Shape Model " *Applied Spectroscopy* **49**(10): 1438-1453.

SAIER, M. H. (1999). "Genome archeology leading to the characterization and classification of transport proteins." *Curr Opin Microbiol* **2**(5): 555-61.

SAIER, M. H., JR. (1998). "Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya." *Adv Microb Physiol* **40**: 81-136.

SAIER, M. H., JR. (2000a). "Families of transmembrane sugar transport proteins." *Mol Microbiol* **35**(4): 699-710.

SAIER, M. H., JR. (2000b). "A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 354-411.

- SAIER, M. H., JR. (2000c). "Vectorial metabolism and the evolution of transport systems." J Bacteriol **182**(18): 5029-35.
- SAIER, M. H., JR. (2001). "Evolution of transport proteins." Genet Eng (N Y) **23**: 1-10.
- SÉRY, N. (2002). Role of cytoplasmic Loops 4-5 and 10-11 in the Na<sup>+</sup>-symport mechanism catalyzed by the Melibiose permease of Escherichia coli. Diploma of Advanced Studies. France Nice University
- SINGH, S. K., C. L. PISCITELLI, A. YAMASHITA, E. GOUAUX (2008). "A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation." Science **322**(5908): 1655-61.
- STEPHENSON, D. S. (1988). "Linear Prediction and Maximum Entropy Methods in NMR Spectroscopy." Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc **20**: 515.
- SUJATHA, M. S. i P. V. BALAJI (2004). "Identification of common structural features of binding sites in galactose-specific proteins." Proteins **55**(1): 44-65.
- SUREWICZ, W. K., H. H. MANTSCH, D. CHAPMAN (1993). "Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment." Biochemistry **32**(2): 389-94.
- T
- TATULIAN, S. A. (2003). "Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids." Biochemistry **42**(41): 11898-907.
- TATULIAN, S. A., D. M. CORTESI, E. PEROZO (1998). "Structural dynamics of the Streptomyces lividans K<sup>+</sup> channel (SKC1): secondary structure characterization from FTIR spectroscopy." FEBS Lett **423**(2): 205-12.
- TORRES, J. i E. PADRÓS (1993). "The secondary structure of bacteriorhodopsin in organic solution. A Fourier transform infrared study." FEBS Lett **318**(1): 77-9.
- TSUCHIYA, T. i T. H. WILSON (1978). "Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of Escherichia coli." Membr Biochem **2**(1): 63-79.

V

- VARDY, E., I. T. ARKIN, K. E. GOTTSCHALK, H. R. KABACK i S. SCHULDINER (2004). "Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling." Protein Sci **13**(7): 1832-40.
- VÁZQUEZ-IBAR, J. L., L. GUAN, A. B. WEINGLASS, G. VERNER, R. GORDILLO i H. R. KABACK (2004). "Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(47): 49214-21.
- VENYAMINOV, S. i N. N. KALNIN (1990). "Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands." Biopolymers **30**(13-14): 1243-57.

W

- WEISSBORN, A. C., M. C. BOTFIELD, M. KURODA, T. TSUCHIYA i T. H. WILSON (1997). "The construction of a cysteine-less melibiose carrier from *E. coli*." Biochim Biophys Acta **1329**(2): 237-44.
- WEITZMAN, C., T. G. CONSLER i H. R. KABACK (1995). "Fluorescence of native single-Trp mutants in the lactose permease from *Escherichia coli*: structural properties and evidence for a substrate-induced conformational change." Protein Sci **4**(11): 2310-8.
- WILLIAMS, K. A. (2000). "Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA." Nature **403**(6765): 112-5.
- WILSON, D. M., H. HAMAI i T. H. WILSON (1995). "GLY113-->ASP can restore activity to the ASP51-->SER mutant in the melibiose carrier of *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **209**(1): 242-9.
- WILSON, D. M. i T. H. WILSON (1987). "Cation specificity for sugar substrates of the melibiose carrier in *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **904**(2): 191-200.
- WILSON, D. M. i T. H. WILSON (1992). "Asp-51 and Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier." J Bacteriol **174**(9): 3083-6.



## Y

- YAMASHITA, A., S. K. SINGH, T. KAWATE, Y. JINIE. GOUAUX (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters." Nature **437**(7056): 215-23.
- YAZYU, H., S. SHIOTA-NIYA, T. SHIMAMOTO, H. KANAZAWA, M. FUTAIIT. TSUCHIYA (1984). "Nucleotide sequence of the melB gene and characteristics of deduced amino acid sequence of the melibiose carrier in Escherichia coli." J Biol Chem **259**(7): 4320-6.
- YAZYU, H., S. SHIOTA, M. FUTAIIT. TSUCHIYA (1985). "Alteration in cation specificity of the melibiose transport carrier of Escherichia coli due to replacement of proline 122 with serine." J Bacteriol **162**(3): 933-7.
- YEH, J. I., U. CHINTEIS. DU (2008). "Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3280-5.

## Z

- ZANI, M. L., T. POURCHERIG. LEBLANC (1993). "Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of Escherichia coli. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties." J Biol Chem **268**(5): 3216-21.
- ZANI, M. L., T. POURCHERIG. LEBLANC (1994). "Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH<sub>2</sub>-terminal domains of the melibiose permease of Escherichia coli." J Biol Chem **269**(40): 24883-9.
- ZHANG, Y. (2008a). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.
- ZHANG, Y. (2008b). "Progress and challenges in protein structure prediction." Curr Opin Struct Biol **18**(3): 342-8.
- ZHANG, Y. (2009). "Protein structure prediction: when is it useful?" Curr Opin Struct Biol **19**(2): 145-55.
- ZSCHERP, C.iA. BARTH (2001). "Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms." Biochemistry **40**(7): 1875-83.

