



Universitat Autònoma de Barcelona

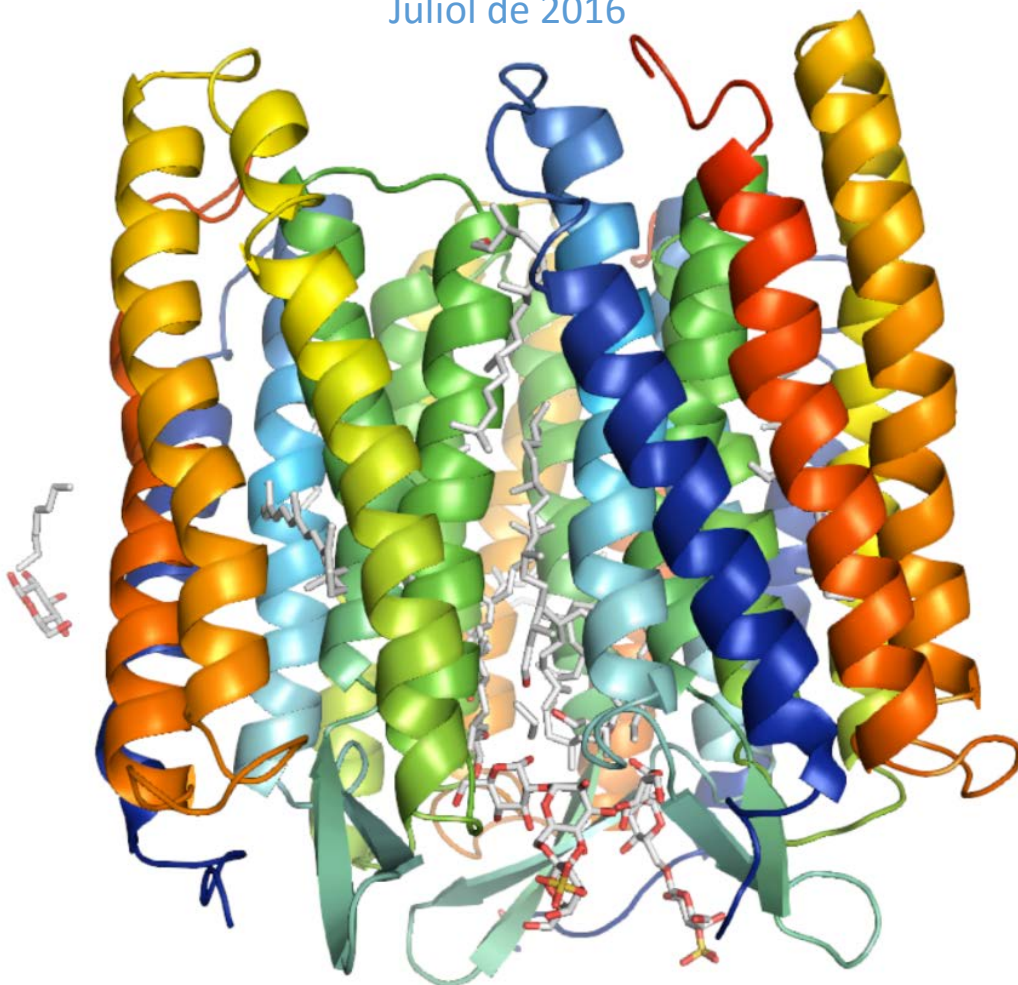
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Paper del moviment de les hèlixs en l'estructura i funció de la bacteriorodopsina

Tesi doctoral
Juliol de 2016



Guillem Marco Garcia



Contra l'estupidesa, fins i tot els déus lluiten en va?

Els propis déus, Isaac Asimov



Taula de continguts

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	7
1. DESCOBRIMENT DE LA BACTERIORODOPSINA.....	9
2. EVOLUCIÓ DE L'ESTUDI DE LA BR.....	11
3. <i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i>	16
4. MEMBRANA PÚRPURA.....	19
a. <i>Característiques generals</i>	19
b. <i>Síntesi de la bacteriorodopsina</i>	19
5. LA BACTERIORODOPSINA.....	20
6. RETINAL.....	21
a. <i>Característiques</i>	21
b. <i>Adaptació llum-fosc</i>	22
7. EL FOTOCICLE.....	24
8. FORMA BLAVA I FORMA VERMELLA DE LA BR.....	27
9. EL CAMÍ DELS PROTONS.....	28
a. <i>Acoblament entre el Asp85 i el grup X</i>	28
b. <i>Identificació del grup X</i>	29
c. <i>De la Base de Schiff al medi extracel·lular</i>	30
d. <i>Del medi citoplasmàtic a la Base de Schiff</i>	32
10. MOVIMENT DE LES HÈLIXS.....	33
11. APLICACIONS BIOTECNOLÒGIQUES DE LA BR.....	39
OBJECTIUS	45
MATERIALS I MÈTODES.....	51
1. MATERIAL BIOLÒGIC EMPRAT.....	53
a. <i>Soques bacterianes</i>	53
b. <i>Gen bop</i>	54
c. <i>Vectors</i>	55
d. <i>Medis de cultiu i antibiòtics utilitzats</i>	56
e. <i>Cultiu i conservació bacteriana</i>	59
2. TÈCNiques DE DNA RECOMBINANT.....	61
a. <i>Mutagènesi dirigida per PCR</i>	61
b. <i>Manipulacions enzimàtiques</i>	64
c. <i>Electroforesi de DNA en gels d'agarosa</i>	65
d. <i>Purificació de DNA</i>	66
e. <i>Competència de cèl·lules d'E. coli</i>	66
f. <i>Transformació de cèl·lules competents d'E. coli</i>	67
g. <i>Extracció del DNA plasmídic en E. coli i seqüenciació</i>	67
h. <i>Competència i transformació de cèl·lules d'H. salinarum</i>	68
3. MANIPULACIÓ DE LA MEMBRANA PÚRPURA.....	72
a. <i>Extracció de la membrana púrpura</i>	72
b. <i>Tractament de la membrana púrpura dels dobles mutants de cisteïna</i>	73
c. <i>Determinació de la puresa de bacteriorodopsina</i>	73
d. <i>Electroforesi de proteïna en gels de poliacrilamida</i>	74
e. <i>Determinació de l'estat d'oxidació de les cisteïnes</i>	77
4. ESTUDIS ESTRUCTURALS.....	78
a. <i>Adaptació llum-fosc</i>	79
b. <i>Titració de la BR front al pH</i>	80
c. <i>Estabilitat tèrmica</i>	81
d. <i>Hidròlisi de la Base de Schiff amb hidroxilamina</i>	81
5. ESTUDIS FUNCIONALS.....	82

a.	<i>Determinació del transport de protons de la bR</i>	82
b.	<i>Fotòlisi de llampec</i>	85
c.	<i>Caracterització d'intermediaris del fotocicle mitjançant FTIR</i>	88
d.	<i>Caracterització d'intermediaris del fotocicle mitjançant espectroscòpia de UV-Vis</i>	98
RESULTATS I DISCUSSIÓ PART 1: RESTRICCIÓ DEL MOVIMENT DE LES HÈLIXS PEL COSTAT CITOPLASMÀTIC		99
1.	ESTUDI ESTRUCTURAL DELS DOBLES MUTANTS CITOPLASMÀTICS.....	103
a.	<i>Adaptació llum-foscor</i>	103
b.	<i>Mesura del pK_a del Asp85</i>	104
c.	<i>Estabilitat tèrmica de la bR</i>	108
d.	<i>Estabilitat química de la bR</i>	113
2.	ESTUDI FUNCIONAL DELS DOBLES MUTANTS CITOPLASMÀTICS.....	115
a.	<i>Fotòlisi de llampec</i>	116
b.	<i>Proteïna incorporada en liposomes</i>	128
c.	<i>Transport de protons en presència de piranina</i>	130
d.	<i>Espectres d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)</i>	137
RESULTATS I DISCUSSIÓ PART 2: RESTRICCIÓ DEL MOVIMENT DE LES HÈLIXS PEL COSTAT EXTRACEL·LULAR		163
1.	ESTUDI ESTRUCTURAL DELS DOBLES MUTANTS EXTRACEL·LULARS.....	166
a.	<i>Adaptació llum-foscor</i>	166
b.	<i>Mesura del pK_a del Asp85</i>	168
c.	<i>Estabilitat tèrmica de la bR</i>	170
d.	<i>Estabilitat química de la bR</i>	173
2.	ESTUDI FUNCIONAL DELS DOBLES MUTANTS EXTRACEL·LULARS.....	175
a.	<i>Fotòlisi de llampec</i>	175
b.	<i>Proteïna incorporada en liposomes</i>	186
c.	<i>Transport de protons en presència de piranina</i>	187
d.	<i>Espectres d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)</i>	192
e.	<i>Potencials aplicacions biotecnològiques dels mutants</i>	200
DISCUSSIÓ GENERAL		211
1.	VISIÓ GENERAL.....	213
2.	MUTANTS CITOPLASMÀTICS.....	214
a.	<i>Restricció del moviment de les hèlix E i F</i>	214
b.	<i>Restricció del moviment de l'hèlix C i el bucle EF</i>	217
3.	MUTANTS EXTRACEL·LULARS.....	218
a.	<i>Restricció del moviment dels bucles BC i DE</i>	220
b.	<i>Restricció del moviment de les hèlixs A i B</i>	222
CONCLUSIONS		225
BIBLIOGRAFIA		229
AGRAÏMENTS		247

Abreviatures

bO → bacterioopsina

bR → bacteriorodopsina

BR → estat basal del fotocicle de la bR.

BS → Base de Schiff

DA → bR adaptada a la foscor (*Dark Adapted*)

Fig. → Figura

HA → hidroxilamina

LA → bR adaptada a la llum (*Light Adapted*)

min → minuts

MP → membrana púrpura

nm → nanòmetres

ox → forma oxidada

PRG → *Proton release group*, grup alliberador del protó.

RBP → *Retinal Binding Pocket*, butxaca d'unió del retinal.

red → forma reduïda

TDS → *Thermal difference spectra*, espectre de diferència tèrmic.

T_m → *Melting temperature* o temperatura de desnaturalització.

Δ → variació

ϵ → coeficient d'absorció molar

λ → longitud d'ona

Introducció

La bacteriorodopsina és una proteïna amb una història d'estudi relativament llarga. Per això una bona manera d'introduir-la és explicar-la des d'un punt de vista històric, tant el seu descobriment com el seu estudi.

1. Descobriment de la bacteriorodopsina.

Ja a principis dels anys 60 del segle XX s'associa la coloració vermella-púrpura d'algunes salines i llacs salats a l'arqueobacteri *Halobacterium salinarum*. Aquests arqueobacteris estaven vivint en ambients hipersalins com salines i llacs salats on es considerava que la vida era pràcticament impossible degut a l'alta toxicitat de la sal a tan elevades concentracions, que pot ser d'uns 4 M. Tant la coloració com la capacitat de supervivència en aquestes condicions va atraure l'atenció sobre aquest organisme.



Fig. 1. Exemple de salines on es pot distingir que hi ha *H. salinarum* creixent [1].

A l'aïllar *H. salinarum* observaren la disgregació de les cèl·lules en aigua destil·lada degut al xoc osmòtic, donant lloc a fragments de membrana cel·lular diferenciats de la resta de la membrana que tenien la peculiaritat de ser color púrpura, pel que se'ls va anomenar membrana púrpura (MP). Aquesta MP incloïa una única proteïna transmembrana la qual tenia una molècula de retinal unida [2].

Es va comprovar que la MP tenia un màxim d'absorció en el visible a 560 nm, fet que va fer pensar que es tractava d'un fotoreceptor. Com a més tenia un retinal unit, es va anomenar a la proteïna bacteriorodopsina (bR), per la seva similitud amb la rodopsina visual.

Poc després es va descobrir que il·luminant la bR en determinades condicions donava lloc a un canvi de longitud d'absorció màxima de 650 a 415 nm [3] i que aquest canvi anava acompanyat amb una variació en el pH del medi. Estudis amb cèl·lules

Introducció

senceres i vesícules mostraren que la variació del pH es devia al moviment de protons des d'un costat de la membrana a l'altre. Il·luminar la bR produïa un transport de protons cap a l'espai extracel·lular, generant un gradient electroquímic de protons. Aquest gradient era utilitzat per l'ATP sintetasa per a sintetitzar ATP a partir d'ADP i P_i [3].

Aquest mecanisme de producció d'ATP utilitzant la llum va resultar ser un mecanisme d'emergència que es desenvolupava en condicions d'anòxia, en les quals no es podia realitzar l'obtenció d'energia mitjançant la fosforilació oxidativa dels aminoàcids. Quan l'oxigen comença a ser limitant, el creixement s'atura i es dediquen els recursos a sintetitzar la MP. Així, la producció de MP és un mecanisme de resistència fins que les condicions es tornin favorables.

L'any 1975 s'obtingué la primera estructura de la bR mitjançant difracció d'electrons, a una resolució de 7 Å [4]. El model proporcionat constava de 7 estructures, segurament hèlixs, perpendiculars a l'eix de la membrana i amb unes dimensions de 25 x 35 x 45 Å. Estudis posteriors confirmaren aquest model i es va obtenir l'estructura amb la millor resolució de l'època (3,5 Å) [5, 6].

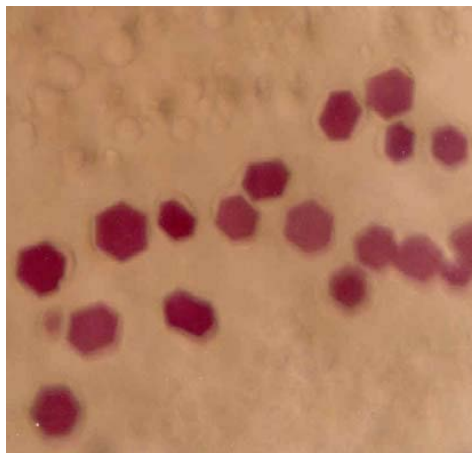


Fig. 2. Imatge de cristalls de bR realitzats al laboratori vistos amb microscopi òptic invertit. La obtenció de cristalls i la millora de la tècnica van permetre obtenir estructures cada vegada de major resolució [7].

Fins al descobriment de la bR l'únic mecanisme conegut de producció d'energia química a partir d'energia lumínica eren les cadenes de transport electròniques com les de la fotosíntesi. De fet, en un principi hi ha qui pensava la possibilitat de que la MP fos una estructura tipus cadena de transport d'electrons [3], encara que la idea no fou massa recolzada i finalment fou descartada. Aquest fet junt a que la bR es pot obtenir fàcilment i en grans quantitats ha fet que sigui molt estudiada i sigui la proteïna transportadora amb l'estructura i funció més coneguda. Aquest alt coneixement també ha sigut degut a l'ús de la bR com a model per a l'estudi d'altres proteïnes transmembrana com la rodopsina [8-10], bombes de protons com la citocrom C oxidasa [11] i l'ATP sintasa [12] i transportadors acoblats a protons [13].

A més de servir com a model per a l'estudi d'altres proteïnes, han sigut proposades altres possibles usos en camps més aplicats com per exemple emprar-la com a memòria hologràfica [14, 15], memòria òptica [16], potabilització d'aigües salines [17], sonda de pH [18], obtenció d'energia química a partir de la llum per a alimentar microsystemes [19, 20] o microxips informàtics [21]. A més, la bR ha servit com a eina per orientar proteïnes i poder estudiar-les per RMN [22] i per estudiar bucles de la rodopsina per microscòpia de força atòmica [23, 24].

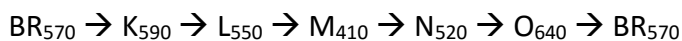
2. Evolució de l'estudi de la bR.

Com és lògic, l'estudi de la bR ha estat fortament influenciat per les millores tècniques que han anat apareixent, de tal manera que es pot establir un paral·lelisme entre l'estudi de la bR i el desenvolupament de les tècniques fisico-químiques aplicades a l'estudi de les proteïnes de membrana. El seu estudi també ha estat fortament influït pel desenvolupament de la bioinformàtica.

Els descobriments més importants per dècades foren:

- **1970-80:** la bR fou descoberta el 1966 i en 1970 es va veure que era una proteïna semblant a la rodopsina, d'aquí el seu nom. El 1972 es descobreix la seva funció com a bomba de protons dependent de la llum. Cap a 1977 ja es van coneixent dades bàsiques sobre l'estructura i la funció. Era una proteïna de membrana d'uns 26 kDa que formava pedaços en la membrana cel·lular, l'anomenada membrana púrpura. Es va veure que tenia el cromòfor unit a la proteïna formant una base de Schiff (BS) amb un grup amino d'una lisina. L'estructura de baixa resolució (7 Å) obtinguda en 1975 mostra els 7 segments α -hèlix que creuen la membrana quasi perpendicularment [4]. Aquesta estructura no mostrava el retinal però es va col·locar en l'interior hidrofòbic. La unió del retinal a l'apoproteïna de la bR (la bO, bR sense retinal) [25] desplaça l'absorció del retinal més cap al vermell que un retinal formant una BS en dissolució. A més la bR actua com a retinal isomerasa i augmenta el pK_a de la BS de 7 a més de 13.

Estudis cinètics del fotocicle per espectroscòpia UV-Vis van permetre identificar cinc intermediaris que duraven entre picosegons i mil·lsegons :



Els subíndex indiquen la longitud d'ona del màxim d'absorció i les lletres s'utilitzen per designar els diferents fotointermediaris. La designació de les lletres es va fer a partir del L i M ja que eren similars als fotoproductes lumirodopsina i metarodopsina del pigment visual. La resta de components es designen seguint l'ordre alfabètic.

Sols el primer pas requeria llum. Els protons sortien a l'espai extracel·lular durant la transició $L \rightarrow M$ i apareixen després de menys d'1 ms. Després entren en la proteïna des

Introducció

del citoplasma durant el decaïment de l'intermediari N uns mil·lsegons després. En principi es va proposar una estequiometria d'1 protó per cicle.

En 1976 es va presentar un model per al mecanisme de bombeig de protons. En aquest moment ja es va confirmar que la bR era una bomba de protons reconstituint fragments de MP en liposomes i demostrant que es produïa fosforilació [26, 27]. Aquest model assumia que la BS es localitzava a l'interior de la proteïna i que canviava transitòriament la seva accessibilitat d'un costat de la superfície a l'altre. També assumia que els canvis estructurals estaven constrets degut a la compactació i l'estructura paracristal·lina de la MP, fent impossible grans canvis conformacionals.

Es va proposar l'existència de xarxes de molècules d'aigua en ambdós costats de la proteïna i amb espectroscòpia de ressonància de Raman es va demostrar que existia aquesta xarxa entre una de les dues superfícies i la BS.

Com a força motora del fotocicle es van proposar els canvis de pK_a de la BS i altres residus, causats per canvis conformacionals del cromòfor i/o de la BS.

Amb espectroscòpia de ressonància de Raman (RR) amb alta resolució temporal es va obtenir el primer model del fotocicle, on la absorció de l'energia començava en el cromòfor i l'intermediari M tenia un màxim d'absorció a 410 nm, indicant que es produïa la desprotonació de la BS, sent l'origen del transport [28]. Aquest model plantejava el canvi d'accessibilitat de la proteïna i el situava en la primera meitat del fotocicle, entre BR₅₇₀ i M₄₁₀. Aquest model encara no incloïa la isomerització del retinal deguda a l'absorció d'un fotó. Aquesta isomerització es va proposar per analogia amb la rodopsina i es va descobrir que en bR consistia en el canvi de retinal *tot-trans* a retinal *13-cis*. En 1979 es publica un model que inclou la isomerització del retinal com a força motora del fotocicle. També en 1979 s'esbrina la l'estructura primària de la bR [29].

- **1980-90:** es produeix un progrés continu en la caracterització del fotocicle i importants avanços en les tècniques.

Amb les gràfiques d'hidrofobicitat de l'estructura primària i l'estudi de l'accessibilitat de la bR a enzims proteolítics i altres reactius s'identificaren 7 segments hidrofòbics que aparentment eren les hèlixs transmembrana vistes en el mapa de densitat electrònica. Es va identificar la Lys216 localitzada a la meitat de la hèlix G com a lloc d'unió del retinal [30] i el Asp212 com al contraió de la BS més probable.

Sense encara suficient informació estructural, fent ús de programes informàtics i tractant d'orientar els residus hidrofòbics cap a dins i de formar el màxim nombre possible de ponts salins, es va fer una aproximació a la orientació de les hèlixs en la membrana [31].

Estudis per difracció de neutrons de la MP amb retinal deuterat van localitzar la BS i l'anell β -ionona del retinal [32]. A més es van fer estudis amb mutants per localitzar els residus directament implicats en el transport.

Es feren estudis de l'absorció en el visible del fotocicle a baixa temperatura i resultats en el temps que van ajudar a desenvolupar un nou model. Nous programes informàtics van permetre l'estudi de les constants cinètiques, anàlisi global de dades i estudiar la influència de la temperatura i el pH. Es van introduir les reaccions bidireccionals, la possibilitat de camins ramificats i múltiples formes de la bR amb diferents fotocicles.

Estudis de fotocorrents amb elevada resolució temporal i estudis cinètics de fotovoltatge confirmaren la relació entre translocacions de càrregues elèctriques i canvis espectrals. L'estudi de monòmers de bR en liposomes mostrava que el transport era similar al dels trímers, així que es podia utilitzar un model de transport basat en una sola molècula de bR.

Es van fer estudis d'espectroscòpia vibracional i RMN que coincidien amb les dades d'espectroscòpia de UV-Vis. S'identifiquen els intermediaris J i K gràcies al desenvolupament de l'espectroscòpia resolta amb el temps fins a rangs de femtosegons (10^{-15} s). Amb espectroscòpia de RR es va veure que la BS es desprotonava en la transició $L \rightarrow M$ i es va assignar la reisomerització del retinal a la transició $N \rightarrow O$.

Els estudis amb RR es limitaven a l'estudi del cromòfor, però el desenvolupament de l'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR) van suplir aquesta limitació. Com aquesta tècnica permetia l'estudi de la resta de la proteïna i els canvis observats al cromòfor coincidien amb els de RR, es van poder separar les bandes corresponents al cromòfor dels de l'apoproteïna. La FTIR d'alta resolució temporal va permetre caracteritzar millor els intermediaris de la segona meitat del fotocicle.

Després de 1985 la tècnica de FTIR va començar a substituir a l'espectroscòpia de RR i es treballà amb aminoàcids marcats isotòpicament. Amb aquests estudis es va veure que hi havia quatre aspàrtics en l'entorn hidrofòbic de la proteïna que participaven en els canvis que tenien lloc durant el fotocicle podien assignar-se a transicions entre intermediaris. Es va treballar en la identificació seqüencial de cada un.

Es va clonar, seqüenciar i expressar el gen de la bR en *E. coli* per reconstituir després la bacterioopsina (bO, apoproteïna) amb retinal en vesícules lipídiques i micel·les de detergent [33]. Açò va facilitar l'expressió i caracterització de mutants a pesar de tenir l'inconvenient d'obtenir proteïna en un entorn no natiu, calia incubar amb retinal i reconstituir en micel·les o liposomes. Aquesta tècnica, junt a l'estudi amb FTIR de bR nativa i mutants i la obtenció per atzar de mutants deficientes en altres pigments, va permetre obtenir moltes dades noves. Gràcies a aquests treballs es va poder identificar la funció dels aspàrtics 85 i 96 com a residus que es protonaven i desprotonaven durant

Introducció

el fotocicle [34]. Asp 115 i Asp212 foren identificats com a residus que sofrien canvis en el seu entorn durant el fotocicle [35]. Veient que la majoria dels residus que interaccionaven amb la BS estaven a les hèlixs C, D, F i G es va ajustar el model estructural a les dades espectroscòpiques disponibles, encara sense incloure molècules d'aigua al model.

Es va desestimar la idea del canvi d'accessibilitat de la proteïna deguda a canvis en l'estat d'isomerització del retinal i es va proposar que el mecanisme serien canvis conformacionals de la proteïna entre L i N. D'aquest model sorgeix la idea del paper rellevant de les prolines intrahèlix, paper confirmat per estudis de FTIR.

La millora en la tècnica de difracció de neutrons cap a 1984 va aportar informació estructural important sobre el retinal i les molècules d'aigua [36], cosa que no permetien la cristal·lografia electrònica i de raigs X.

La idea d'un canvi d'accessibilitat de la bR del costat extracel·lular al citoplasmàtic va emascarar els canvis estructurals que ocorrien en la segona meitat del fotocicle. La creença de que la transferència del protó des del Asp96 a la BS ocorria a través de residus localitzats entre els dos durant la transició M→N també hi va col·laborar en l'emascarament. Es coneixia el fotocicle com a transferències de protons i isomerització del retinal, però el com es produïen estos canvis era desconegut i motiu de controvèrsia.

Cap al 1985 es descobreixen altres proteïnes similars a la bR presents a la membrana d'*H. salinarum*, que a més de tenir una seqüència aminoacídica homòloga, eren activades per la llum i tenien un fotocicle [37]. L'estudi d'aquestes proteïnes va ajudar a identificar residus importants de la bR.

- **1990-2000:** en 1990 es va produir un mapa tridimensional per cristal·lografia electrònica de la bR a una resolució en el pla de la membrana de 3,5 Å i de 10 Å en el pla perpendicular [38]. Amb les dades de la cristal·lografia es van poder fixar les posicions rotacionals de les hèlixs, de l'anell β-ionona i de sis aminoàcids aromàtics (4 triptòfans i 2 tirosines), amb el qual quedava definit la butxaca d'unió del retinal. També es va veure que l'espai citoplasmàtic és estret i hidrofòbic i l'extracel·lular és ampli, amb una zona oberta entre la BS i la superfície on es va proposar que hi hauria molècules d'aigua. Açò era consistent amb el ràpid intercanvi protònic entre la BS i el medi extracel·lular en la foscor i el fet de que el 80% dels moviments de càrregues tenien lloc durant la segona part del fotocicle, que ocorre en l'espai citoplasmàtic. En aquest moment la major limitació del model estructural era que sols es podia veure l'estat basal de la bR.

En 1991 estudis de RMN en estat sòlid van suggerir que el contraïó de la BS no era un sol residu, sinó que consistia en diversos grups, entre ells una molècula d'aigua. Aquesta configuració de contraïó suposava una càrrega deslocalitzada, més dèbil i

polaritzable. Açò va permetre explicar altres processos com el canvi de pK_a de la BS o el desplaçament cap al vermell de l'absorció del retinal a l'unir-se a la proteïna.

Nous estudis cinètics i termodinàmics suggerien l'existència de dos intermediaris M consecutius amb transició irreversible i amb un canvi d'accessibilitat de la proteïna [39, 40]. Estos resultats foren confirmats per espectroscòpia de dicroisme circular (CD) i FTIR i determinaren importants canvis conformacionals en l'intermediari M que implicaven a prolins intrahèlix i nombrosos ponts d'hidrogen. Estudiant MP parcialment deshidratada i mutants sense grup donador de protó (com per exemple el mutant D96N) va permetre atrapar els intermediaris M_1 , M_2 i N. La combinació d'estudis d'estructures cristal·logràfiques, FTIR a baixa temperatura i de mostres parcialment deshidratades van permetre veure en part els canvis que tenen lloc en M_2 i N.

Les dades de cristal·lografia electrònica suggerien la possibilitat d'un desplaçament de l'hèlix F en el costat citoplasmàtic cap a l'exterior durant l'intermediari M tardà o M_2 , proposant que l'obertura de l'hèlix possibilitaria l'entrada de molècules d'aigua en l'espai citoplasmàtic per a facilitar la reprotó de la BS.

Gràcies a que es disposava d'estructures cada vegada més refinades, noves dades de difracció de neutrons i dades de RMN d'estat sòlid que remarquen el paper de l'aigua intramolecular, es van començar a desenvolupar estudis de dinàmica molecular, càlculs electrostàtics i químic-quàntics del centre actiu de la molècula, del camí dels protons i dels canvis conformacionals durant el fotocicle.

Els models estructurals ja permetien deduir els defectes funcionals produïts per una mutació puntual o inclús com revertir els canvis mitjançant modificacions en l'entorn de la mutació, en el cromòfor o mitjançant altres mutacions.

El major refinament de les estructures obtingudes va permetre utilitzar-les de motlle per a deduir estructures de moltes GPCRs quan encara no era possible obtenir la seva estructura cristal·logràfica [41, 42].

- **2000-10:** es van publicar estudis d'altres proteïnes de membrana que utilitzen la bR com a motlle, construint quimeres de bR amb fragments d'altres proteïnes [24, 43], estudis que han permès caracteritzar els bucles funcionals d'altres receptors [44]. La bR també és utilitzada per a testar i validar noves tècniques per a l'estudi de proteïnes, com per exemple la microscòpia de força atòmica [45, 46] o la cristal·lografia crio-electrònica [47].

Es va donar importància a l'estudi del paper de les aigües intramoleculares en el mecanisme de transport dels protons, descobrint la seva importància en el procés [48-50].

Introducció

Esdevingué important la caracterització dels intermediaris que intervenen en la segona part del fotocicle i els canvis estructurals relatius al moviment d'hèlixs durant la reptonació de la bR.

- **2010-present:** s'aprofundeix en l'estudi de les aigües internes de la bR [51-54] que, amb el complement dels estudis de simulació per Dinàmica Molecular (Molecular Dynamics, DM), van definint cada vegada més el camí dels protons. Creix amb força el descobriment i estudi d'altres rodopsines bacterianes [55-60] i l'estudi d'aplicacions biotecnològiques de la bR [61-64].

3. *Halobacterium salinarum*.

L'*Halobacterium salinarum* pertany a la família *Halobacteriaceae* junt a altres 9 gèneres, dels quals 4 contenen alguna proteïna associada a retinal [65]. L'any 1996 es van unificar tres nomenclatures diferents sota el nom d'*Halobacterium salinarum*, ja que s'utilitzaven fins a tres noms diferents per a designar una mateixa espècie o es consideraven diferents sense tenir cap propietat diferenciadora. Per això es pot trobar l'arqueobacteri a la bibliografia anomenat com a *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium halobium* i *Halobacterium cutirubrum* [66].

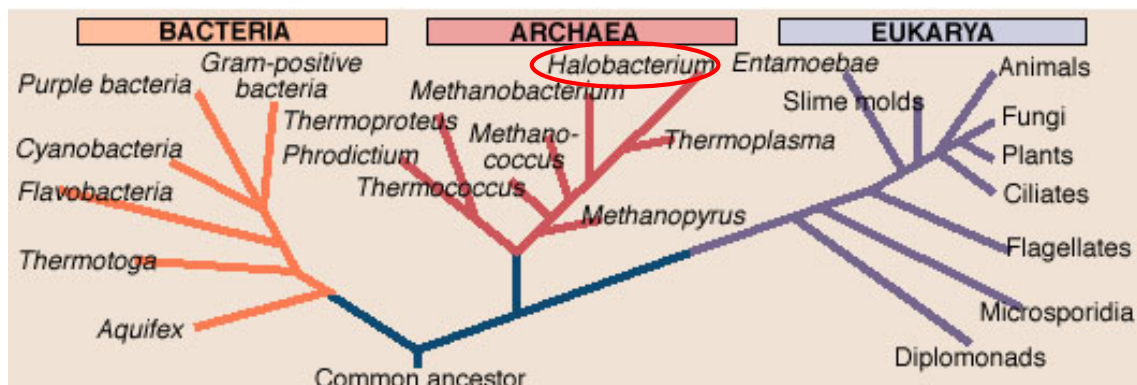


Fig. 3. Arbre filogenètic on es representen exemples dels principals grups d'organismes.

H. salinarum és un arqueobacteri halòfil adaptat a viure en ambients d'extrema salinitat, de l'ordre de 4 M, una alta concentració que s'ha tornat indispensable per a la seva supervivència [2]. Al contrari que les cèl·lules eucariotes i procariotes, que acumulen a l'espai intracel·lular Na^+ , *H. salinarum* acumula K^+ que és tòxic per a la resta d'organismes [67]. Acumula K^+ per a contrarestar la elevada salinitat del medi i poder mantenir la funcionalitat de la cèl·lula, ja que la majoria dels seus enzims són dependents de sal [68, 69].

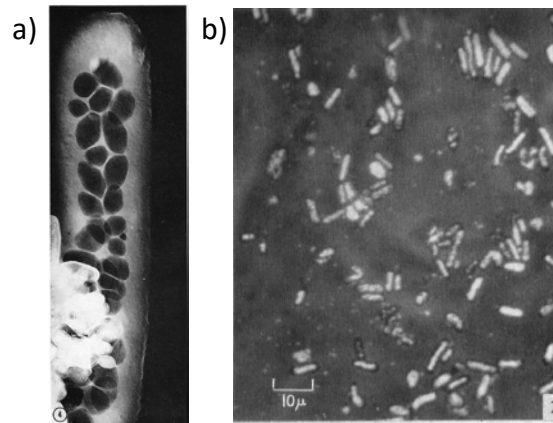


Fig. 4. a) Vacúols de gas d'una cèl·lula al final de la fase logarítmica de creixement [70]. b) Imatge de contrast de fases obtinguda mitjançant microscòpia electrònica [71].

L'arqueobacteri té forma de bacil (bacteri de forma cilíndrica i recta, com un bastó), una mida de entre 0,5-1,2 μm per 1,0-6,0 μm , diversos flagels polars que els permet la mobilitat i tenyeixen com a gramnegatius. El seu genoma és ric en G/C (66-71%) i fan ús del codi genètic comú però amb preferència per codons acabats en C o G, acabant així el 81% dels codons [72].

En la naturalesa, *H. salinarum* es desenvolupa en ambients salins, que solen ser llocs amb elevades temperatures i una forta evaporació. Són quimioorganòtrofs i aerobis estrictes, tenen vacúols de gas que els permet flotar i les colònies són de color vermella o púrpura. Degut a les condicions d'aquests ambients salins, *H. salinarum* pot créixer a altes temperatures amb un òptim de 57 $^{\circ}$ C [68] i, com no formen espores, en cas de limitació de la disponibilitat d'oxigen produeixen la MP com a mecanisme de resistència.

Per al seu cultiu al laboratori fan falta medis rics en aminoàcids i sals, un bon aireig i mantenir la temperatura al voltant de 40 $^{\circ}$ C. En aquestes condicions el temps de duplicació és de 8 a 10 hores [68], que és extraordinàriament llarg en comparació amb *Escherichia coli*, que es duplica en 20 minuts.

La membrana citoplasmàtica està composta per fosfatidilglicerolfosfats (70%), glicolipidsulfats (20%) i esqualè amb enllaços èter [73]. Té una paret cel·lular composta principalment per proteïna amb una petita proporció d'hidrats de carboni, sense peptidoglicans, lípids ni àcids teitoics com les parets d'altres bacteris [68].

A més de la bacteriorodopsina en la cèl·lula hi ha altres pigments [74]:

- Bacterioruberina: és un pigment transmembrana β -carotenoide que té com a funció protegir a la cèl·lula front a agents nocius per al DNA com radiacions ionitzants o agents oxidants [75]. És el pigment responsable de la coloració vermella [2, 68].

Introducció

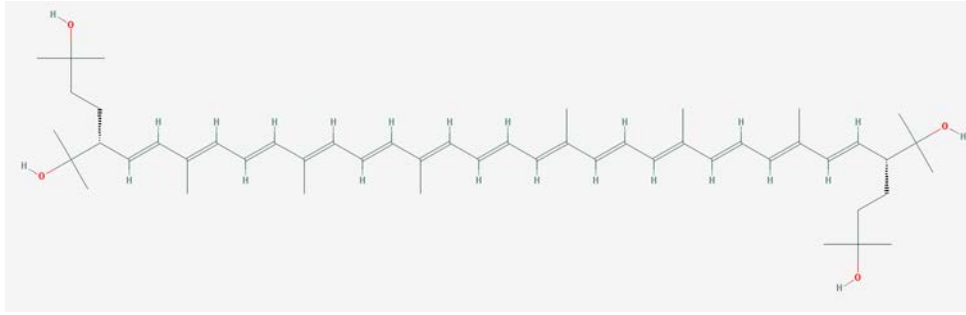
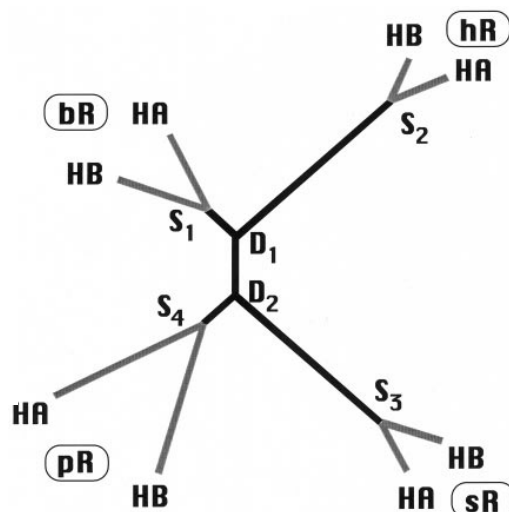


Fig. 5. Estructura de la bacterioruberina (PubChem CID 6441.558).

- Halorodopsina (hR): proteïna transmembrana amb un retinal unit. Forma trímers i quan és activada per la llum bombeja ions de clor des de l'espai extracel·lular al citoplasma per a mantenir el balanç osmòtic durant el creixement cel·lular. La seva estructura s'ha obtingut a una resolució de 1,8 Å [76].
- Rodopsina sensorial I (sR): proteïna transmembrana amb un retinal unit que actua com a fotoreceptor atraient [77, 78].
- Rodopsina sensorial II (pR): també anomenada foborodopsina. És proteïna transmembrana amb retinal i actua com a fotoreceptor per a repel·lir la radiació blava-verda [77, 78]. Les dues rodopsines sensorials són les encarregades de la fototaxis, actuant guiant direccionalment l'arqueobacteri cap a intensitats de llum adequades per al funcionament de l'organisme, fugint de la llum UV i movent-se cap a regions amb una alta intensitat de llum taronja.

Fig. 6. Arbre filogenètic usant dos sets de quatre proteïnes ortòlogues (bR, hR, sR i pR) de dos espècies de diferents gèneres, *H. salinarum* (HB) i *Haloarcula vallismortis* (HA). La especiació de cada ortòleg està indicat amb S₁-S₄. Amb D₁ i D₂ es marquen els dos esdeveniments de duplicació gènica.



Les quatre arqueorodopsines (bR, hR, sR i pR) conserven completament 16 aminoàcids en diferents espècies, 10 dels quals són de la butxaca d'unió del retinal. Estudis filogenètics de rRNA 16S mostren que les quatre arqueorodopsines deriven d'una rodopsina ancestral. La filogènia proposada es mostra a la Fig. 6 [65].

4. Membrana púrpura.

a. Característiques generals.

Els fragments de MP es reparteixen homogèniament per la membrana citoplasmàtica de l'arqueobacteri, podent arribar a ocupar el 50% de la superfície total [3].

Els pedaços de MP tenen una forma regular i per microscòpia electrònica s'ha determinat que tenen un diàmetre de 0,5-1 μm i 45 Å de gruix [4, 68]. Altres estudis determinaren que aquests fragments de MP posseeixen una estructura paracristal·lina que consisteix en una xarxa hexagonal perfecta de trímers de bR [79]. A la bibliografia es suggereix la presència de bombaments (curvatura de la PM formant estructures semblants a cúpules) degut a interaccions electrostàtiques [80]. L'espai no ocupat per MP està format per lípids, en una proporció 75%:25% en pes proteïna:lípid [4]. Cada monòmer està envoltat per entre 6 i 10 molècules de lípids [73, 81].

Els monòmers formen trímers degut a interaccions estables de caràcter hidrofòbic entre hèlix transmembrana de diferents monòmers. Aquestes interaccions són específiques, entre l'hèlix B d'un monòmer i les hèlixs C i E del contigu [82]. La formació de trímers té importància funcional ja que si es desagreguen la eficiència del transport de protons decau [83]. A més, els trímers asseguren la correcta estructura de les hèlixs en conformació α_{II} (veure apartat 5) i confereixen major estabilitat a la bR front a altes temperatures [84] degut a la major compactació de les hèlixs en el trímer [85]. Addicionalment, la formació dels trímers afecta a les formes isomèriques del retinal [86].

b. Síntesi de la bacteriorodopsina.

La bacteriorodopsina està formada per la part proteica, anomenada bacterioopsina (bO) i un retinal unit covalentment a la Lys216. La bO està codificada pel gen *bop*, la transcripció del qual està activada per la unió del sensor d'oxigen Nif1 al gen *brp*, gen que forma part del clúster on està inclòs el gen *bop*. En condicions de microanaerobiosi es fa necessària la formació de MP i és quan aquest sensor s'uneix [87].

Introducció

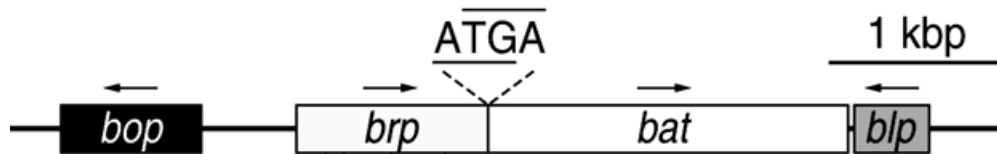


Fig. 7. Estructura del clúster del gen *bop*. Les fletxes indiquen la direcció de la transcripció dels gens. Les pautes obertes de lectura de *brp* i *bat* estan solapades. El gen *bat* regula la biogènesi de la BR ja que és necessari per a l'expressió de *bop* i *brp*. El gen *brp* sembla regular la síntesi del retinal, així que *bat* seria responsable de coordinar la regulació de l'expressió de l'apoproteïna i del retinal. S'ha suggerit que *brp* i *bat* són cotranscrits, així que *bat* regularia positivament la seva pròpia síntesi a la vegada que la de Brp i bO. Aquesta retroacció (*feedback*) positiva seria important per al ràpid increment de bO i retinal quan són necessaris [87].

El gen *bop* és transcrit a un mRNA que és traduït a un precursor de la bO, amb 13 residus en l'extrem N-terminal i un aspàrtic en el C-terminal addicionals respecte a la bO madura. Abans de ser inserida en la membrana es duu a terme la proteòlisi d'aquests fragments [72]. Aquests 13 aminoàcids són producte de la traducció de la seqüència de la regió 5' del mRNA i no tenen importància en si, com a aminoàcids. Aquesta seqüència està formada per repeticions de 9 nucleòtids i és important perquè formen un bucle, necessari per a la unió del ribosoma al mRNA [88].

La bO sintetitzada es va introduint a la membrana citoplasmàtica sense cap ordre ni estructura paracristal·lina, formant la anomenada membrana bruna. La síntesi de la bO regula la síntesi del retinal, concretament indueix la ciclació del licopè a β -carotè que donarà lloc al retinal. El retinal acaba unint-se a la bO de la membrana bruna i una vegada units comença a ordenar-se la bR formant la membrana púrpura [89].

5. La bacteriorodopsina.

La bR és una proteïna de 248 aminoàcids amb un pes molecular de 26 KDa [6, 72] on abunden els residus hidrofòbics i aromàtics i no trobem ni histidines ni cisteïnes. L'estructura de la bR consta de 7 hèlixs transmembrana, anomenades de la A a la G, unides per bucles citoplasmàtics i extracel·lulars i amb l'extrem N-terminal en el costat extracel·lular i el C-terminal en el citoplasmàtic [6]. Com *H. salinarum* té paret, la bR no està en contacte directament amb el medi extracel·lular, sinó amb l'espai periplàsmic. A meitat de l'hèlix G s'uneix el retinal a la bR a través d'una Base de Schiff (BS) protonada, estant el retinal en una posició quasi perpendicular als eixos de les hèlixs.

Les hèlixs de la bR són una mica peculiars estructuralment parlant, ja que mentre la majoria de proteïnes tenen les hèlixs en conformació α_I , en la bR trobem una mescla d' α_I i α_{II} [90]. Aquestes hèlixs són menys compactes i a més aquesta configuració aporta una major estabilitat al retinal en la conformació *13-cis*, necessària per al funcionament de la bR.

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

Taula 1. Característiques diferencials dels dos tipus d'hèlix α presents en la bR.

6. Retinal.

a. Característiques.

El retinal és una molècula poliènica de 16 carbonis amb dobles enllaços conjugats units a un anell β -ionona. És un cromòfor unit covalentment a la lisina 216 [91] per una Base de Schiff protonada [2] i la seva funció és l'absorció de la llum, iniciar els canvis conformationals en la bR que conduiran al transport de protons i també és el responsable del color púrpura de la bR. El retinal unit forma un angle de 20° respecte al pla de la membrana citoplasmàtica [92] dividint la proteïna en dues parts, una citoplasmàtica i l'altra extracel·lular.

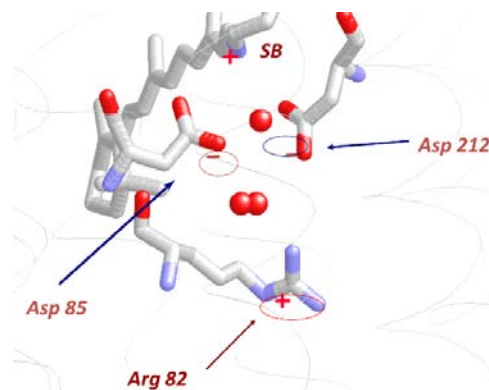


Fig. 8. Representació del retinal en la butxaca d'unió del retinal (*retinal binding pocket*, RBP).

La capacitat d'absorció del retinal és deguda als dobles enllaços conjugats de la cadena poliènica, ja que hi ha electrons en orbitals π capaços d'absorbir l'energia d'un fotó. La longitud d'ona a la que presenta el màxim d'absorció està influïda per una sèrie de factors, que són, en ordre d'importància [93]:

- i) La presència d'un contraïó prop de la BS.
- ii) El camp electrostàtic induït per aminoàcids carregats o polars situats prop del retinal.
- iii) La torsió del cromòfor.
- iv) Els ponts d'hidrogen.

Introducció

Per això la longitud d'ona del màxim d'absorció del retinal no és igual dissolt en etanol (380 nm) que unit a la proteïna. Quan s'uneix a la bO la càrrega positiva de la BS s'estabilitza mitjançant ponts d'hidrogen directes o indirectes amb el contraió format pels aspàrtics 85 y 212, l'arginina 82 i molècules d'aigua [81, 94-97]. La influència d'aquests residus sobre el retinal fa que unit a la proteïna el màxim d'absorció estigui en 558 nm. Aquest fenomen de desplaçament del màxim d'absorció degut a la interacció amb la proteïna s'anomena *Opsin Shift* (OS). Hi ha més factors que influeixen en l'absorció però en el retinal són sempre constants. Utilitzant anàlegs del retinal s'ha vist que la longitud d'ona del màxim d'absorció també està influïda per la deslocalització de les càrregues, que pot ser afectada per exemple amb més enllaços dobles a la cadena poliènica o amb anells donadors d'electrons d'orbitals π [98, 99].

A més de ser el responsable de l'absorció directa de la llum i iniciar el transport de protons, el retinal té un paper important en la compactació de les hèlixs i en la estabilitat estructural de la bR [100, 101].

b. Adaptació llum-fosc.

Degut a la presència de diferents formes isomèriques del retinal, podem trobar la bR en dos formes diferents en estat basal, l'anomenada forma adaptada a la foscor (DA, *dark adapted*) i l'adaptada a la llum (LA, *light adapted*) [102]. Les dues formes es diferencien espectroscòpicament per tindre uns màxims d'absorció en longituds d'ona característiques, 558 nm per a la forma DA i 568 nm per a la LA.

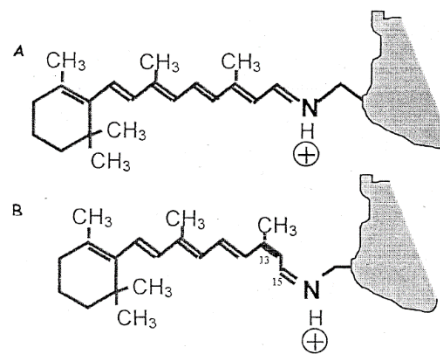


Fig. 9. Estructura de la molècula de retinal on A és la conformació *tot-trans* i la B és la conformació *13-cis, 15-syn*.

En la forma LA el retinal està en la conformació *tot-trans* [103] i en la forma DA hi ha les dues conformacions del retinal en una proporció 2:1 de *13-cis, 15-syn:tot-trans*. Aquesta proporció entre els isòmers varia depenent de les característiques de la bR, com per exemple en la forma monomèrica de la bR on s'ha vist una major proporció de la conformació *13-cis* en la forma DA (72%) que en els trímers (66%), demostrant el paper dels trímers en la estabilització de l'isòmer *tot-trans* i que l'isòmer *13-cis* és més estable energèticament [86]. Així, per a mantenir la correcta proporció d'isòmers del retinal cal l'organització de la bR en trímers que, a més, regula la velocitat d'adaptació a la foscor dels monòmers ja que aquesta es produeix tres vegades més ràpid quan estan en forma

de monòmers que en trímers [104]. La unió del retinal a la bO es produeix de manera cooperativa [105].

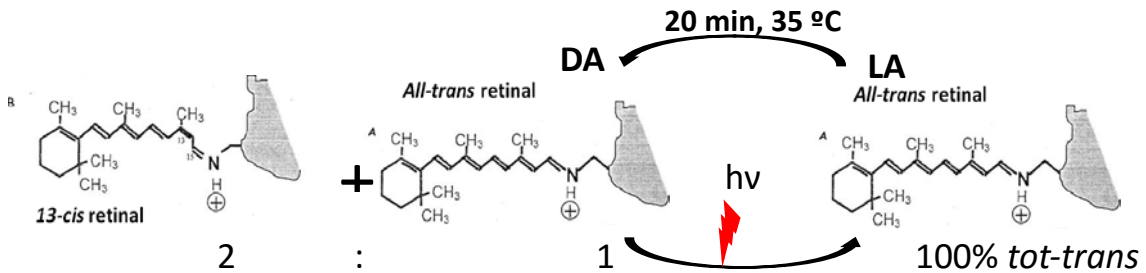


Fig. 10. Si il·luminem la forma DA de la bR uns minuts amb llum blanca s'obté la forma LA. Per a recuperar la forma DA s'ha de mantenir a les fosques durant uns 20 minuts a 35 °C, dependent del pH [102, 103].

Les propietats de les formes depenen de diversos factors, alguns dependents de la bR i altres independents. Els factors que no depenen de la bR són característiques del medi extern com la temperatura o el pH. Quan més alta és la temperatura, major és la velocitat d'adaptació a la foscor i viceversa, sent per exemple de 20 minuts a 35 °C i de 30 hores a 4 °C [103]. A partir dels 40 °C, a més de disminuir el temps d'adaptació, augmenta la proporció de molècules en conformació *tot-trans* [86].

Una altra característica del medi que influeix és el pH, on per baix de pH 7,0 la velocitat d'adaptació augmenta, entre pH 7,0 i 8,5 no varia i per damunt de pH 8,5 la velocitat disminueix [103]. A més, la proporció d'isòmers es veu afectada a pHs àcids, reduint la proporció de *tot-trans* de la forma LA, com per exemple a pH 2,0 hi ha sols un 55% de *tot-trans*, un 35% de *13-cis*, un 7% d'*11-cis* i un 3% de *9-cis*. A la forma DA en canvi, per sota de pH 4,0 es produeix un increment de *tot-trans* fins a un 58% d'aquest i un 42% de *13-cis*. En la forma DA a pHs bàsics no estan afectades significativament les proporcions d'isòmers, però per damunt de pH 10,0 en LA disminueix la quantitat de *tot-trans* fins a un 82%, amb un 4% de *13-cis* i un 14% d'*11-cis*.

L'augment de la velocitat a pHs àcids es deu a que la velocitat d'adaptació a la foscor és proporcional a la quantitat de forma blava [106]. Es proposa que el mecanisme d'adaptació a la foscor és via protonació transitòria del Asp85, ja que al protonar-se es trencaria el pont d'hidrogen amb la Base de Schiff augmentant la deslocalització dels electrons del retinal "alliberant" la BS, de manera que es podria produir la isomerització.

Introducció

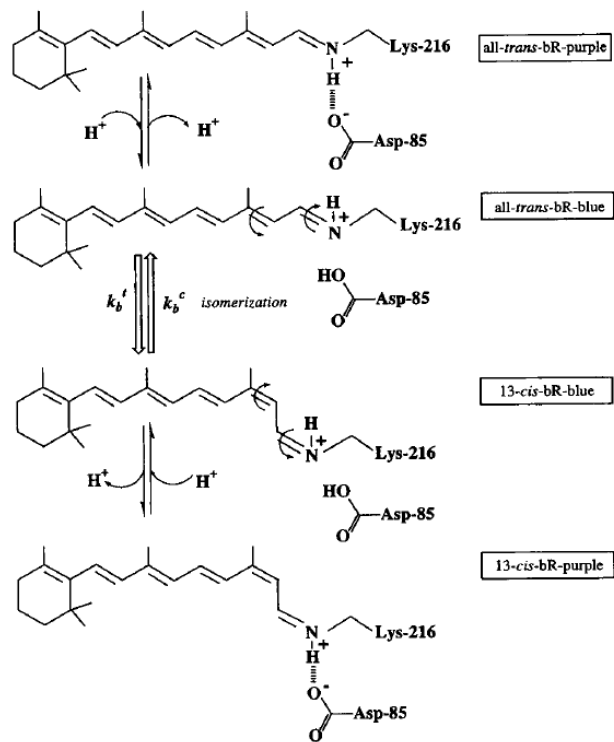


Fig. 11. Representació del mecanisme de l'adaptació a la foscor. La transició entre *tot-trans* i *13-cis* ocorre via protonació d'Asp85, amb la formació transitòria de membrana blava [106].

La bR es presenta en aquestes dues formes (DA i LA) perquè la forma DA és la de bR relaxada, on la bR està inactiva i no pot bombejar protons. Al rebre llum la bR passaria a la forma activa, la LA, amb capacitat per transportar protons [103].

7. El fotocicle.

L'absorció d'un fotó per part del retinal i la conseqüent isomerització comença una cadena de canvis estructurals en la bR, anomenada fotocicle, que té com a conseqüència l'expulsió d'un protó a l'espai extracel·lular i la captació d'un altre en el costat citoplasmàtic.

S'anomena fotocicle perquè els canvis que es produeixen a la proteïna a l'absorbir un fotó tenen caràcter cíclic. La bR tarda uns 10 ms en completar tot el fotocicle a temperatura ambient i, si les condicions d'il·luminació són adequades, torna a començar.

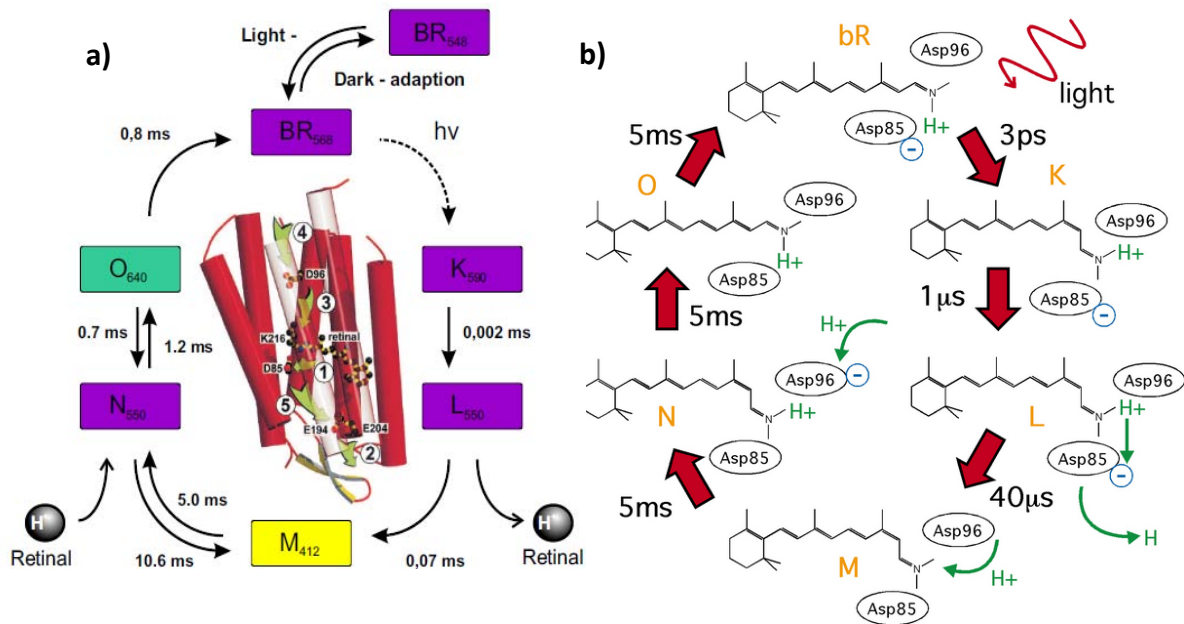


Fig. 12. a) Esquema del fotocicle de la bR. Els diferents estats pels que passa la bR durant el fotocicle se'ls anomenen intermediaris, fotointermediaris o fotoproductes i tenen un màxim d'absorbència a una longitud d'ona característica [107]. A l'esquema s'indica el seu nom, els temps de formació, la longitud d'ona d'absorció màxima, el color de la bR i l'alliberament i captació dels protons. Per a que comenci el fotocicle primer la proteïna s'ha d'adaptar a la forma activa, l'adaptada a la llum. Figura adaptada de [108]. **b)** Esquema dels canvis conformationals del retinal i de la protonació i desprotonació de la BS, Asp85 i Asp96 durant els diferents intermediaris del fotocicle. Amb l'absorció del fotó el retinal passa de conformació *tot-trans* a *13-cis, 15-anti*, sent aquesta isomerització la que dispara la sèrie de canvis que es produiran durant el fotocicle. En el pas de N a O el retinal torna a la conformació inicial, la *tot-trans*. A més en l'intermediari M es produeix una reorientació de la BS que passa d'estar orientada cap a la meitat extracel·lular a estar-ho cap a la citoplasmàtica.

Intermediaris:

A continuació s'explicarà breument les característiques més importants de cada fotointermediari.

- **BR:** És l'estat basal de la proteïna abans de començar el fotocicle. És la forma LA, així que el retinal estarà en la conformació *tot-trans*. La BS està protonada [109, 110].
- **J:** Apareix 500 fs (femtosegons) després de l'absorció del fotó pel retinal, el que el fa molt difícil de detectar. En aquest intermediari la isomerització del retinal i l'entorn de la BS és molt similar a la de l'estat basal, però es produeixen canvis en la densitat electrònica entre els enllaços C=C i C-C del retinal i també possiblement es produeix una mica de torsió del retinal.
- **K:** el pas de J a K té lloc als 3 ps (picosegons) i està marcat per la isomerització del retinal de *tot-trans* a *13-cis, 15-anti* (és diferent a la forma *13-cis, 15-syn* de la forma adaptada a la foscor) [111-113]. En aquest intermediari la BS continua protonada. Com

Introducció

a conseqüència de la isomerització del retinal es produeixen canvis en la distribució electrònica [109, 114].

- **L:** En aquest intermediari es produeixen canvis en l'entorn del Asp96 [115, 116], la naturalesa dels quals es van atribuir inicialment a la desprotonació transitòria del Asp96 [117-119], demostrant-se més endavant que en realitat es tractava d'un canvi en l'entorn degut al moviment de molècules d'aigua en l'espai que hi ha entre l'aspàrtic i la BS a causa de la isomerització del retinal [120]. Per a deixar espai al retinal en la seva nova conformació es produeix una relaxació de les hèlixs [121].

- **M:** en aquest intermediari la BS es desprotona [122, 123]. Estudis de fotòlisi de llampec detectaren la protonació/desprotonació de dos grups carboxílics i els primers possibles residus proposats foren el Asp85, el Asp96, el Asp212 i el Glu204. Més endavant es va veure que el que es protonava era un aspàrtic i que hi havia involucrat un glutàmic [124], sent finalment esbrinat que el residu que rebia el protó de la BS era el Asp85 [117, 118, 125, 126], en compte del Asp212 que proposaven alguns grups [119, 127]. La cadena de protonacions i desprotonacions que tenen lloc són els passos 1 a 3 de la figura anterior [49, 128].

Estudis de fotòlisi de llampec mostren que la formació de l'intermediari M s'ajusta a una corba biexponencial, indicant que és una reacció bifàsica, en la que intervenen dos espècies. Per això es parla de dos subintermediaris: M_1 , amb un màxim d'absorbància a 412nm, i M_2 , amb un màxim en 404 nm [129, 130]. El pas de M_1 a M_2 és irreversible.

- **M_1 :** La formació de M_1 ve marcada per la desprotonació de la BS i la protonació del Asp85, que indueix l'alliberació d'un protó cap a la part extracel·lular.

- **M_2 :** El retinal canvia la seva accessibilitat canviant la seva orientació del costa extracel·lular cap al citoplasmàtic [40, 130, 131]. Es va proposar el model C-T segons el qual la BS canviava la seva accessibilitat cap al costat citoplasmàtic una vegada desprotonada per a poder tornar a protonar-se en el pas de M a N [132]. Però a més del canvi en la orientació es produeixen canvis estructurals [125, 133-135] en hèlixs, girs reversos i aminoàcids aromàtics [136]. Més concretament, aquests canvis consisteixen en l'obertura de l'espai citoplasmàtic, que permet l'entrada de molècules d'aigua provocant la disminució del pK_a del Asp96 en l'intermediari N [137-141]. Es van veure canvis estructurals que involucraven als bucles citoplasmàtics E-F i/o C-D [142, 143]. Aquests canvis d'obertura es devien a una torsió en les hèlixs F i G [140, 144-146] i a la rotació de l'hèlix F en sentit contrari a les agulles del rellotge [147].

Aleshores, de L a M_1 es produeix la desprotonació de la BS, de M_1 a M_2 la BS es reorienta cap al costat citoplasmàtic i en un nou intermediari M_2' el protó s'allibera a l'espai extracel·lular, produint-se una relaxació del retinal exposant la BS cap a la zona citoplasmàtica [148].

- **N:** En el pas de l'intermediari M_2 a N es produeix la reprotonació de la BS a partir del Asp96 [118, 149-152]. La desprotonació del Asp96 es produiria degut a la disminució del seu pK_a quan entren molècules d'aigua gràcies a l'obertura de les hèlixs en la part citoplasmàtica durant M_2 . Per una altra part, la desprotonació del grup alliberador del protó durant M indueix la disminució del pK_a de la BS. Aquests dos fenòmens originen el pas del protó des del Asp96 fins la BS. Aquesta reprotonació té lloc per la formació transitòria d'una xarxa de ponts d'hidrogen per part de molècules d'aigua entre el Asp96 i la BS [54, 116, 127, 144, 145, 153]. En el subintermediari N' el Asp96 es reprotonaria [154].

- **O:** En el pas de N a O el retinal es reisomeritza per a obtenir de nou la conformació *tot-trans* i és quan Asp96 es reprotonava segons la descripció clàssica [151, 152, 155], opció que perd força front a la reprotonació en N' [156, 157]. El grup que cediria el protó al Asp96 no està clar i s'ha proposat que podria ser el Asp38 [158] o els Asp36, 38, 102 i 104 actuant com a antena per a atraure als protons, sent el Asp36 el que donaria el protó al Asp96 [159]. Aquest procés estaria regulat per l'extrem C-terminal [160]. Durant aquest intermediari el Asp85 continua protonat i és en el pas de O a BR quan el Asp85 es desprotona cedint el protó al clúster d'aigües de l'àrea d'alliberament del protó [49, 128].

El pas d'un intermediari a un altre està en equilibri, com sol ocórrer en les reaccions bioquímiques. Estudis termodinàmics i de fotòlisi de llampec indiquen que tots els passos són reversibles excepte el pas de M_1 a M_2 i el pas de O a BR on es produeix una disminució de l'energia lliure de Gibbs de 17 KJ/mol i 11,4 KJ/mol respectivament, el que tornaria irreversibles aquests passos [40, 161]. També s'ha proposat la irreversibilitat del pas de BR a K [161].

8. Forma blava i forma vermella de la BR.

Si s'acidifica suficientment el medi de la BR, el Asp85 es protona estant la BR en estat basal i la proteïna passa de ser púrpura a tenir color blau [126]. Quan el pH baixa del valor de pK_a aparent del Asp85 (que a 150 mM KCl és de 2,6), aquest es protona i el màxim d'absorbància es desplaça cap al vermell, de 558 nm a 603 nm i adquireix color blau. La forma blava té el fotocicle alterat, ja que al tenir el Asp85 protonat en estat basal l'intermediari M està absent causant la pèrdua de capacitat de bombejar protons [162].

Si s'incrementa el pH del medi per damunt d'11,8 i es disminueix ràpidament, s'obté una espècie amb el màxim d'absorció a 440 nm [163] que es forma degut a que la Base de Schiff ha sigut exposada al medi aquós. Per damunt d'un pH d'11,5 apareix una forma vermella que té el màxim d'absorció a 460 nm. Aquesta forma vermella apareix per la

Introducció

desprotonació de la BS, que és reversible excepte per damunt de pH 12,0 quan la BR comença a desnaturalitzar-se irreversiblement [164].

9. El camí dels protons.

La protonació del Asp85 per part de la Base de Schiff acaba donant lloc a l'expulsió d'un protó a l'espai extracel·lular. En la bR el protó captat al citoplasma no és el mateix que l'expulsat a l'exterior, ni tan sols l'expulsat és el mateix que cedeix la BS. Durant el fotocicle es produeixen una sèrie de transferències de protons al llarg de la bR.

a. Acoblament entre el Asp85 i el grup X.

L'estudi del camí que segueix el protó des de la BS fins a l'exterior és llarg i amb controvèrsia i es pot fer un recorregut històric en l'abordament de la qüestió. En la investigació de l'alliberament del protó es va deduir l'existència d'un acoblament en l'estat basal entre el pK_a del Asp85 i el d'un grup desconegut que anomenaren X' [106, 165], el qual podria ser el grup alliberador del protó, anomenat grup X. Segons aquest model, l'estat de protonació i el pK_a d'ambdós grups influïrien mútuament entre ells, tal com es representa a la Fig. 13.

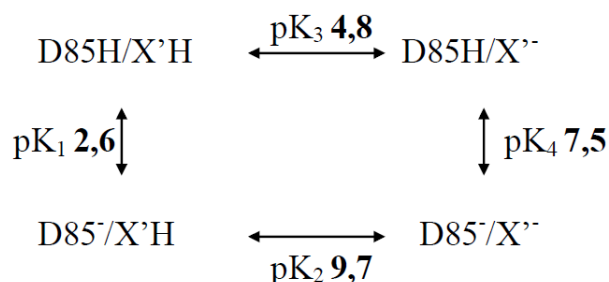


Fig. 13. Esquema del model d'acoblament entre el pK_a del Asp85 i el grup X en estat basal [165].

Com durant el fotocicle el Asp85 es protona a la vegada que el grup X es desprotona, l'acoblament dels pK_a semblava produir-se també durant el fotocicle. La protonació del Asp85 provocaria la disminució del pK_a del grup X de 9 a 5,8 [166] i aquest es desprotonaria alliberant el protó a l'exterior. Com l'acoblament seria recíproc, la desprotonació del grup X augmentaria el pK_a del Asp85 per evitar la seva desprotonació fins al final del fotocicle.

Quedava per solucionar com podien interaccionar dos grups que estaven tan allunyats. Degut a la presència d'algunes molècules d'aigua prop de la BS es va suggerir que participarien activament en la translocació de protons [167, 168]. Amb la detecció de més molècules d'aigua es va veure que connectaven la BS amb la part extracel·lular mitjançant una complexa xarxa de ponts d'hidrogen on participen residus i molècules d'aigua [94, 95, 97, 144, 148, 169].

La isomerització del retinal de *tot-trans* a *13-cis* produeix un canvi en l'entorn de la BS afectant a la xarxa de molècules d'aigua que acaba produint la desprotonació del grup X [170]. Quan el Asp85 es protona en M, aquest trenca la interacció amb una molècula d'aigua, cosa que produeix una reorganització de les molècules d'aigua. Aleshores la Arg82 es mou cap al costat extracel·lular [171], moviment que disminuiria el pK_a del grup X alliberant el protó. També es va suggerir que l'Arg82 al moure's produiria un canvi conformacional del Glu204 induint la separació dels glutàmics i aspàrtics i el canvi de pK_a del Glu, que es desprotonaria [145].

b. Identificació del grup X.

Quan el medi està em valors del pH entre 5 i 3 el grup X no pot desprotonar-se durant l'intermediari M ja que el medi està a un pH inferior al seu pK_a (5,8 en M). Aleshores es produeix una inversió en l'ordre d'entrada i sortida del protó. Ja no s'expulsa el protó al costat extracel·lular durant M i es capta un nou protó al costat citoplasmàtic en el pas de N a O, sinó que el protó és alliberat en el pas de O a BR i captat directament des del Asp85 [106, 166, 172].

Es va postular que aquesta inversió en l'ordre d'alliberament i captació del protó també devia ocórrer quan el grup X estigués afectat. Mutants de Arg82 on s'abolia la seva càrrega positiva també presentaven l'ordre invers de captació i alliberament, pel qual al principi es va considerar Arg82 com a grup X [111, 172, 173].

També es van proposar altres residus que podien ser el grup X ja que es va observar el mateix efecte en mutants que eliminaven la càrrega negativa del Glu204 [172, 174, 175] i del Glu194 [95, 176], proposant-se també que el conjunt d'ambdós residus podrien ser el grup X.

Una xarxa de molècules d'aigua uneix la BS, Arg82 i els glutàmics 194 i 204, pel que es va suggerir que el grup X seria una molècula d'aigua d'aquesta xarxa [177-179]. Després de fer-se moltes mutacions i sortir molts possibles candidats a ser el grup X es va considerar que el grup X no fos cap grup en concret sinó un complex format pels glutàmics 194 i 204 i una molècula d'aigua coordinada entre ambdós. Així, es va deixar de parlar de grup X per a parlar de grup alliberador del protó (PRG, *Proton Release Group*).

Arg82 no és considerada com a part del PRG ja que la seva mutació produeix la inversió en l'ordre d'alliberament/captació però no perquè sigui part del PRG, sinó perquè es trenca la continuïtat de ponts d'hidrogen que comuniquen el Asp85 i el PRG [180]. Si l'absència de la càrrega positiva de Arg82 pogués ser substituïda per ponts d'hidrogen alternatius, mantenint la comunicació entre el Asp82 i el PRG, no es podria disminuir el pK_a del PRG, ja que açò és causat per l'apropament de Arg82 [169].

Introducció

En cas d'inhabilitació del PRG, o per treballar a pHs àcids, es produeix la inversió del transport, i si el mutant causant de la inhabilitació és la mutació de Glu204 es produeix la protonació transitòria d'algun glutàmic o aspàrtic en l'intermediari O [181]. En els mutants E194Q i E204Q el Asp212 és protonat des del Asp85 al final del fotocicle [182, 183]. Segons aquestes dades, quan el PRG està inhabilitat el protó aniria del Asp85 al Asp212 i d'aquí a l'exterior i es formaria un nou subintermediari anomenat O' on el Asp212 estaria protonat i el Asp85 desprotonat [182]. A més la formació d'aquest subintermediari en els mutants E194Q i E204Q depèn de Cl⁻, que actuaria de contraió de la BS [184].

c. De la Base de Schiff al medi extracel·lular.

Una vegada identificada la importància de les molècules d'aigua en l'alliberament del protó al medi extracel·lular, es posa en un primer pla la importància de l'estudi de les molècules d'aigua internes de la bR i el seu paper en el funcionament i estructura d'aquesta. Per a estudiar-les han sigut importants les tècniques de difracció de raigs X, FTIR i modelització molecular.

La mutació de nombrosos residus de la zona del PRG i simulacions de modelització molecular han permès identificar que el protó està deslocalitzat en una zona on hi ha 5 molècules d'aigua formant una xarxa amb 9 residus de la bR: Tyr57, Pro77, Tyr79, Arg82, Tyr83, Ser193, Glu194, Glu204 i Thr205. La fluctuació del protó en aquest clúster explica perquè hi ha una varietat tan gran de residus que al ser modificats afecten a l'alliberament del protó, ja que tots aquests residus contribueixen a estabilitzar el clúster d'aigües [185].

En l'aigua, el transport de protons té lloc per la interconversió entre cations tipus Eigen [186] i cations tipus Zundel [187], permetent així la migració en l'aigua [188]. El fet de que les molècules d'aigua estiguin confinades en cavitats de la proteïna fa que les transferències de protons no siguin aleatòries.

El mecanisme molecular proposat és el següent (Fig. 14.a): la isomerització del retinal trenca les connexions del pentàmer d'aigües i aspartats, que junt a l'enllaç d'hidrogen "penjat" serveixen com a reservori d'energia d'entalpia per a estabilitzar la BS protonada [189]. Per tant el trencament dels ponts d'hidrogen redueixen el pK_a amb la conseqüent transferència del protó de la BSP (Base de Schiff protonada) al Asp85. La nova ordenació passa a estabilitzar el Asp85 protonat. El moviment de Arg82 causat per la protonació d'Asp85 contribueix a la solvatació del clúster d'aigües protonat. Degut a interaccions electrostàtiques, l'Arg82 redueix el pK_a del PRG de 9,5 a 5,3 afavorint la seva desprotonació. L'entalpia del procés seria adquirida per la formació de nous ponts d'hidrogen, probablement entre W404, Arg82, Glu194 i E204, tal com es veu a la figura 14.b. [49].

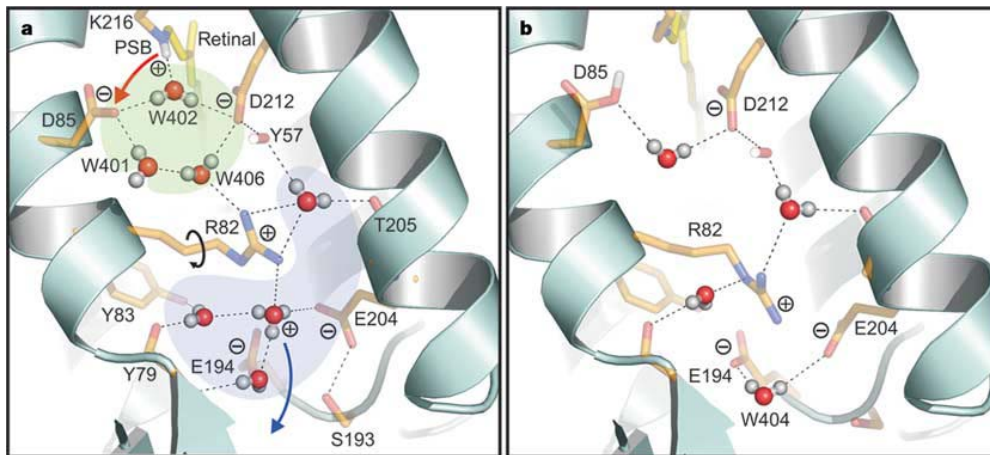


Fig. 14. Representació dels clústers d'aigua del costat extracel·lular. a) Molècules d'aigua en estat basal. La BS està protonada i interacciona amb el Asp85 desprotonat a través de l'aigua W402. El Asp85, Asp212 i les tres molècules d'aigua formen un pentàmer (en verd) que connecta amb la càrrega positiva de Arg82. Arg82 separa aquest pentàmer del PRG (en blau), on es trobaria el protó deslocalitzat en la xarxa de ponts d'hidrogen entre aigües i residus polars. La isomerització del retinal causaria que en el pas de L a M la BS protona al Asp85 (fletxa vermella) causant el trencament del pentàmer. Com Arg82 perd la interacció amb el pentàmer, es reorienta cap a l'exterior empenyent el protó deslocalitzat cap a l'exterior (fletxa bava). En b) està representada la situació dels clústers d'aigua en l'intermediari M. El pentàmer no es detecta, l'Arg82 està orientada cap al PRG i la xarxa del PRG està trencada. Figures obtingudes de [49].

A la Fig. 14 es veu com en M es trenca la interacció entre Glu204 i Ser193, però estudis més recents proposen que el mecanisme no seria l'indicat a la figura 14.b., sinó el de la Fig. 15. Els Glu194 i Glu204 esdevenen protonats alternativament, el que debilitaria la interacció entre Glu 204 i Ser193 [128]. Aquesta interacció faria la funció de "porta" a l'exterior i al trencar-se desapareixeria la barrera que separa la cavitat proteica de l'aigua extracel·lular, permetent la sortida del protó [190].

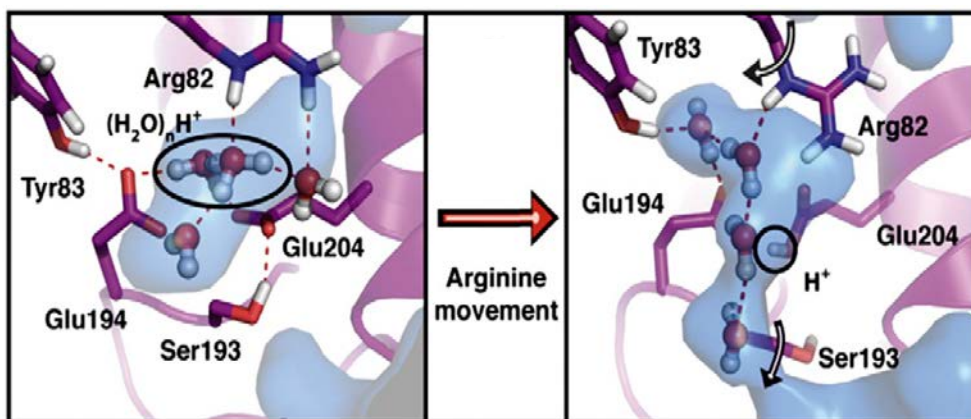


Fig. 15. Model més recent del PRG abans i després del moviment de Arg82. El protó representat en Glu204 és ressonant entre Glu194 i Glu204 [190].

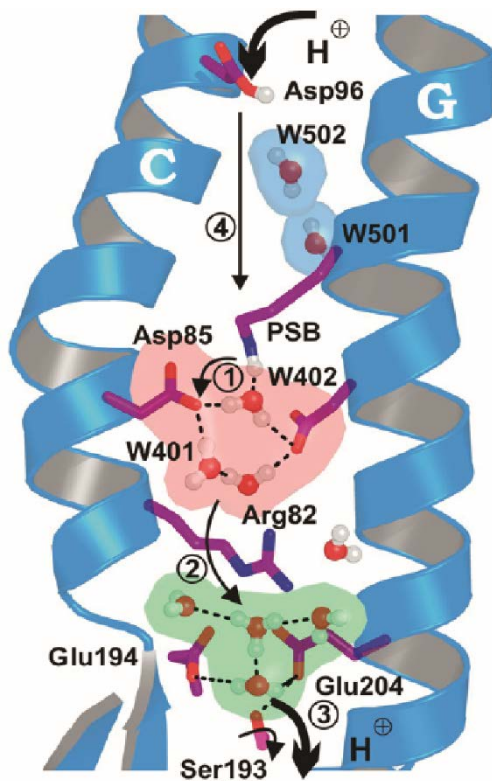


Fig. 16. Esquema dels moviments dels protons durant el fotocicle. Al següent apartat veurem que ocorre a la regió indicada com a pas 4, on la BS és reptonada per Asp96 en l'intermediari N, el qual rep un protó del citosol en l'intermediari O, simultàniament a la reisomerització del retinal a *tot-trans*. L'últim pas es la reptonació del clúster d'aigües del PRG (en verd) per part del Asp85 [54].

d. Del medi citoplasmàtic a la Base de Schiff.

Tal com es representa a la Fig. 16, posteriorment a l'alliberament del protó té lloc la reptonació de la BS per part del Asp96 i la captació d'un protó del citoplasma per a reptonar Asp96. Del Asp96 a la BS hi ha 12 Å i del citoplasma a Asp96 hi ha 7 Å i a més hi ha molts pocs residus ionitzables. Degut a les grans distàncies i a l'ambient relativament hidrofòbic [144], s'ha proposat que molècules d'aigua participarien en aquestes transferències de protons [153, 169, 191, 192] i experiments de difracció de neutrons i espectroscòpics han suggerit canvis en la hidratació del canal [153, 193, 194].

Les estructures resoltes en estat basal solen mostrar dues molècules d'aigua, que no són suficients per a formar una xarxa transportadora de protons [54]. A pesar de que es coincideix bastant en que es produeixen grans canvis conformacionals, la magnitud i importància generen un debat. Per una banda hi ha treballs que postulen que els canvis conformacionals permetrien l'entrada de molècules d'aigua [154, 169, 191] o inclús que l'estat de protonació del Asp96 seria el que obriria i tancaria el canal [195]. Per altra banda, s'ha proposat en base a experiments de FTIR i simulacions de dinàmica molecular que els canvis estructurals provocarien una reordenació de tres molècules d'aigua presents al canal citoplasmàtic i que serien suficients per a construir una xarxa transportadora de protons tipus Grotthuss [54, 196].

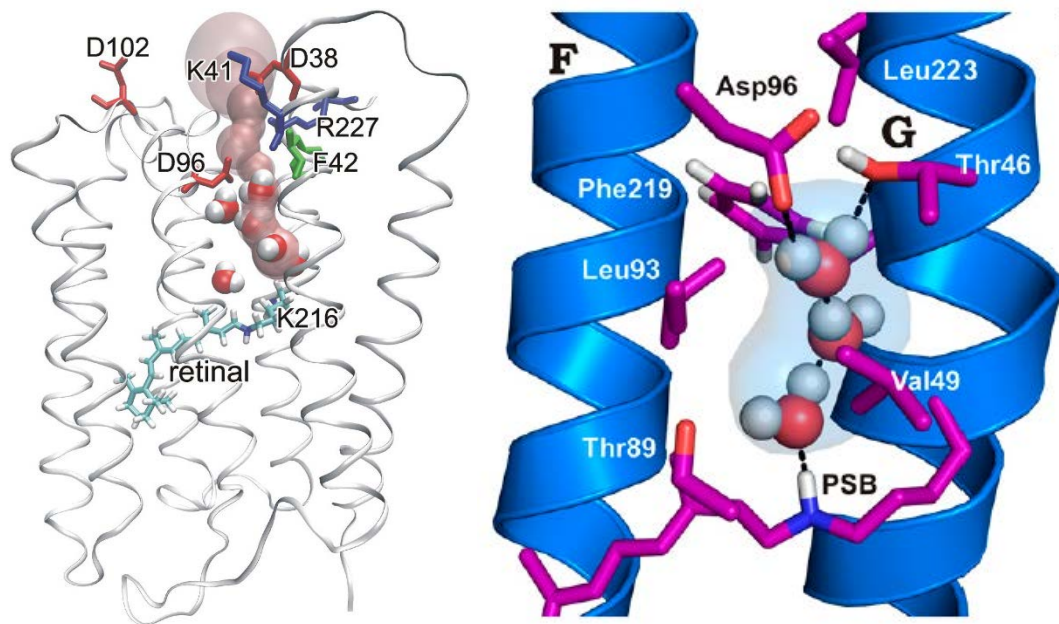


Fig. 17. a) Canal de molècules d'aigua segons els models en els que la part citoplasmàtica s'obre per a permetre l'entrada de molècules d'aigua. Figura extreta de [195] **b)** Model de les tres molècules d'aigua reordenades per a permetre la reprotonació de la BS per part del Asp96 [54].

Els canvis conformacionals que es proposen són moviments de les hèlixs. Hi ha unanimitat en el moviment de l'hèlix F i es proposa que també es mou la E i la G.

10. Moviment de les hèlixs.

Els canvis que ocorren en un principi amb la fotoisomerització del retinal es van transmetent a la proteïna, fent-se més importants cada vegada i arribant a ser canvis a gran escala d'algunes hèlixs [197-199].

Mapes de la bR obtinguts per estudis de difracció electrònica i de neutrons mostraven canvis prop de les hèlixs G i B i entre les hèlixs E i F. En 1995 [200] es va veure per SDSL (Site Directed Spin Labeling) que la marca introduïda en el residu 101 era dependent del temps i les introduïdes en els residus 72 (situat en el bucle BC) i 105 (extrem citoplasmàtic de l'hèlix C) no ho eren. Els canvis ocorrien durant el decaïment de M i recuperava l'estat inicial durant el retorn a l'estat basal. Es suggeria que es movia o bé el bucle CD o l'EF durant els canvis de protonació del Asp96.

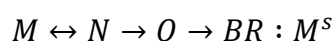
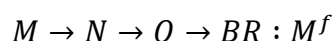
Es van usar mutants de cisteïna i se comprova si la mutació i l'addició de la marca afecta a la cinètica de l'intermediari M. Es veu que la formació de M en V101C i A160C és virtualment idèntica entre ells i respecte a WT [201] i que el marcatge tampoc afectava. La banda d'absorció en estat basal de V101C era la mateixa que WT, no hi havia desplaçament del màxim. La velocitat d'alliberament del protó mesurada amb piranina en WT era de 820 μ s, en A160C era pràcticament la mateixa i en V101C es veia lleugerament retardada (950 μ s).

Introducció

En [200] també estudien si hi ha moviment de les hèlixs en el costat extracel·lular. Per desgràcia sols estudien els canvis conformationals de G72 i es deixen a V124 i L127. No observen canvis en G72 degut a la fotoexcitació. La espectroscòpia de fotòlisi de llampec de G72 també mostra que la cinètica de formació de M no es veu afectada pel marcatge i tant la cinètica com la velocitat d'alliberament del protó són com en WT.

En quant al decaïment de M, no diuen si el marcatge ha afectat, pel qual no es pot extrapolat amb seguretat els resultats dels marcats als no marcats. El decaïment de M mesurat en aquestes condicions mostra que en G72C-MF (mutant marcat) és com en WT, en V101C-MF està alterat i A160C-MF presenta un component 10 vegades més lent que en WT. En [202] s'estudia la cinètica de M en V101C-AF a pH 7,3 i es veu un component lent (M^s) en el decaïment a més del component típic ràpid (M^f), que assignen al retorn de N a M, suggerint que el component M^s està acoblat al decaïment de N i O. És com si es donés una condició d'equilibri momentani entre M i N durant el fotocicle. Un primer component mostraria el pas de M a N i el segon seria degut al desplaçament de l'equilibri degut al decaïment de N a O i de O a BR.

Dos situacions:



Tots els passos de l'esquema anterior són teòricament reversibles, amb la fletxa s'indica la tendència principal.

La introducció de grups voluminosos en mutants de cisteïna produeix efectes menors en la desaparició de M i N si aquests estan situats en les hèlixs A, B, C, E i G però els canvis són majors si estan situats a l'hèlix F [203]. En aquest cas la vida de l'intermediari N es veia augmentada, accelerant-se el decaïment de M i retardant-se el de N. En el mutant L100C (hèlix C) l'intermediari M decau més ràpid i N més lent, cosa que atribueixen a estar situat prop de Asp96 i la mutació el pertorba. El mutant T170C (hèlix F) és igual que WT, en F156C (hèlix E) decau M més lent, sembla que inclús té dos components (Fig. 18). Tots aquests mutants comentats ara tenien el màxim d'absorció del retinal invariats respecte a WT.

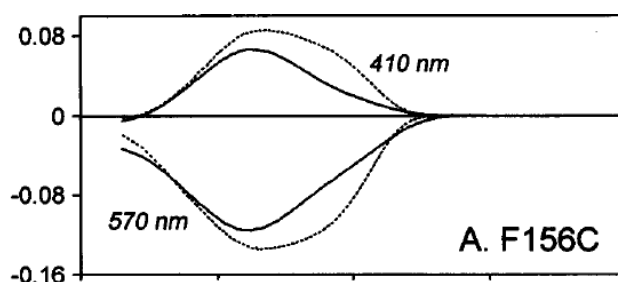


Fig. 18. La línia de punts mostra la cinètica de M del mutant F156C sense marcar. El decaïment de M presenta dos components, el ràpid (M^f) i el lent (M^s).

Amb açò proposen que si s'obre l'espai entre les hèlixs afegint grups voluminosos, el Asp96 es desprotona més ràpidament i li costa més reprotonar-se. L'obertura de l'hèlix F sembla tenir un paper important durant la segona meitat del fotocicle.

Més tard es van fer més estudis de la zona de l'hèlix F. El residu M163 és interessant perquè està situat al bucle EF i just damunt del Asp96. Per estudiar el desplaçament d'aquest residu es treballà amb el doble mutant L103C/M163C marcat [143]. En aquest doble mutant, l'intermediari O no s'acumulava o ho feia molt poc. La mutació d'algun o d'ambdós residus ho causa. La vida mitjana de N en els mutants L103C i L103C/M163C alentia el decaïment de N mentre que el mutant simple 163 el mantenia com en WT. Les distàncies mesurades per EPR en el doble mutant mesuraven una distància mitjana en la forma adaptada a la foscor de 9,5Å amb un error del 25% i arribant inclús a 17Å, suggerint la flexibilitat d'aquesta zona en l'estat basal, mentre que durant l'intermediari N la distància mitjana era de 16Å.

Estudiant l'estructura dels trímers de BR embeguts en bicapa lipídica es va veure que el bucle BC formava ponts d'hidrogen amb triglicòsids que s'intercalaven entre els bucles BC de dos monòmers [204]. El residu K129 forma un pont salí amb el sulfat d'un galactosil-3-sulfat.

Amb la intenció de continuar estudiant el bucle EF es van construir mutants de cisteïna dels diferents residus del bucle, es van marcar amb sulfhidril nitròxids i es va seguir la cinètica de desaparició de l'intermediari M. Alguns mutants com T157C o A160C mantienien una cinètica molt semblant a WT, altres com M163C o A168C tenien un decaïment de M un 50% més lent.

Fins ara s'ha vist que la zona del bucle EF es mou, s'ha mesurat desplaçament i la mutació o marcatge de diferents residus ha afectat al fotocicle de diverses maneres, com per exemple la introducció de grups voluminosos en mutants de cisteïna accelerava la cinètica de l'intermediari M. Falta encara saber com és aquest moviment. De nou amb SDSL i amb dobles mutants dissenyats per a mesurar les distàncies en el triangle format en la zona citoplasmàtica per l'hèlix B, F i G, s'intenta esbrinar el tipus de moviment [147].

Introducció

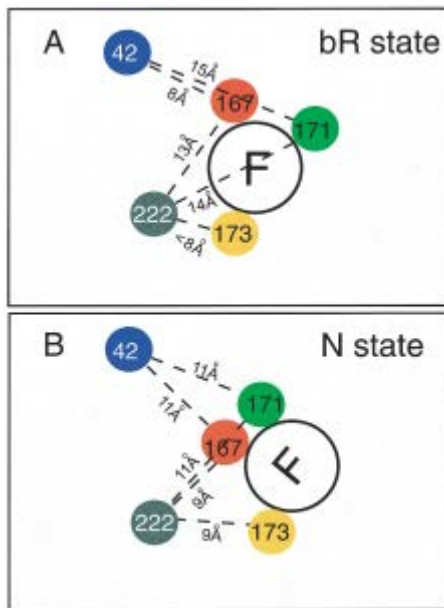


Fig. 19. En aquesta figura estan resumides les distàncies mesurades amb SDSL que van permetre elaborar un "mapa" de la posició relativa dels residus. Compararen les distàncies en l'estat basal i a l'il·luminar la proteïna. Tots els canvis tenien lloc durant la formació i decaïment de M excepte la distància entre l'hèlix F i la G, on el moviment es veia una mica abans de la formació de l'intermediari N.

Així, es va determinar que el moviment que es produïa a la zona citoplasmàtica del bucle EF consistia en la rotació de anti-horària i la inclinació cap a fora de l'hèlix F. Però es mantenen dubtes sobre aquests moviments ja que afirmaven no poder descartar que el que havien observat en realitat fos el desenrotllament de l'extrem de l'hèlix.

Per continuar estudiant aquest aspecte, es van fer altres estudis amb un enfocament diferent. Es van construir diferents dobles mutants en els quals una mutació sempre era D96N (per a atrapar l'intermediari M impedint la reprotonació de la Base de Schiff) i l'altra era una mutació a una cisteïna, situada en diferents residus del bucle EF [205]. Es va estudiar l'accessibilitat d'aquestes cisteïnes al reactiu DNTB per estudiar l'accessibilitat dels mutants al solvent i també veure si aquesta canviava de l'estat basal a l'intermediari M. L'explicació que oferiren als seus resultats era que l'hèlix F s'inclinava i a més rotava, recolzant la hipòtesi del treball anterior.

Treballs de cristal·lografia de raigs X i electrònica [191, 206-208] i de ressonància paramagnètica electrònica (EPR) [142, 143, 209, 210] han confirmat aquests moviments. Durant l'intermediari M₂ el segment citoplasmàtic de l'hèlix F es va desplaçant-se cap a fora respecte a la resta d'hèlix i rota en el sentit contrari a les agulles dels rellotges [147]. Per contra, l'hèlix G es dobla cap a l'interior.

Per estudiar si les hèlixs F i G afectaven també a l'intermediari O es va construir el mutant D85N, el qual deuria atrapar la bR en estat basal en una estructura tipus O [211]. Aleshores es van introduir una segona mutació per veure com pertorbaven aquest estat basal tipus O. Per destacar algun dels resultats, el mutant K172C no afectava a l'acumulació de l'intermediari O i l'A168C afavoria l'acumulació de N. Aquest treball va arribar a tres conclusions: 1) La part més externa del bucle EF està involucrada en la estabilització dels intermediaris M i N, 2) Les interaccions lípid-proteïna són importants en l'estabilització de N, 3) Les interaccions entre les cadenes laterals de les hèlixs G i A participen en l'acumulació de M. Altres treballs també estudiaren el paper de les interaccions entre hèlixs en la estabilització de la proteïna, suggerint un important paper de les molècules d'aigua en les interaccions entre les subunitats de cada trímer [212], ja que aquestes interaccions es veien afectades el pH, cosa que es podia explicar afegint

un paper a les molècules d'aigua en la interacció hèlix-hèlix. A més es mostrà un paper important de les hèlixs F i G per a estabilitzar l'estructura via interaccions intermoleculares.

Amb estudis de fluorescència [213] es van lligar el canvi d'accessibilitat dels residus del bucle EF al solvent i el canvi transitori en la càrrega de la superfície de la MP durant la transició de M a N, ja que es va trobar que el bucle EF presenta una transició entre dos conformacions que és dependent del potencial de la superfície. Es va aportant poc a poc més informació sobre els canvis conformacionals als bucles, regions difícils d'estudiar a nivell atòmic degut al gran desordre, especialment a la superfície citoplasmàtica.

Amb la millora de la tecnologia, es va anar estenent l'ús de simulacions en l'estudi de les proteïnes. Aquestes simulacions de dinàmica molecular (MD simulations) també es van fer servir per a intentar elucidar el paper del moviment de la regió del bucle EF. Hi ha un triple mutant, el D96G/F171C/F219L, el qual s'ha considerat que en l'estat basal presentava una conformació anàloga a N i que a pesar de que tenir aquesta conformació ja d'inici faria que durant el fotocicle no es produeixin els canvis observats en la zona de l'hèlix F, transportava protons [214]. L'estudi d'aquest triple mutant comença a aportar dades en contra dels experiments abans comentats, ja que suggereixen que els moviments en les hèlixs observats no serien necessaris, que sense ells la bR també funcionaria.

La controvèrsia però, no queda aquí. Per simulacions MD es proposa un nou mecanisme per a regular la reprotonació de la BS, que en compte de regular-se per l'obertura de les hèlix i la consegüent entrada de molècules d'aigua, seria la desprotonació del Asp96 la que causaria l'obertura de les hèlix [195]. Contradient parcialment aquests descobriments, altres estudis proposen un mecanisme diferent utilitzant simulacions MD i espectroscòpia FTIR: els canvis conformacionals que tenen lloc durant el fotocicle sols serien necessaris per a facilitar la reordenació de les molècules d'aigua que es troben a la cavitat del Asp96, formant un pont per a la transferència del protó del Asp96 a la BS [54].

La controvèrsia es va complicant. Per una banda hi ha experiments que mostren el moviment de les hèlixs. Per altra es proposa que el moviment de les hèlixs no és essencial per al funcionament de la bR. I entre els que proposen que les hèlixs han de moure's, hi ha diferents visions del paper d'aquest moviment: i) el moviment de les hèlixs causa l'entrada de molècules d'aigua fent que el Asp96 protoni la BS, ii) és la desprotonació del Asp96 la que causa el moviment de les hèlixs i l'entrada de molècules d'aigua, i iii) les hèlixs es mouen però no és necessari que entrin més molècules d'aigua, és suficient amb la reordenació de les que ja estan dins.

Introducció

La hipòtesi de que el moviment de les hèlixs no és necessari, basada en l'estudi del triple mutant D96G/F171C/F219L perd força al proposar-se que aquest mutant mantenia la funcionalitat degut a que els experiments es van fer amb uns potencials de membrana no corresponents als nadius de la cèl·lula [215].

Aquests canvis es fan més importants en N on el desplaçament de l'hèlix F es fa tan gran que no pot donar-se en totes les molècules de l'estructura bidimensional de la membrana, sinó sols a una molècula de cada trímer [141], cosa que explicaria la fotocoooperativitat de la membrana púrpura. El bucle que uneix les hèlixs E i F (bucle EF) es desplaça uns 3 Å degut al moviment principalment de l'hèlix F però també de l'hèlix E. Aquest bucle perd en els intermediaris M-N l'estructura secundària que té en estat basal degut al desplaçament i rotació de l'hèlix F, deixant els residus del centre del bucle més exposats a l'aigua del citoplasma [205].

L'estructura cristal·logràfica del mutant D85S que representa l'intermediari O (O-like) mostra que els canvis han sigut revertits en el pas de N a O i que els segments extracel·lulars de les hèlixs A, B, D i E es mouen cap a fora per a contrarestar el moviment de F i G [208]. Aquests canvis d'accessibilitat al dissolvent del costat extracel·lular al citoplasmàtic i la posterior recuperació de l'estat inicial serien deguts a un mecanisme per a assegurar la vectorialitat del transport [216].

Però hi ha opinions dispars sobre com s'assegura aquesta vectorialitat, de com és el mecanisme de *switch* (interruptor) que assegura que els protons són transportats en un únic sentit i no en el contrari. Les diferents hipòtesis de què constitueix aquest *molecular switching* s'han classificat en 5 mecanismes diferents:

- a. L'accés a la BS s'obri i es tanca per al costat citoplasmàtic o l'extracel·lular amb canvis conformacionals [131, 217].
- b. El retorn de protons es veu dificultat per canvis en la curvatura del retinal [218].
- c. La desprotonació del PRG modifica en pK_a del Asp85 impedint que reprotoni la BS [175].
- d. Canvis en les molècules d'aigua, ja sigui en el nombre o ordenació, afavoreixen el sentit correcte i dificulten el contrari [128, 219, 220].
- e. El retinal es reorienta del costat extracel·lular cap al citoplasmàtic degut a la relaxació de la seva torsió [218, 221].

Com hem vist, la importància del moviment (inclús la necessitat d'aquest) de les hèlixs per al correcte funcionament de la bR encara no ha arribat a un consens, hi ha controvèrsies i aspectes encara no aclarits, especialment en la zona citoplasmàtica de les hèlix E i F, però no exclusivament. En aquest punt una nova aproximació s'ha

proposat i ha sigut provada per a estudiar el moviment relatiu de les hèlix F i G: la construcció de dobles mutants de cisteïna situats en diferents parts de la proteïna per a formar ponts disulfur que restringeixin el moviment relatiu de les diferents parts. Aquest primer estudi mostra que la restricció del moviment entre l'hèlix F i la G comporta una bR defectuosa, amb un fotocicle afectat, el transport de protons severament disminuït i una cinètica de transport dels protons més lenta [222].

Vist que aquest enfocament ha aportat coneixements útils, en aquest treball s'estendrà el seu ús a l'estudi del moviment del costat citoplasmàtic de les hèlixs E i F i a més s'estudiarà la importància del moviment de les hèlixs al costat extracel·lular. En concret al bucle BC que és més gran que la resta i ha sigut més difícil d'estudiar, pel que el nostre mètode pot aportar llum als aspectes de la bR que romanen en els ombres.

A més, sorgeix debat entorn a si les hèlixs serien estructures rígides que segueixen un mecanisme d'interruptor mecànic oscil·lant o són estructures blanques que actuen com a un mecanisme de trinquet brownià. Alguns estudis han proposat que les hèlix de GPCR seguirien el primer mecanisme proposat, on les hèlixs que es desplacen actuen amb un mecanisme d'interruptor tipus palanca [222, 223].

Els mutants que s'estudiaran en aquest treball van ser elegits per estar situats en les zones que es volen immobilitzar i per no haver-se descrit que la mutació afecti greument al funcionament de la bR.

11. Aplicacions biotecnològiques de la bR.

En l'electrònica existeixen dues aproximacions per a la construcció i millora dels components. La primera, que a més és la clàssica, consisteix en el processament de materials "grans" per a la construcció de components cada vegada més petits. Aquest enfocament és l'anomenada aproximació *top-down* (del cim cap a baix) i és la que s'ha seguit tradicionalment per a construir els transistors de silici o en el que està tant de moda últimament: el grafè com a nou material per a tot tipus d'aplicacions. Però aquesta aproximació exigeix que per a satisfer les constants necessitats de millora els components siguin cada vegada menors.

El 1975 es va publicar la llei de Moore [224] que descrivia que el nombre de transistors en els xips es duplicava cada dos anys i va predir que així continuaria les següents dècades.

Introducció

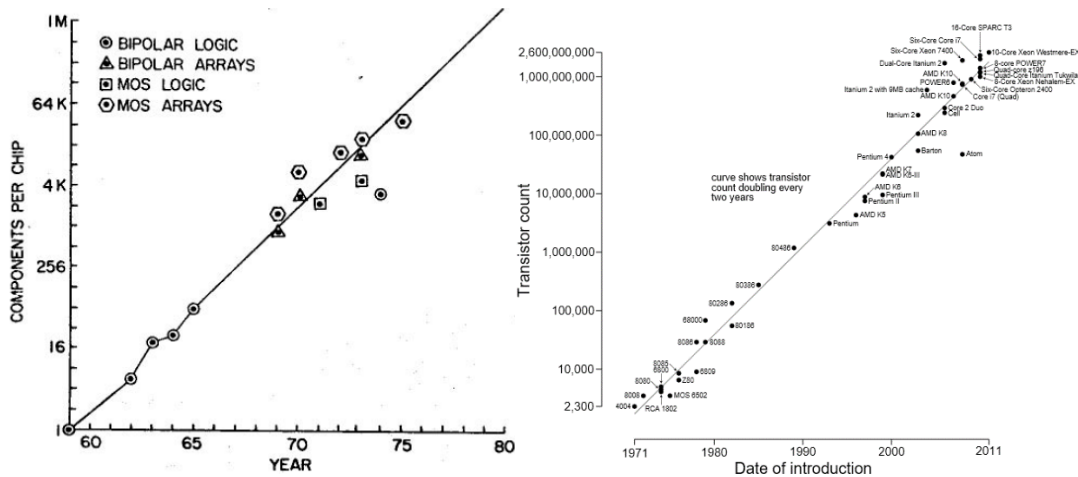


Fig. 20. **Esquerra:** dades utilitzades per Moore per determinar que els components dels xips es dupliquen cada dos anys. **Dreta:** Gràfic amb les dades actualitzades on es representen el nombre de transistors als microprocessadors comparats amb la llei de Moore i es veu com 40 anys després la llei segueix complint-se.

S'han proposat límits a aquesta llei, alguns buscant límits físics [225] i altres tractant d'extrapolar quan, segons la llei de Moore, la reducció dels components arribarà al nivell molecular [226], fet que es produiria cap al 2030. De fet, ja es contempla la possibilitat de que la llei de Moore hagi entrat en el principi del seu final [227].

Amb la idea de treballar amb components a nivell molecular, en previsió del possible (o ja real) col·lapse de la llei de Moore i evitar entrar en un cul-de-sac, és com s'idea el segon enfocament amb objectiu de construir components cada vegada millors (més processadors per unitat d'àrea): és l'anomenada aproximació *bottom-up* (del fondo cap amunt). Aquesta aproximació consisteix en usar molècules com a peces de construcció que formin els components electrònics. Un exemple de tecnologia híbrida entre tecnologia de semiconductors i molecular seria els LCD (*Liquid Crystal Display*). Aquestes petites peces de construcció també podrien ser molècules biològiques, naturals o modificades, tals com proteïnes o cromòfors. L'estudi d'aquesta possibilitat va fer néixer el camp de la bioelectrònica, on es busca l'ús de molècules biològiques per a la construcció de dispositius electrònics o fòtònics.

S'ha estudiat la possibilitat d'utilitzar cloroplastos [228], el fotosistema I [229], rodopsines [230] o inclús cèl·lules d'*E. coli* modificades [231]. Aquest camp de treball té un marcat caràcter multidisciplinari a l'abast especialitats tan diverses com biologia, química, electrònica o inclús bioètica. El potencial d'aquestes col·laboracions multidisciplinàries és tal que no és estrany llegir a la premsa a científics encoratjant a aquestes col·laboracions o iniciatives que les promouen. Per posar un exemple d'iniciativa, el Massachusetts Institute of Technology (M.I.T.) organitza cada any una competició [232] a nivell mundial de petits projectes basats en la utilització de tècniques d'enginyeria per a, en base a l'ús de parts o de sistemes biològics, dissenyar i construir aplicacions biotecnològiques.

La bR té una sèrie de característiques que la fan una bona candidata per al seu ús en aplicacions biotecnològiques. És una proteïna abundant en la natura, amb un alt rendiment d'expressió en *H. salinarum* i és eficient absorbint la radiació solar. La bR es purifica en forma de membrana púrpura (MP), la qual és molt estable en un ampli rang de condicions, tals com:

- Resistent a temperatures altes, de 80 °C en dissolució aquosa i fins a 140 °C seca [233].
- Molt estable en el temps. Es pot mantenir per anys exposada a la llum del sol i a l'oxigen de l'aire
- Tolera un ampli rang de pHs, des de 0 fins a 12.
- Resistent a digestió enzimàtica
- Estable en condicions de molt alta força iònica (4 M NaCl)
- La MP manté el color i l'activitat fotoquímica inclús quan s'elimina l'aigua.
- Estable en solvents apolars com l'hexà [234].

En el funcionament de la bR es produeixen 3 esdeveniments moleculars que serveixen per a classificar les possibles aplicacions en tres categories: aplicacions fotoelèctriques, fotocromiques i de transport de càrrega.

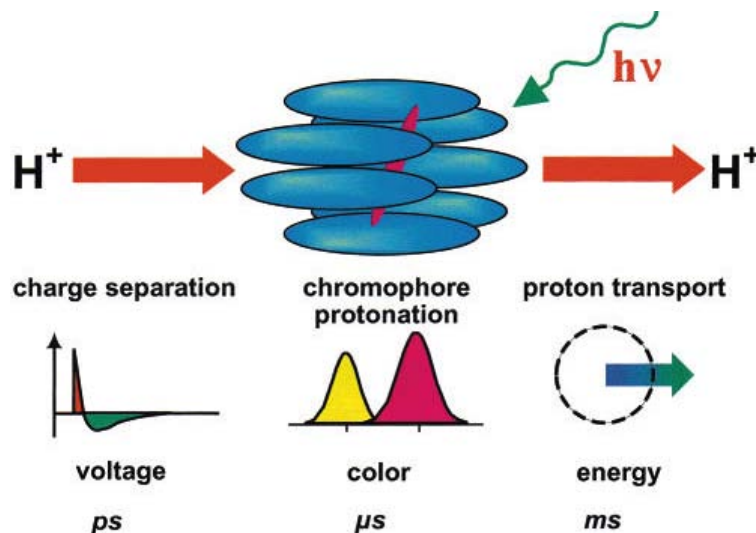


Fig. 21. Esdeveniments moleculars que ocorren a partir de l'absorció del protó.

Quan el retinal absorbeix un fotó es produeix una separació de càrregues mesurable en una escala de temps de piconsegons. Les hipotètiques aplicacions d'aquesta separació de càrregues serien la detecció ràpida de llum, detecció de moviment o la construcció de retines artificials [235, 236].

Introducció

El tercer esdeveniment, que ocorre en l'ordre dels mil·lisegons, és el transport de protons (o de càrregues). Aquesta funció de la bR fou una de les primeres a les que se li van assignar possibles aplicacions [237, 238], principalment relacionades amb la producció d'ATP en reactors, convertir llum solar en electricitat [239-241] o dessalinització d'aigua.

Un altre esdeveniment molecular consisteix en utilitzar el canvi en la longitud d'absorbància de la bR al llarg del fotocicle. A la figura es refereix a la formació de l'intermediari amb el màxim d'absorció més allunyat del de BR, l'intermediari M, que ve marcat per la desprotonació de la Base de Schiff i la seva desaparició es produeix amb la reprotonació d'aquesta. El fotocromisme no fa referència sols a l'intermediari M, ja que durant el fotocicle es van formant i desapareixent diversos fotoproductes amb diferents màxims i coeficients d'absorció, però degut al desplaçament d'uns 150 nm en l'espectre d'absorció, l'intermediari M és un clar candidat per a possibles aplicacions.

És a aquesta última característica de la bR, el fotocromisme, a la que se li han trobat més possibles aplicacions tecnològiques, principalment relacionades amb dos àrees d'aplicació:

- **Processament d'informació.** Que inclouria aplicacions tals com: reconeixement de patrons, xarxes neuronals òptiques, filtrat òptic o interferometria.
- **Emmagatzematge d'informació.** Per a la construcció de memòries 2D i 3D, hologràfiques i associatives.

Per ser utilitzada en la construcció de memòries, fan falta almenys dos estats estables en el temps i que es puguin formar i destruir a voluntat. Principalment hi ha dos models proposats, que difereixen en l'intermediari que faria de 0 i en el que faria de 1 (0 i 1 entesos segons el sistema binari utilitzat en informàtica). En el primer es faria ús de l'estat basal i de l'intermediari M, tenint en compte que s'haurien d'utilitzar mutants o bR modificades amb un M de vida mitja més llarga. En un segon model es faria ús de l'estat basal i d'uns intermediaris, P i Q, que provindrien de l'intermediari O, formant una ramificació del fotocicle original [242, 243].

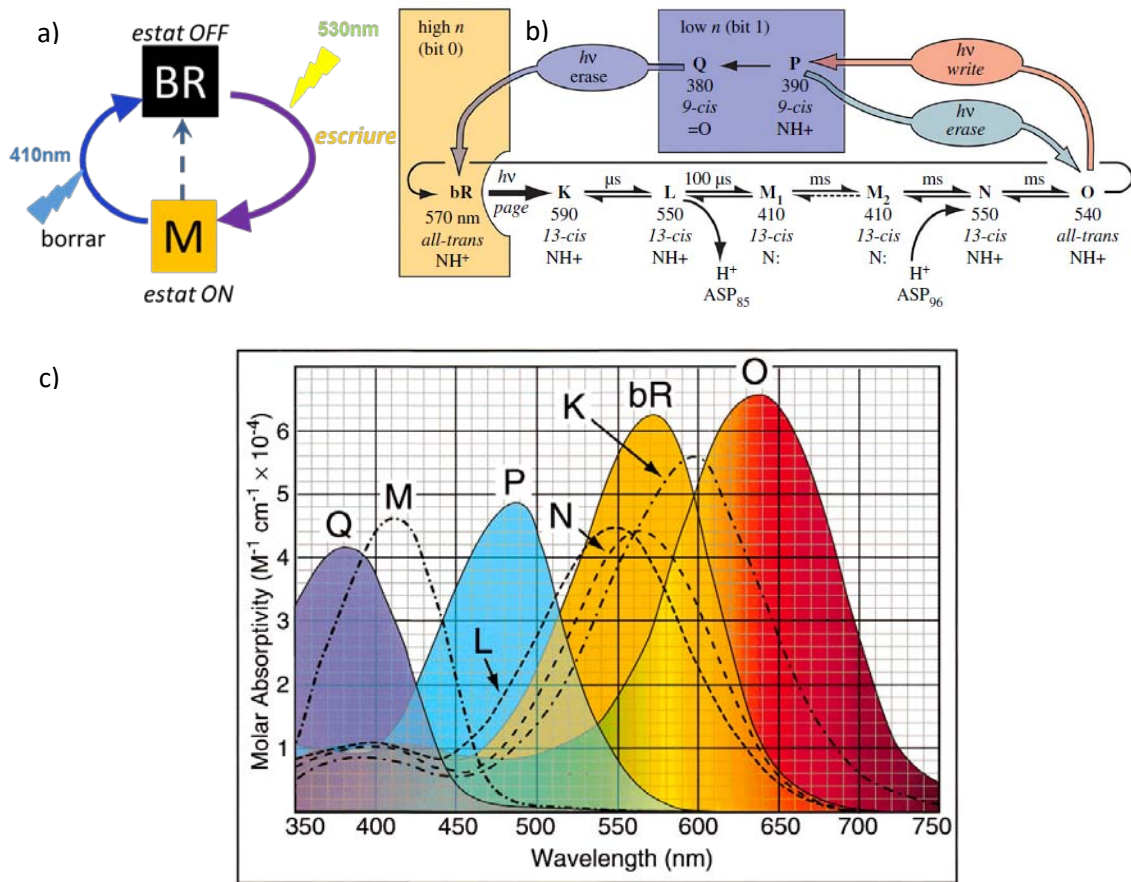


Fig. 22. a) Model de dos estats per emmagatzemar informació amb l'intermediari M. **b)** Esquema per emmagatzemar informació fent ús del fotocicle ramificat en P i Q. **c)** Espectres d'absorció dels diferents intermediaris, inclosos els P i Q del fotocicle ramificat. Els colors indiquen quin color absorbeixen els intermediaris. El M no té color assignat però deuria ser blau. Aquí també es veu clarament que els intermediaris M, P i Q són els que presenten un fotocromisme més gran respecte a BR.

Una part crucial dels avanços en aquest camp és aconseguir intermediaris cada vegada més estables. El descobriment d'un nou mutant o condició de treball que porti intermediaris molt estables podria suposar una empenta decisiva en el desenvolupament de la bioelectrònica.

Introducció

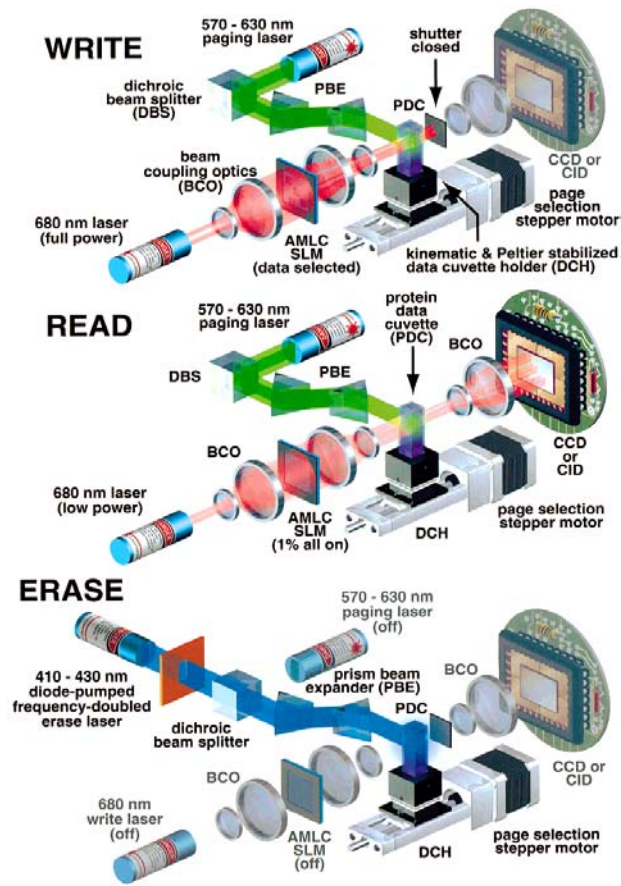


Fig. 23. Disseny d'un prototip de memòria 3D. Es mostra com seria el procés d'escriptura, lectura i esborrar [244].

Objectius

La bacteriorodopsina és una proteïna de membrana de la família de les 7TM. L'estudi d'aquesta proteïna no sols és important per a conèixer el seu funcionament sinó també perquè aporta informació sobre el funcionament de les proteïnes a nivell molecular. La bR és un model per a l'estudi de les proteïnes GPCR (*G protein coupled receptor*), una gran família de proteïnes de membrana que actuen com a receptors. En aquesta família de proteïnes hi ha receptors de tot tipus d'estímuls, des de fotons i ions fins a nucleòtids o proteïnes i transdueixen la senyal a l'interior de la cèl·lula per a desencadenar diferents tipus de respostes com metabolisme, creixement o proliferació cel·lular, metàstasi, apoptosi o desenvolupament de tumors.

Al ser una proteïna transportadora de protons el seu estudi també aporta informació sobre el funcionament d'altres bombes de protons com per exemple l'ATP sintasa o la citocrom C oxidasa. A més s'ha utilitzat per a validar noves tècniques o per a estendre l'ús de tècniques d'altres camps a l'estudi de les proteïnes de membrana.

A la Introducció ja s'han comentat les controvèrsies i aspectes no massa ben coneguts del funcionament de la bR, sobretot en quant al paper del moviment de les hèlix per al seu correcte funcionament.

Aquest treball pretén aportar llum sobre aquests aspectes fent ús d'una aproximació que ja s'ha utilitzat amb bons resultats i pot aportar encara més: la restricció del moviment de les hèlixs mitjançant la formació de pots disulfur en mutants als quals se'ls ha introduït dues cisteïnes estratègicament situades per a fixar les hèlixs d'interès.

L'objectiu s'ha abordat estudiant dues zones diferenciades: el moviment de les hèlix E i F des del costat citoplasmàtic i el moviment de les hèlix A i B i els bucles BC i DE des del costat extracel·lular. Per a estudiar el paper del moviment relatiu de les hèlixs E i F pel costat citoplasmàtic s'han produït els mutants T157C/K172C i A160C/A168C. La formació dels ponts disulfur entre les dues cisteïnes fixarà l'hèlix E a l'hèlix F i la forma reduïda dels mutants permetrà elucidar quins canvis es deuen a l'efecte de la restricció del moviment.

Objectius

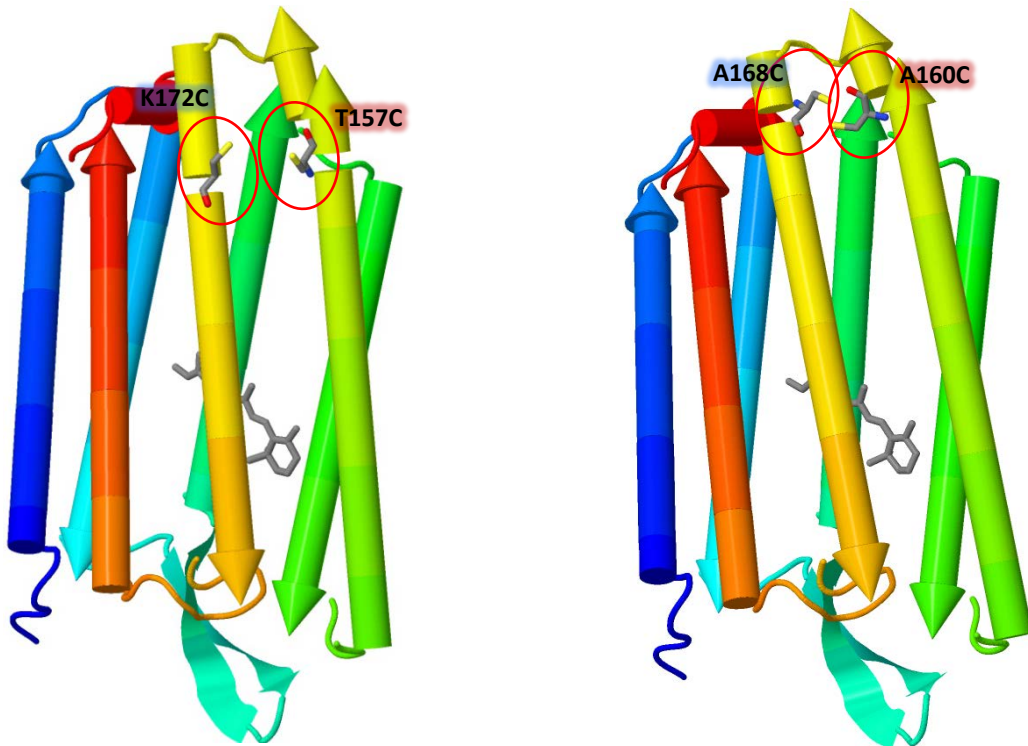


Fig. 24. A l'esquerra es representen les mutacions del doble mutant T157C/K172C i a la dreta el A160C/A168C. Les hèlixs estan acolorides per ordre cromàtic de la A a la G (A, B, C, D, E, F i G). La part superior de la figura correspon a la part citoplasmàtica i l'inferior correspon a l'extracel·lular.

Aquest mètode s'ha utilitzat també amb el mutant V101C/M163C el qual en la seva forma oxidada fixaria el bucle citoplasmàtic EF a l'hèlix C.

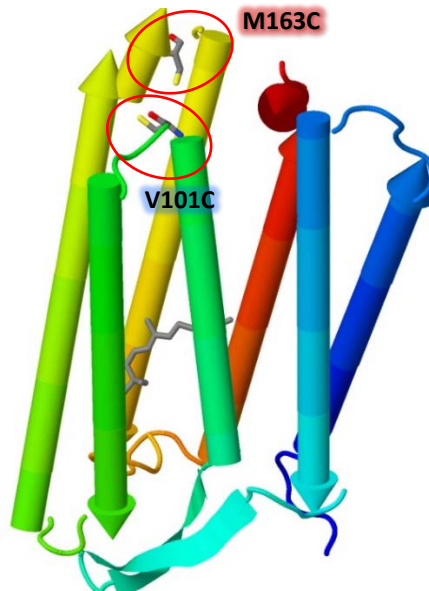


Fig. 25. Representació de les mutacions del doble mutant V101C/M163C. Les hèlixs estan acolorides per ordre cromàtic de la A a la G (A, B, C, D, E, F i G). La part superior de la figura correspon a la part citoplasmàtica i l'inferior correspon a l'extracel·lular.

Per a estudiar el costat extracel·lular s'han produït els mutants L13C/L61C i F71C/K129C per a fixar les hèlix A i B i els bucles BC i DE respectivament.

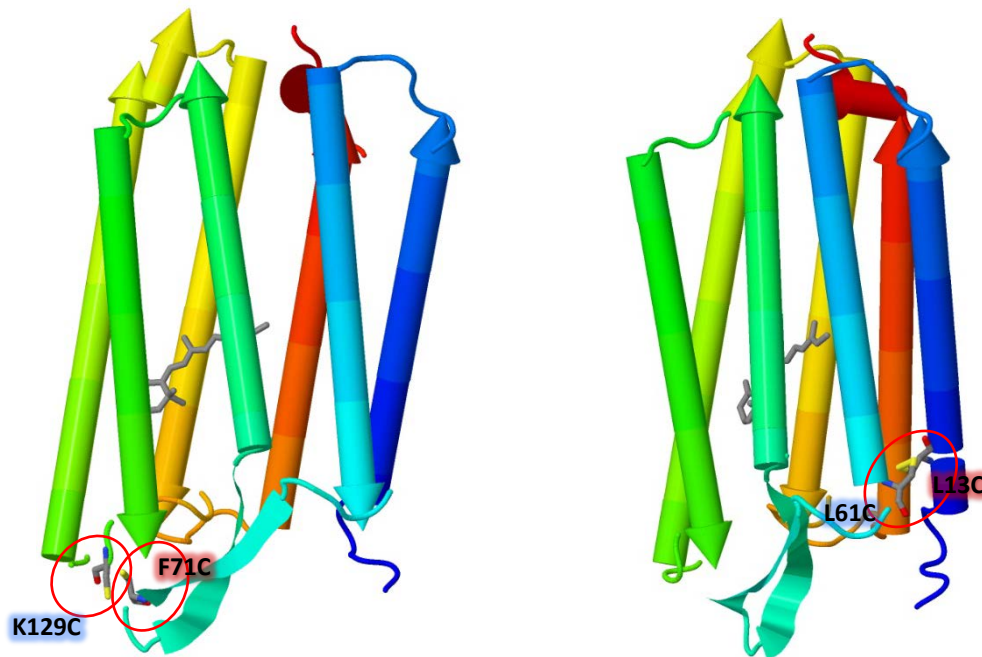


Fig. 26. A l'esquerra es representen les mutacions del doble mutant K129C/F71C i a la dreta el L13C/L61C. Les hèlixs estan acolorides per ordre cromàtic de la A a la G (A, B, C, D, E, F i G). La part superior de la figura correspon a la part citoplasmàtica i l'inferior correspon a l'extracel·lular.

Els residus han sigut seleccionats amb la idea de que no fossin essencials per al funcionament de la bR segons la bibliografia disponible i també d'acord amb la seva proximitat, que fos suficient per a la formació dels ponts disulfur. Estudiar els mutants el condicions reductores i oxidants permet comparar les característiques i funcionament de la bR en condicions on les hèlixs poden moure's lliurement o no.

Degut a les peculiars característiques dels mutants F71C/K129C i K129C es va ampliar el seu estudi amb nous experiments per a estudiar més profundament les propietats peculiars d'aquests mutants.

Amb aquests estudis s'intenta no sols conèixer millor el funcionament de la bR, sinó aportar coneixements que puguin ser aplicats també a GPCRs i qui sap si aportar un gra d'arena en la futura curació de malalties humanes relacionades amb aquestes proteïnes. A més, per a transcendir de fer ciència bàsica es proposen aplicacions per a característiques inesperades observades en alguns dels mutants.

Materials i Mètodes

Per a realitzar l'estudi de la bR hi ha una sèrie de tècniques i materials necessaris i en aquest apartat els enumerarem i explicarem. Hi ha alguns que s'utilitzen des de fa anys i estan ben establerts, altres són més recents o inclús desenvolupats per a aquest treball.

1. Material biològic emprat.

La base material biològica necessària per a l'estudi desenvolupat a més de la pròpia bacteriorodopsina, consta de:

a. Soques bacterianes.

Per obtenir els mutants de la bR i a fi d'optimitzar el procés es fa ús de dos organismes diferents: el bacteri *Escherichia coli* i l'arqueobacteri *Halobacterium salinarum*.

El bacteri *E. coli* s'utilitza durant els primers estadis de l'obtenció dels mutants, concretament per a realitzar les tècniques de DNA recombinant explicades des de l'apartat 2.a fins al 2.f. Es fa ús d'aquest bacteri perquè la metodologia està molt ben descrita i desenvolupada i a més té un creixement molt més ràpid que no pas l'*H. salinarum* (*E. coli* té un temps de duplicació de 20 minuts front a 8-10 hores d'*H. salinarum* [245]). *H. salinarum* s'utilitza per a l'expressió de la bR en el seu entorn natural.

D'*E. coli* hem utilitzat:

DH5 α : Aquesta soca té un genotip F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda-$. És una soca ben coneguda amb bons rendiments de transformació, permet la transformació amb plasmidis de grans mides i la selecció mitjançant el sistema β -galactosidasa. A més, *recA1* i *endA1* incrementen l'estabilitat de l'insert i la qualitat del plasmidi purificat amb minipreps.

D'*H. salinarum* usem:

S-9: És la soca utilitzada per extreure la bR nativa utilitzada com a control de tots els experiments. Aquesta soca està modificada ja que ha perdut la capacitat de produir vacúols de gas i altres pigments diferents de la bR que dificulten l'extracció de la membrana púrpura. El rendiment de producció de membrana púrpura és molt alt en aquesta soca, el que permet l'obtenció de grans quantitats de bR en les extraccions.

L33: És una soca útil per a expressar bR mutants mitjançant plasmidis ja que té inserit l'element mòbil ISH2 dins del gen *bop*, fet que impedeix la seva expressió [246], convertint la soca en bO⁻, deficient en producció de membrana púrpura.

Materials i Mètodes

MPK409: Aquesta soca té un genotip *Rub⁻ Vac⁻ Δura3 Δbop::IN[ura3(BamHI-PshAI)]*, el que significa que no expressa bacterioruberina, no forma vacúols de gas, és deficient en el gen *ura3* i no expressa el gen *bop* perquè té inserit el gen *ura3* (cosa que torna a la soca la capacitat d'expressar *ura3*). El fet de no expressar bacterioruberina ni formar vacúols de gas facilita l'expressió i purificació de la membrana púrpura. La soca no expressa bacterioopsina al tenir un insert enmig del gen. Les soques que tenen el gen *ura3* són sensibles a 5-FOA, així que s'utilitza aquesta característica per seleccionar les soques transformades amb el plasmidi pEF191 (apartat 1.c.), ja que a l'integrar-se enmig de *bop* torna la soca deficient en *ura3* i per tant no és sensible a 5-FOA i és auxòtrofa d'uracil [247].

b. Gen *bop*.

El gen *bop* és el gen que codifica la bacterioopsina. Aquest gen ha sigut proporcionat al laboratori pel Dr. Needleman (Wayne State University School of Medicine) clonat en el plasmidi pSELECTTM-1q (Promega). El gen està situat en un fragment de DNA de 1,2 Kbases, entre les dianes per als enzims de restricció *Bam*HI i *Hind*III. El fragment de DNA fou extret d'aquest plasmidi i clonat als plasmidis de l'apartat 1.c.

La seqüència de nucleòtids del gen està descrita al Genbank (referència V00474.1) i correspon a [72].

BamHI

```
1 GGATCCGACG TGAAGATGGG GCTCCCGATG GGTGCAACCG TGAAGTCCXX
51 XACGGCTGCG TCACGACAGG XGCCGACCAG CGACACCCAG AAGGTGCGAA
101 CGGTTGAGTG CCGCAACGAT CACXGTTTTT CGTGCGCTTC GAGTGGTTTT
MluI
151 ACGCGTGCAC GCATCGACTT CACCGCGGGT GTTTCGACGC CAGCCGGCCG
201 TTGAACCAGC AGGCAGCGGG CATTTCACAG CCGCTGTGGC CCACACACTC
251 GGTGGGGTGC GCTATTTTGG TATGGTTCGG AATCCGCGTG TCGGCTCCGT
301 GTCTGACGGT TCATCGGTCT AAATTCGTC ACGAGCGTAC CATACTGATT
351 GGGTCGTAGA GTTACACACA TATCCTCGTT AGGTACTGTT GCATGTTGGA
M L E
401 GTTATTGCCA ACAGCAGTGG AGGGGGTATC GCAGGCCAG ATCACC GGAC
L L P T A V E G V S Q A Q I T G R
NheI
451 GTCCGGAGTG GATCTGGCTA GCGCTCGGTA CGGCGCTAAT GGGACTCGGG
P E W I W L A L G T A L M G L G
501 ACGCTCTATT TCCTCGTGAA AGGGATGGGC GTCTCGGACC CAGATGCAAA
T L Y F L V K G M G V S D P D A K
551 GAAATTCTAC GCCATCACGA CGCTCGTCCC AGCCATCGCG TTCACGATGT
K F Y A I T T L V P A I A F T M Y
601 ACCTCTCGAT GCTGCTGGGG TACGGCCTCA CAATGGTACC GTTCGGTGGG
L S M L L G Y G L T M V P F G G
651 GAGCAAAAACC CCATCTACTG GGCGCGGTAC GCTGACTGGC TGTTACCAC
E Q N P I Y W A R Y A D W L F T T
701 GCCGCTGTTG TTGTTAGACC TCGCGTTGCT CGTTGACGCG GATCAGGGAA
P L L L L D L A L L V D A D Q G T
751 CGATCCTTGC GCTCGTCCGT GCCGACGGCA TCATGATCGG GACCGGCCTG
I L A L V G A D G I M I G T G L
```

```

801 GTCGGCGCAC TGACGAAGGT CTACTCGTAC CGCTTCGTGT GGTGGGCGAT
    V G A L T K V Y S Y R F V W W A I
      BsrGI
851 CAGCACCGCA GCGATGCTGT ACATCCTGTA CGTGCTGTTC TTCGGGTTCA
    S T A A M L Y I L Y V L F F G F T
      SphI
901 CCTCGAAGGC CGAAAGCATG CGCCCCGAGG TCGCATCCAC GTTCAAAGTA
    S K A E S M R P E V A S T F K V
951 CTGCGTAACG TTACCGTTGT GTTGTGGTCC GCGTATCCCG TCGTGTGGCT
    L R N V T V V L W S A Y P V V W L
1001 GATCGGCAGC GAAGGTGCGG GAATCGTGCC GCTGAACATC GAGACGCTGC
    I G S E G A G I V P L N I E T L L
1051 TGTTCATGGT GCTTGACGTG AGCGCGAAGG TCGGCTTCGG GCTCATCCTC
    F M V L D V S A K V G F G L I L
1101 CTGCGCAGTC GTGCGATCTT CGGCGAAGCC GAAGCGCCGG AGCCGTCCGC
    L R S R A I F G E A E A P E P S A
1151 CGGCGACGGC GCGGCCGCGA CCAGCGACTG ATCGCACACG CAGGACAGCC
    G D G A A A T S D *
1.201 CCACAACCGG CACGGCTGTG TTCAACGACA CACGATGAGT CCCCCACTCG
      SphI
1251 GTCTTGTACT CGCACGATCG CGCGACGACG GCGCCATCTC CTTGCATGCA
1301 CCATTCCTTG CGGCGGCGGT GCTCAACGGC CTCAACCTAC TACTGGGCTG
      SphI
1351 CTTCCTAATG CAGGAGTCNC ATAAGGGAGA GCGTCNACCT GCAGGCATGC
    HindIII
1401 AAGCTT

```

Fig. 27. Seqüència de nucleòtids del fragment de 1,2Kb que conté el gen de la bacteriorodopsina. Els 13 primers aminoàcids són eliminats durant el processament del precursor de la bR [72]. S'indiquen llocs de tall d'enzims de restricció.

c. Vectors.

Els vectors són agents que transporten material genètic d'un organisme a un altre. En el nostre cas utilitzem plasmidis com a vectors, amb els que introduïm el gen *bop* en *E. coli* o en *H. salinarum*, procedint originàriament d'*H. salinarum* (apartat 2.b.). Els vectors utilitzats han sigut:

pUCBM20: Aquest plasmidi prové del pUC18 al que se li ha afegit un lloc de clonació múltiple (*multiple cloning site* en anglès). Aquest plasmidi confereix a l'organisme transformat resistència a l'antibiòtic ampicil·lina, ja que porta incorporat el gen de la β -lactamasa, un enzim que el degrada. El vector conté un fragment del gen *lacZ* d'*E. coli*, el que permet la selecció de les colònies transformants mitjançant el sistema β -galactosidasa.

pEF191: és un plasmidi llançadora cedit pel Dr. Mathias Lubben (Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr Universität, Bochum). És un plasmidi d'expressió en *H. salinarum* que a més pot ser transformat i és capaç de replicar-se en *E. coli*. El plasmidi té la capacitat d'integrar el gen *bop* en el genoma d'*H. salinarum*, tornant les soques que s'han transformat i han integrat el gen en colònies resistents a 5-FOA. La integració del gen en el genoma permet nivells d'expressió similars als que s'obtenen amb l'expressió silvestre de la bR [248].

Materials i Mètodes

d. Medis de cultiu i antibiòtics utilitzats.

Medis de cultiu per a *E. coli*:

- Medi líquid LB (1L):	Bactotripton	10 g
	Extracte de llevat	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O destil·lada	q.s.p. 1 L

Ajustar a pH 7 i autoclavar.

- Medi LB agar: A un litre de medi LB se li afegeix 15 g d'agar bacteriològic europeu. Després d'autoclavar es posa en un bany a 65 °C. Quan està temperat s'afegeixen 50 µg/ml d'ampicil·lina. Per a preparar cèl·lules d'*E. coli* competents per a transformar les plaques es preparen sense ampicil·lina.

Les plaques s'han de preparar en un ambient estèril i s'han de deixar assecar una mica abans de guardar o utilitzar.

Medis de cultiu per a *H. salinarum* soca L33:

- Medi sals (1 L):	NaCl	250 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
	Citrat trisòdic dihidrat	3 g
	KCl	2 g
	Aigua destil·lada	q.s.p. 1 l

- Medi C (1 L):	Extracte de llevat	3 g
	Triptona	2 g
	Medi sals	1 l

Ajustar a pH 7,2 i autoclavar.

- Medi ric per a expressió de BR (10 litres):

Medi sals	10 l
Peptona Oxoid	100 g

Ajustar a pH 7,2 i autoclavar.

Per als cultius a gran escala s'utilitza peptona (PepOx) en compte de triptona i extracte de llevat perquè la peptona afavoreix l'expressió de la proteïna.

- Plaques de Medi C (1 L):

Medi C	1 l
Agar	15 g

Autoclavar

- Plaques de Medi C amb sacarosa (per a transformacions) (1,25 l):

Medi C	1 l
Agar	15 g
Sacarosa	150 g

Autoclavar i refredar fins els 50 °C abans d'afegir l'antibiòtic corresponent per a la selecció de colònies. Les plaques s'han de preparar en un ambient estèril i s'han de deixar assecar una mica abans de guardar o utilitzar.

Medis de cultiu per a *H. salinarum* soca MPK409:

- Medi PepOx (1 L):

En un primer pas preparar, autoclavar i temperar a 60 °C:

NaCl	250 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
Citrat trisòdic dihidrat	3 g
KCl	2 g
PepOx	10 g
Aigua destil·lada	900 ml

En un segon pas es prepara:

Adenosina	0,1 g
Uridina	0,1 g
Glicerol 87%	800 µl
Biotina (0,1 mg/ml)	10 µl
Àcid fòlic (1 mg/ml)	100 µl
Vitamina B12 (0,1 mg/ml)	2 µl
Aigua destil·lada	100 ml

Materials i Mètodes

Amb una xeringa de 50 ml es passa per filtres Filtropur S estèrils de 0,2 µm de porus i s'afegeix al preparat en el primer pas.

- Plaques de PepOx i Mevinolina per a transformar *H. salinarum* (250 ml):

En un primer pas es prepara:

a)	NaCl	62,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
	Citrat trisòdic dihidrat	0,75 g
	KCl	0,5 g
	Aigua destil·lada	200 ml

Ajustar a pH 7,2, afegir 3,75 g d'agar, autoclavar i temperar a 50 °C.

b)	Peptona	2,5 g
	Aigua destil·lada	20 ml

Ajustar a pH 7,2, autoclavar i temperar a 50 °C.

En un segon pas es prepara:

Adenosina	0,025 g
Uridina	0,025 g
Glicerol 87%	160 µl
Biotina (0,1 mg/ml)	2,5 µl
Àcid fòlic (1 mg/ml)	25 µl
Vitamina B12 (0,1 mg/ml)	0,5 µl
Mevinolina (12,5 mg/ml)	250 µl
Aigua destil·lada	30 ml

Amb una xeringa de 50 ml es passa per filtres Filtropur S estèrils de 0,2 µm de porus i s'afegeix a la peptona. A continuació es treu del bany el preparat de l'apartat a), s'afegeix la peptona amb les vitamines, es mescla amb cura de no fer bombolles i es preparen les plaques. Les plaques s'han de preparar en un ambient estèril i s'han de deixar assecar una mica abans de guardar o utilitzar.

Antibiòtics:

- **Ampicil·lina:** és un antibiòtic β-lactàmic que s'utilitza per a seleccionar les cèl·lules de la soca d'*E. coli* DH5α que contenen en plasmidi pUCBM20. També s'utilitza

per a evitar contaminacions en els cultius i plaques on hi hagi creixent *E. coli* amb plasmidi o *H. salinarum*. Aquest últim té resistència natural a l'ampicil·lina.

El seu mecanisme d'acció es basa en la capacitat de penetrar en bacteris grampositius i alguns gramnegatius interferint en la síntesi de la paret cel·lular durant la replicació cel·lular. En concret afecta a la formació de ponts en la capa de peptidoglicà, que és el que proporciona rigidesa a la paret cel·lular. La concentració de treball és de 50 µg/ml i es parteix d'una dissolució estoc de 50 mg/ml (1.000x).

- **Mevinolina:** s'utilitza per a la selecció dels bacteris d'*E. coli* i *H. salinarum* transformats amb el plasmidi pEF191. En aquest cas la concentració de treball és de 12,5 µg/ml, partint d'una dissolució stock de 12,5 mg/ml (1.000x).

El mecanisme d'acció de la mevinolina és la inhibició de la HMG-CoA reductasa, enzim que participa en la ruta de la biosíntesi de l'esterol. Bloqueja la producció de mevalonat, compost crític en la producció d'esterols i isoprenoides.

e. Cultiu i conservació bacteriana.

Cultiu bacterià:

La correcta realització de cultius bacterians implica treballar en les condicions més estèrils possibles. Per aconseguir-ho, són altament recomanables alguns requisits:

- Tenir l'ambient de treball el més net possible, per a evitar que la brutícia contami ni els cultius. Açò inclou també les nostres mans i la bata.
- Fer la sembra i inoculacions en una superfície neta, preferiblement rentada amb etanol, baix una flama i en un entorn sense corrents d'aire. No obrir els recipients amb cultius o medis de cultiu lluny de la flama.
- Utilitzar eines esterilitzades, ja sigui amb l'autoclau en el cas d'erlenmeyers, puntes de pipeta i medis de cultiu, o cremant amb etanol en el cas de les anses Digralsky.

Amb aquestes precaucions s'aconsegueix un nivell d'esterilitat suficient per a les necessitats d'aquest treball.

E. coli: Les cèl·lules s'inoculen en medi LB líquid i s'incuben a 37 °C amb una agitació de 200 rpm durant la nit (*over night, o/n*). Quan es sembren en placa es mantenen també a 37 °C en l'incubador, tancades amb parafilm i cap per avall per a evitar que les possibles gotes formades per la condensació caiguin sobre el cultiu formant un mantell de colònies en compte de colònies aïllades.

Materials i Mètodes

H. salinarum: el seu cultiu es fa en dos fases.

- Escalat de creixement: Les cèl·lules procedents d'una colònia o un glicerinat són inoculats en 5 ml del medi corresponent i s'incuben a 42 °C amb una agitació de 150 rpm. Una vegada han crescut les cèl·lules (de 5 a 7 dies) s'inoculen en 250 ml de medi. Quan aquest precultiu arriba a una OD_{550nm} d'aproximadament 0,8 (uns dos dies), és inoculat en 10 litres de medi per a produir membrana púrpura massivament.

- Producció de membrana púrpura: el cultiu es realitza en un erlenmeyer de 20 litres amb 10 litres de medi prèviament esterilitzat amb l'autoclau. L'ampicil·lina s'afegeix després i en el cas del medi PepOx les vitamines també. La temperatura es manté al voltant dels 42 °C mitjançant un focus Philips Spotone de 120 W, amb agitació magnètica a unes 200 rpm i airejant amb una bomba a uns 228 l/min (model 7530-50, Cole-Parmer Instrument Company).

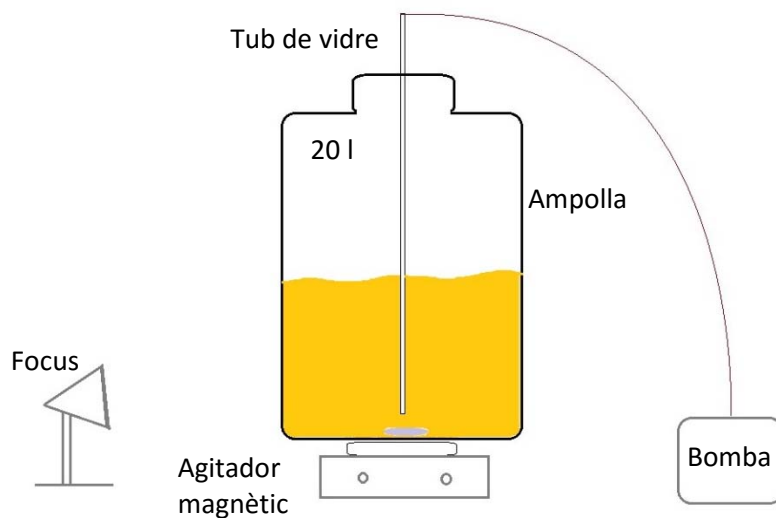


Fig. 28. Esquema del muntatge per a la producció de membrana púrpura.

El cultiu es realitza il·luminant amb el focus i amb 8 tubs fluorescents de llum blanca per a induir la producció de membrana púrpura. Quan el cultiu arriba a la fase estacionària (OD_{600nm} 0,8-1, entre 5 i 9 dies) es retira el subministrament d'aire i es manté la il·luminació durant 5 dies, temps establert com a òptim per a la màxima producció de membrana púrpura. A continuació es procedeix a l'extracció de la MP (veure apartat 3.a.).

Quan s'acaba d'utilitzar l'erlenmeyer de 20 litres s'ha de rentar. El procediment per a rentar-lo és primer passar-li molta aigua corrent de l'aixeta. A continuació es deixa uns minuts amb aigua i lleixiu per a rentar i matar cèl·lules. Es continua rentant amb aigua corrent tant per dins com per fora. L'últim pas és rentar dues vegades amb uns 4 litres d'aigua destil·lada i eixugar. Es pot fer una rentada amb etanol 96°.

Per al creixement en placa, la placa s'ha de tancar bé amb cinta aïllant per a evitar que es sequi i es formin cristalls de sal. El parafilm no és adequat perquè a 42 °C es degrada.

Conservació dels cultius:

- En placa o líquid: *E. coli* es conserva a 4 °C fins a un màxim de 10 dies mentre que *H. salinarum* es pot conservar fins a un mes. Si la placa té mevinolina s'ha de guardar en la foscor, envoltada amb paper d'alumini.
- Glicerinat: en un 15% de glicerol i a -80 °C ambdós espècies es poden conservar durant anys. Quan es vulgui utilitzar un glicerinat s'haurà de descongelar lentament posant-lo en gel.

2. Tècniques de DNA recombinant.

a. Mutagènesi dirigida per PCR.

Mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'han introduït mutacions puntuals en el gen *bop*. Per qüestions pràctiques, s'han utilitzat dos mètodes, un per als mutants citoplasmàtics i un altre per als extracel·lulars.

Mutagènesi dels mutants citoplasmàtics:

El mètode està basat en el de Landt i al. [249] i s'ha seguit el procediment descrit per Juncosa-Ginesta i al. [250]. Partint del dsDNA motlle, calen dos encebadors que estiguin en sentit invers i conflueixin en la regió a mutar. Depenent del lloc de mutació del gen *bop* s'utilitzen diferents encebadors. La posició relativa d'aquests determinaran si calen una o dues rondes de PCR.

Motlle: pUCBM20-*bop*, plasmidi en el qual està subclonat el gen *bop* entre les dianes *BamHI* i *HindIII*.

Encebadors: s'utilitzen dos tipus d'oligonucleòtids, mutagènics i amb un lloc de reconeixement per a una endonucleasa. Els primers s'han dissenyat tenint en compte l'ús de codons d'*H. salinarum* i que la mutació estigués flanquejada per uns 15 nucleòtids per cada costat per a assegurar una correcta hibridació amb el DNA motlle. Els segons són encebadors que porten algun dels llocs de restricció que estan en el gen, per a facilitar la posterior digestió del gen silvestre i la introducció del fragment mutat. L'elecció es fa per proximitat amb la zona que es vol mutar i per ser únics al plasmidi.

PCR: per a introduir les dobles mutacions s'han fet dos rondes de PCR. En la primera es fan dos mostres, una per a cada mutació, utilitzant en cada cas un encebador mutagènic i un encebador pròxim a la mutació i que contingui un lloc de restricció únic.

Materials i Mètodes

En la segona PCR s'usen els productes de la primera ronda com a encebadors i així s'obté el gen complet mutat.

Els productes es comproven utilitzant un gel d'agarosa comparant la mida amb un marcador de pesos moleculars com a referència. Posteriorment són purificats amb un kit de Qiagen. La DNA polimerasa utilitzada ha sigut la Deep Vent (New England Biolabs) i el termociclador és el PCR-Minicycler.

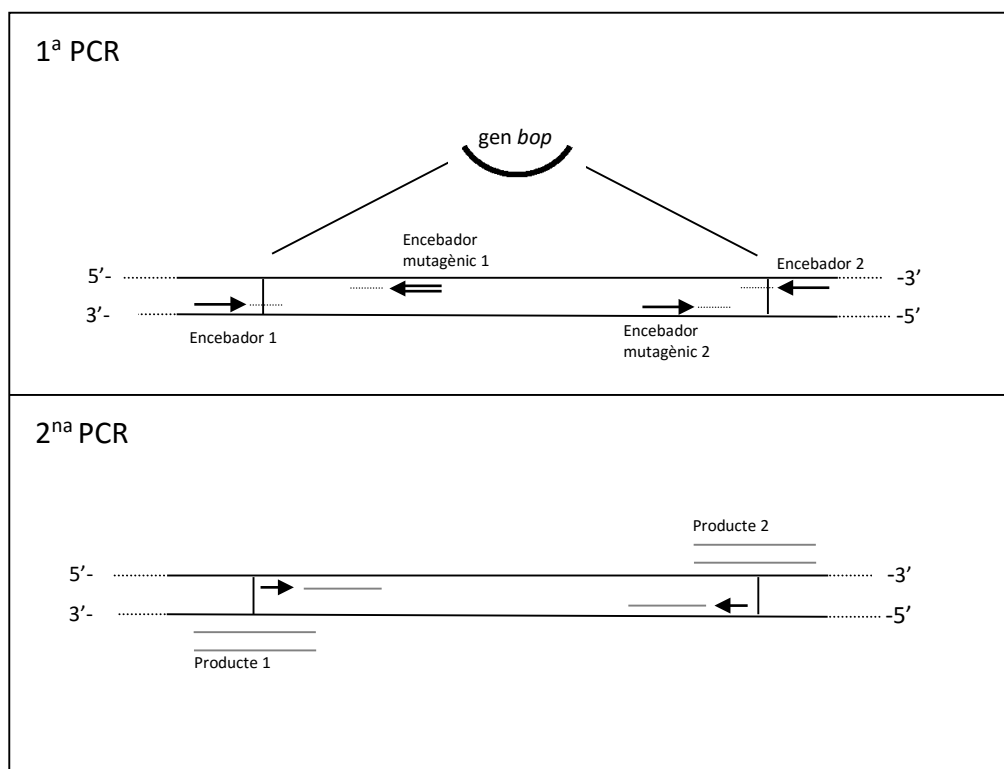


Fig. 29. Esquema de la reacció [251].

	Primera PCR	Segona PCR
Tampó 10 X Deep Vent	5 µl	5 µl
DNA motlle (10 ng/µl)	2 µl	2 µl
Encebador mutagènic (5 pmol/µl)	4 µl	--
Encebador flanquejant (5 pmol/µl)	4 µl	--
Producte 1 de la 1ª PCR	--	16 µl
Producte 2 de la 1ª PCR	--	16 µl
Nucleòtids (10 mM)	1 µl	1 µl
Polimerasa Deep Vent	0,5 µl	0,5 µl
Sulfat de Magnesi (100 mM)	2 µl	2 µl
H ₂ O estèril	q.s.p 50 µl	q.s.p 50 µl

Taula 2. Components afegits a cada PCR.

La programació del termociclador ha sigut la següent, amb petites variacions degudes a les diferents T_m d'hibridació dels nucleòtids utilitzats.

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

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

Mutagènesi dels mutants extracel·lulars:

El mètode usat en aquest cas és l'explicat per Klock i Lesley [252]. Aquest mètode redueix la mutagènesi a un sol pas de PCR i transformació per mutació.

Aquest mètode es basa en la idea de que normalment les amplificacions per PCR donen lloc a una mescla de productes que no són completament de doble cadena [253]. Els encebadors utilitzats s'han dissenyat per a inserir la mutació i per a ser complementaris entre ells i així el producte linealitzat de la PCR pot autohibridar i formar un plasmidi mutant viable.

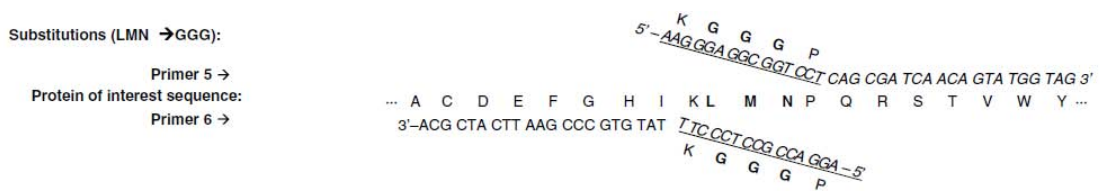


Fig. 30. S'usen dos encebadors que hibriden parcialment entre ells i amb una cua d'uns 15 nucleòtids que no hibriden però sí amb la seqüència flanquejant al nucleòtid que es vol mutar. Al mig de la zona en que hibriden la seqüència ja no és com la del gen *bop* silvestre, sinó que té canviats els nucleòtids necessaris per a introduir la mutació puntual.

	<i>Quantitat</i>
<i>Tampó 10X KOD Hot Start</i>	5 µl
<i>DNA motlle</i>	20 ng
<i>Encebador 1 (25 µM)</i>	2,5 µl
<i>Encebador 2 (25 µM)</i>	2,5 µl
<i>Nucleòtids (2 mM)</i>	5 µl
<i>DNA Polimerasa KOD Hot Start</i>	1 µl
<i>MgSO₄ (25 mM)</i>	5 µl
<i>H₂O estèril</i>	q.s.p 50 µl

Taula 3. Components afegits a la PCR.

La programació del termociclador ha sigut la següent, amb petites variacions degudes a diferències en les T_m d'hibridació dels diferents primers:

95 °C, 2' + 30x(95 °C, 20" + 55 °C, 10" + 70 °C 1'40") + 70 °C, 10' + 4 °C

Materials i Mètodes

b. Manipulacions enzimàtiques.

Digestions amb enzims de restricció:

Amb els mutants citoplasmàtics es treballa amb un volum de digestió d'uns 20 µl i amb una quantitat de DNA de entre 0,5 i 10 µg. S'afegeix el tampó adequat depenent de l'enzim de restricció utilitzat i enzim de restricció a raó d'una unitat per µg de DNA. Es deixa fent la digestió una hora a 37 °C. Si es fan digestions amb dos o més enzims de restricció, si comparteixen tampó de digestió es poden fer a la vegada. Si no, s'ha de digerir amb cada enzim per separat purificant el DNA amb el QIAquick® PCR Purification kit de Qiagen.

En el cas dels mutants extracel·lulars com el mètode de mutació és diferent sols necessitem els enzims de restricció *Bam*HI i *Hind*III. En aquest cas el procés seguit ha sigut:

1. 1 µg DNA + 1 µl *Hind*III + 5 µl NEBuffer 2 i aigua destil·lada fins a 50 µl.
2. Incubar 1h, 37 °C.
3. Purificar amb *PCR purification Kit* i eluir amb 45 µl d'aigua destil·lada.
4. Afegir 1 µl *Bam*HI-HF + 5 µl NEBuffer 4 + 0,5 µl BSA (100X).
5. Incubar 1h, 37 °C.
6. Afegir *Loading Buffer* i córrer en un gel d'agarosa per a purificar la banda.

Lligació del DNA:

Per a lligar diferents fragments de DNA s'utilitza la lligasa del bacteriòfag T4. Les quantitats utilitzades han sigut les següents:

- 1 µl de lligasa
- 1,4 µl de tampó de lligasa
- 5 µl de plasmidi
- 7 µl d'insert.

La mescla s'incuba en el termociclador a 16 °C durant 16h i després a 12 °C fins que es vagi a fer la transformació en *E. coli*.

c. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa.

Les electroforesis en gels d'agarosa tenen varies finalitats, ja que funcionen tant com a tècnica separativa com a tècnica analítica.

La podem usar per a separar fragments de DNA per a posteriorment extreure'ls del gel i usar-los. Un exemple d'aquest ús és quan després de digerir els plasmidis correm un gel d'agarosa per a separar l'insert de la resta del plasmidi. El procés de purificació l'explicarem al punt següent. Quant s'usa l'electroforesi com a tècnica analítica, ens permet estimar concentracions i puresa, així com calcular la longitud aproximada comparant amb un patró.

La concentració d'agarosa es pot canviar per a adequar-ho a la mida del DNA. En el nostre cas, l'agarosa es prepara a l'1%. Com durant el procés fem ús de bromur d'etidi (BrEt), un compost altament tòxic, és molt important treballar amb bata i guants. Ha d'haver assignada una zona del laboratori per a treballar amb el BrEt i els guants bruts de BrEt no han de sortir de la zona reservada. En cas de dubte es pot consultar amb la persona encarregada de la seguretat al laboratori.

El procés de preparació de l'electroforesi és el següent:

1. Es dissol 0,5 g d'agarosa calfant fins arribar a bullir en 50 ml de tampó TAE 1X.

TAE 50X:	Tris-base ($M_r = 121,1$ g/mol)	242 g
	Àcid acètic glacial	57,1 ml
	EDTA 0,5 M	100 ml
	Aigua destil·lada	fins a 1 litre
	Es guarda a temperatura ambient.	

2. Afegim 1 μ l de BrEt

3. Segellem el suport per a l'electroforesi amb cinta adhesiva d'autoclavar i col·loquem la pinta. Aboquem amb cura l'agarosa i deixem refredar fins que solidifiqui.

4. Una vegada gelificat llevem la pinta i la cinta adhesiva i es posa en el suport de la cubeta d'electroforesi, que ha d'estar plena de tampó TAE 1X.

5. Al llevar la pinta queden una sèrie de pouets al gel. Allí es posen les mostres de DNA, una per pouet. Abans de posar les mostres se'ls afegeixen 2 μ l de tampó de càrrega.

Materials i Mètodes

Tampó de càrrega:	Bromfenol	2,5 µg
	Xilen-cianol	2,5 µg
	Ficoll	0,15 mg
	H ₂ O	1 ml

No hem d'oblidar de carregar (normalment en el primer pouet) un marcador de pes molecular per a poder determinar la mida de les bandes de DNA. El marcador utilitzat en aquest cas ha sigut el *1 kb ladder* de New England Biolabs.

6. Es posa en marxa la font d'alimentació que proporciona un voltatge d'uns 100V.

d. Purificació de DNA.

A vegades no sols necessitem veure com corren les bandes, sinó també recuperar el DNA. Pot ser és el resultat d'una PCR i volem purificar-la de la resta d'additius o és el resultat d'una digestió com és el nostre cas. El procés es fa utilitzant el kit d'extracció de DNA per columna de Qiagen, seguint les instruccions subministrades pel fabricant.

e. Competència de cèl·lules d'*E. coli*.

Abans de transformar *E. coli* amb el plasmidi mutat, hem de convertir les cèl·lules en competents per a ser transformades amb DNA exogen. El protocol és un adaptat del descrit per [254]. S'utilitza la soca DH5α d'*E. coli*.

1. Es fa una estria en una placa de LB d'un glicerinat d'*E. coli* DH5α. Es pot posar a les 9:00 del matí a 37 °C.
2. S'inocula una colònia en 5 ml de medi LB. Es deixa *o/n* creixent a 37 °C.
3. En cultiu anterior s'inocula en 250 ml de medi SOB a 18 °C, *o/n* i a 90 rpm.
4. Es manté el cultiu en gel 10 minuts.
5. Es centrifuga a 2.500 g durant 10 minuts a 4 °C.
6. Es resuspèn el pellet suaument en 80 ml de TB temperat en gel.
7. Es manté 10 minuts en gel.
8. Es centrifuga a 2.500 g durant 10 minuts a 4 °C.
9. Es resuspèn suaument en 20 ml de TB refredat en gel.
10. S'afegeix DMSO a una concentració final del 7%, el que en el nostre cas implica afegir 1,4 ml de DMSO.

11. Es manté 10 minuts en gel.
12. Es fan alíquotes de 200 µl i es congelen amb nitrogen líquid.
13. Es conserven a -80 °C.

És molt important treballar amb la màxima esterilitat possible i respectar estrictament els temps indicats.

f. Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*.

El mètode utilitzat és una adaptació del descrit en [255]. L'adaptació del protocol s'ha fet segons l'experiència del laboratori fent transformacions al llarg dels anys.

1. Traiem 100 µl de cèl·lules competents per mostra de DNA que vulguem transformar. Les cèl·lules s'han de descongelar en gel, són molt sensibles als canvis bruscos de temperatura.

2. Afegim 2 µl de DNA a les cèl·lules que volem transformar.

3. Les mantenim 30 minuts en gel.

4. A continuació les posem 1'30'' en un bany a 42 °C.

5. Tornem a posar-les en gel 3 minuts.

6. Afegim 900 µl de medi LB i incubem 1 hora a 37 °C.

7. Sembrem 100 µl en una placa LB amb ampicil·lina i s'incuben a 37 °C tota la nit. Si han transformat al dia següent veurem colònies a la placa.

És recomanable fer una transformació amb plasmidi silvestre (control positiu) i una transformació afegint sols aigua, sense DNA (control negatiu).

g. Extracció del DNA plasmídic en *E. coli* i seqüenciació.

Per a comprovar que la mutació s'ha introduït correctament el plasmidi s'ha de seqüenciar. El primer pas per a seqüenciar-lo es extreure'l del bacteri. Per a açò s'utilitzen kits d'extracció de DNA per columna de Qiagen, seguint el protocol indicat pel fabricant. Aquestes extraccions de DNA plasmídic reben el nom de minipreps o maxipreps depenent de la quantitat de DNA plasmídic que es vulgui tenir al final. En aquest cas s'usen minipreps, en les que a partir de cultius d'*E. coli* crescuts o/n en 5 ml de medi LB es vol obtenir uns 50 µl de DNA a una concentració d'entre 100 i 200 ng/µl.

Materials i Mètodes

Més endavant, una vegada comprovat que la mutació i la lligació en pEF191 s'ha fet correctament, es fa una maxiprep per a obtenir grans quantitats de pEF191. L'objectiu és obtenir uns 10 µg de DNA en 15 µl. S'utilitza el kit proporcionat per Qiagen.

Per a seqüenciar és necessari dur una alíquota de 10 µl del DNA i 5 µl d'encebadors al servei de seqüenciació escollit. Aquests encebadors són uns oligonucleòtids dissenyats per a unir-se abans del gen i després del gen *bop* i són el punt de partida de la seqüenciació. Als encebadors utilitzats per a seqüenciar en el plasmidi pUCBM20-bop els anomenem FUP24 i RUP24 i als utilitzats per a seqüenciar en el plasmidi pEF191 bRseq3 i NewbRseq5.

Els plasmidis d'aquest treball s'han dut a seqüenciar al Servei de Genòmica de l'Institut de Biotecnologia i Bioquímica (IBB) de la UAB i al Servei de Seqüenciació del Centre de Recerca Agrigenòmica (CRAG) ubicat a l'Eureka. Es demanen uns 10 µl de mostra a una concentració mínima de 100 ng/µl i 1 µl d'encebadors per reacció a una concentració de 5 pmol/µl.

h. Competència i transformació de cèl·lules d'*H. salinarum*.

Soca L33:

El mètode utilitzat és el descrit per Yan i al. [256] i adaptat de Ni i al. [257]. Tots els tampons utilitzats han d'estar esterilitzats.

1. S'inocula la soca L33 d'*H. salinarum* d'una placa de no més d'un mes en uns 30 ml de medi C i s'incuba a 42 °C fins que la OD₅₅₀ sigui de 1-1,5 (uns 5 dies aproximadament).

2. Es centrifuguen alíquotes d'1,5 ml de cultiu, tants com transformacions es vulguin fer. No es recomana fer massa mostres cada vegada ja que això podria alterar els temps del protocol. Es centrifuga a 700 g durant 12 minuts.

3. El sediment es resuspèn suaument en 200 µl de tampó d'esferoplastos. S'ha d'intentar no fer bombolles amb la pipeta i si podem resuspendre amb petits cops de dit sobre l'ependorf millor.

Tampó d'esferoplastos:	NaCl	2 M
	KCl	27 mM
	Tris (pH 8,75)	50 mM
	Sacarosa	15%
	H ₂ O destil·lada	

S'autoclava per a esterilitzar-lo.

4. S'afegeixen 20 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8) en tampó d'esferoplastos, 10 µg de DNA en un volum de 15 µl i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient. L'EDTA no es dissol si no està a un pH lleugerament bàsic, així que durant la preparació haurem de anar pujant el pH. És recomanable afegir 15 µl de NaCl 4M als 15 µl de DNA per a tenir DNA en una solució de 2 M i no causar un xoc osmòtic que lisaria les cèl·lules.

5. S'afegeixen 230 µl de PEG600 – tampó d'esferoplastos (6 vol / 4 vol) sobre el tap de l'ependorf i s'homogeneïtza suaument, capgirant unes 5 o 6 vegades. Es deixa 20 minuts a temperatura ambient.

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

Sals de regeneració:	NaCl	4,3 M
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	80 mM
	KCl	27 mM
	CaCl ₂	1,4 mM
	Citrat trisòdic	10 mM
	Tris (pH 7,2)	50 mM
	Sacarosa	15%
	Aigua destil·lada	

7. Si el procés ha anat be, veurem un petit sediment amb una aparença esponjosa. Si no hi ha sobrenedant significa que s'ha produït la lisi cel·lular i s'ha de començar de nou.

S'afegeix 1 ml de medi C amb sacarosa.

8. S'incuba a 42 °C tota la nit a 42°C, 90 rpm i en la foscor.

9. S'inoculen 100-200 µl en plaques de medi C amb sacarosa i mevinolina a 12,5 µg/ml.

Una vegada seques les plaques, se segellen amb cinta adhesiva, es posen dins d'una bossa de plàstic tancada i es protegeix de la llum amb paper d'alumini. S'incuben a 42 °C. Passats uns 10 dies es començaran a veure petites colònies, que poden ser de dos tipus:

Blanquinoses: són colònies de cèl·lules que no s'han transformat i han crescut en zones de la placa on la concentració d'antibiòtic no ha pogut inhibir el seu creixement.

Púrpures: són les colònies que han transformat amb el DNA i sintetitzen membrana púrpura. Al principi la coloració pot ser molt dèbil per l'absència de llum i per la inhibició

Materials i Mètodes

de l'antibiòtic. Si il·luminem durant uns dies es podran diferenciar millor de les no transformades.

Soca MPK409:

El protocol és semblant al de L33 amb algunes modificacions. Per a que quedi clar, l'escrivim complet a continuació:

1. Es pica una colònia de la soca MPK409 d'una placa que no tingui més d'un més i es posa a créixer en 5 ml de medi PepOx en un Falcon de 50 ml a 42 °C, 150 rpm i sense llum. Es deixa créixer entre 2 i 3 dies.

2. Una vegada crescut el cultiu es dilueix 1 ml de l'inòcul en 30 ml de Pepox i es deixa créixer tota la nit a la foscor, a 42 °C i 150 rpm.

3. A la tarda del dia següent es prepara una dilució seriada en 6 erlenmeyers de 100 ml contenint 40 ml de medi PepOx i amb diferents quantitats de precultiu, que són: 150, 250, 500, 1.000, 1.500 i 2.000 µl.

4. Un dia després es mesura la OD_{600nm} dels cultius i s'elegeix el que estigui entre 0,45 i 0,60 de OD. En cas de dubte és millor que el cultiu estigui poc crescut.

5. Per a cada transformació són necessaris 2 ml de cultiu, que es centrifuga 3' a 6.500 rpm (3.637 g) amb una microcentrífuga de taula Centrifuge 5418 de Eppendorf. El sobrenedant es treu amb pipeta.

6. La mostra es resuspèn en 200 µl de tampó d'esferoplastos (SPH) agitant suaument els eppendorfs, sense fer ús de la pipeta.

7. S'afegeixen 8 µl d'EDTA dissolt en SPH i s'incuba 5 minuts a temperatura ambient.

8. S'afegeixen 10 µg de DNA dissolt en 10 µl i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient.

Per a evitar el xoc osmòtic, el DNA provinent d'una maxiprep i dissolt en aigua destil·lada es mescla al 50% amb NaCl 4 M. En els experiments de transformació s'ha d'utilitzar pEF191-bop WT com a control positiu i sols tampó salí com a control negatiu.

9. S'afegeixen 220 µl de PEG600 6/4 vol PEG600:SPH en la tapa de l'eppendorf, s'agita suaument invertint el recipient repetides vegades i s'incuba 20 minuts a temperatura ambient.

10. S'afegeix 1 ml de sals de regeneració temperades a 42 °C i es centrifuga 3 minuts a 6.500 rpm (3.637 g).

11. Es descarta el sobrenedant sense apurar i es resuspèn el pellet amb el que queda. S'afegeixen 800 µl de medi PepOx.

12. La mostra es transfereix a un tub de cultiu de 15 ml, s'afegeix 1 ml de medi PepOx i es deixa creixent tota a nit a la foscor a 42°C i agitació suau (54 rpm).

13. Al dia següent i el més aviat possible, ja que no és bo que estiguin creixent molt de temps, es centrifuguen les mostres amb la centrífuga de taula en eppendorfs de 2 ml, 3 minuts i 6.500 rpm (3.637 g). Es descarta el sobrenedant sense apurar i es resuspèn amb el que queda. Es pot resuspendre amb la pipeta però tenint molta cura de no fer bombolles.

14. Les cèl·lules es sembren en plaques PepOx amb Mev i es deixa la placa parcialment destapada fins que s'assequi. Açò es pot fer deixant les plaques uns 15 minuts en una campana de flux o si no en una normal, però trigarà molt mes de temps.

15. Les plaques es segellen amb cinta de PVC (cinta aïllant) i es posen a incubar a 42 °C en una bossa de plàstic tancada i sense llum.

16. Les plaques s'il·luminen quan apareguin colònies.

Aquesta soca quan es transforma té la capacitat d'integrar el DNA al seu genoma. Treballar amb colònies amb en DNA incorporat al genoma i no amb cèl·lules amb el plasmidi al citoplasma és convenient perquè el DNA plasmídic s'acaba perdent amb les successives divisions de l'organisme, mentre que amb la integració en el genoma la transformació és definitiva. Per a assegurar-se de que treballem amb colònies amb el gen mutant integrat al genoma, seguim el següent protocol:

Selecció de colònies amb 5-FOA [247, 248].

1. Piquem una colònia i es resuspèn en 100 µl de medi PepOx.
2. A partir d'aquest inòcul fem una estria en una placa de PepOX amb uracil (50 µg/ml).
3. Dividim l'inòcul en dos eppendorfs, cadascun amb 50 µl.
4. A un dels eppendorfs afegim 1 ml de medi PepOx amb uracil (50 µg/ml). A l'altre li afegim 1 ml de PepOX, uracil (50 µg/ml) i 5-FOA (àcid 5 fluorooròtic) a 0,25 mg/ml.
5. A partir d'aquestes últimes dilucions es fa una estria en plaques PepOX.
6. Incubem totes les plaques en la foscor i a 42 °C fins que es formin colònies.

Materials i Mètodes

Les colònies que són capaces de créixer després d'haver sigut tractades amb 5-FOA són les que han integrat el gen al seu genoma.

3. Manipulació de la membrana púrpura.

Una vegada aconseguim que *H. salinarum* produeixi la proteïna mutant, l'hem d'obtenir el més purificada possible. En el cas de la bR, s'expressa en *H. salinarum* per a obtenir membrana púrpura, o sigui, la bR en pedaços de membrana (bR en estructura paracristal·lina i lípids). Així purifiquem la bR mantenint les condicions el més semblants possible a les natives.

a. Extracció de la membrana púrpura.

Passats els 5 dies de cultiu sense aire, s'ha d'extreure la membrana púrpura. El mètode que utilitzem és una adaptació del descrit per Oesterhelt i al [245].

1. Centrifuguem el cultiu a 12.000 g, 10 °C, 15 minuts. Amb la centrífuga MultifugeX3R Centrifuge de Heraeus centrifuga a 4.700 rpm (4.816 g), 10 °C, 25 minuts.

2. Resuspenem el sediment en un volum total de 125 ml de NaCl 4 M.

3. Afegim 5 mg de DNasa I per a digerir el DNA genòmic i així reduir la viscositat de la mostra.

4. Es posa a dialitzar la mostra tota la nit contra NaCl 0,1 M per a produir la lisi cel·lular.

5. Centrifuguem a 4 °C, 4.000 rpm (3.134 g) en una centrífuga Scanspeed 1236R de Labogene, 10 minuts.

6. El sediment està constituït per cèl·lules que no han lisat i per restes cel·lulars. El sobrenedant es centrifuga a 4 °C, 10 min 45.000 rpm (132.000 g) en microultracentrífuga Sorvall Discovery M150 de Hitachi. El sediment estarà constituït per una part púrpura i una vermella, que correspon a altres pigments com la bacterioruberina (la soca MPK409 és *Rub⁻*, per tant no deuria haver sediment vermellós). Separem la part púrpura i es renta tres vegades més. El rentat consisteix en resuspendre amb NaCl 0,1 M, homogeneïtzar amb l'homogeneïtzador i tornar a centrifugar.

7. Es fan tres o quatre rentats més amb aigua destil·lada. En el cas dels mutants extracel·lulars, calia centrifugar a 4 °C, 15 min, 50.000 rpm (163.000 g). Al final el sobrenedant ha de quedar transparent.

8. En l'últim rentat intentem resuspendre el sediment en el volum d'aigua destil·lada més petit possible per a obtenir proteïna concentrada.

9. Fem un espectre d'absorció entre 250 i 800 nm de la mostra adaptada a la llum per a comprovar que no hi ha altres pigments i per a calcular la concentració de la mostra.

10. Dividim la mostra final en alíquotes i es guarden a -20 °C. Les alíquotes és millor que siguin petites per a que no sobri molta proteïna després de l'experiment ja que no és bo tornar a congelar i a 4 °C no es manté en bones condicions tant de temps.

b. Tractament de la membrana púrpura dels dobles mutants de cisteïna.

Per a produir els mutants amb dos cisteïnes reduïdes s'ha purificat la meitat de la mostra a partir del pas 7 en presència de DTT 1 mM, un agent reductor. La concentració de DTT s'ha de mantenir en cada pas de purificació i en cada experiment.

Per a les mostres oxidades, utilitzem com agent oxidant el glutatió oxidat o glutatió disulfur (GSSG), un tripèptid format per γ -L-glutàmic-L-cisteïna-L-glicina (GSH) que quan està oxidat forma un pont disulfur amb una altra molècula de GSH donant lloc a la forma oxidada GSSG. Reacciona amb els grups tiol lliures (-SH) oxidant-los per a reduir-se ell mateix formant de nou GSH.

Abans de fer el pas 7 s'afegeix GSSG a la mostra que es vol oxidar, a una concentració final de 1 mM, i es deixa tota la nit en agitació a 4 °C. Al dia següent es continua amb el pas 7 de la purificació per rentar la membrana púrpura de glutatió (GSH) i altres impureses.

c. Determinació de la puresa de bacteriorodopsina.

Per a esbrinar la concentració de la bR, fem un espectre d'absorció entre 250 i 800 nm per a determinar l'absorbància a 568 nm, longitud d'ona en la que trobem el màxim d'absorció de la bR adaptada a la llum (veure apartat 5.a.). Els espectres d'absorció es fan amb un espectrofotòmetre Varian Cary 3 de doble cubeta.

A aquesta mesura se li resta la línia base, que és el rastreig que es fa amb el tampó com a mostra, sense proteïna.

Materials i Mètodes



Fig. 31. Esquema del funcionament d'un espectrofotòmetre. La llum provinent d'una font passa per un monocromador i a continuació la senyal es separa en dos feixos, un que passarà per la mostra i l'altre passarà per una cubeta sense mostra, sols amb el tampó. La senyal d'ambdós feixos de llum arriba a un detector i posteriorment a un amplificador. La senyal detectada a la cubeta de referència és restada a la de la cubeta amb la mostra.

A partir de l'absorbància podem calcular la concentració fent ús de la llei de Lambert-Beer, que diu: $Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$, on Abs és l'absorbància, ϵ és el coeficient d'absorció molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) i l és la longitud de pas (en centímetres, el valor depèn de l'aparell, en el nostre cas val 1 cm). El coeficient d'absorció molar per a la bR és $63.000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ per a l'adaptada a la llum i $58.000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ per a l'adaptada a la foscor. Com la concentració es calcula amb la proteïna adaptada a la llum abans de mesurar il·luminem 2 minuts amb llum groga a una intensitat de 60.000 lux.

d. Electroforesi de proteïna en gels de poliacrilamida.

L'electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida amb SDS permet analitzar mesclades de proteïnes [258]. Els gels de poliacrilamida estan formats per polímers d'acrilamida que són entrecreuats per bisacrilamida. El SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) és un tensioactiu que desnatura les proteïnes i interacciona amb les seves càrregues positives. Esta interacció forma un compost proteïna-SDS carregat negativament i que migrarà en l'electroforesi cap al pol positiu en funció del pes molecular de la proteïna.

Amb aquesta tècnica veurem si hi ha més d'un tipus de proteïna a la mostra i si la bR ha perdut l'extrem C-terminal. Quan la bR té un alt grau de puresa a l'electroforesi sols apareix una banda indicant un pes lleugerament inferior a 26 KDa. La bR té un pes aparent inferior al seu pes real (26 KDa) en els gels de poliacrilamida. Si la bR ha perdut parcialment l'extrem C-terminal es veuran dos bandes molt pròximes. Açò pot passar amb el temps si no es congela la proteïna, sobretot en alguns mutants amb una estructura menys compacta. Si la mostra no és pura s'observaran bandes addicionals. Aleshores deuríem fer més rentats.

Hem parlat d'electroforesi discontinua. Per a una correcta separació de les proteïnes, el gel està format per dos gels diferents, el separador o inferior i l'apilador o superior.

Gel separador: El percentatge d'acrilamida/bisacrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes a separar. En aquest cas es prepara al 12% d'acrilamida/bisacrilamida. Composició per gel:

Aigua destil·lada	4,3 ml
Acrilamida	3,07 ml
Tris pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
APS 10%	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Gel apilador: Aquest gel s'utilitza per a concentrar la mostra en un únic front per a que totes les mostres entrin a la vegada en el gel separador. En aquest cas el percentatge d'acrilamida/bisacrilamida és del 4%. Composició per gel:

Aigua destil·lada	1,47 ml
Acrilamida	0,25 ml
Tris pH 6,8	0,25 ml
SDS 10%	0,02 ml
APS 10%	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Quan el gel ja està preparat s'introdueix en una cubeta d'electroforesi i s'afegeix tampó d'electroforesi, que es compra preparat a una concentració 10X. Tampó d'electroforesi 10X:

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

Abans de carregar les mostres, se'ls afegeix tampó de càrrega i es bullen 5 minuts per a desnaturalitzar-les i solubilitzar-les.

Tampó de càrrega 4X:	Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
	SDS	8%
	Blau de bromofenol	0,4%
	Glicerol	40%

A més de les mostres, carreguem al gel el marcador de pes molecular *1 kb ladder* i es resol el gel a 110 V durant aproximadament hora i mitja. Després de córrer el gel s'han

Materials i Mètodes

de fixar les bandes de proteïna. Tenyir el gel amb Coomassie R-250 durant uns 30 minuts a més de fixar les bandes els dóna color i ens permet veure-les a simple vista.

Coomassie R-250	Coomassie R-250	0,1%
	Metanol	40%
	Àcid acètic	10%
	Aigua destil·lada	50%

Després de tenyir el gel té massa color. S'elimina l'excés amb una solució destenyidora, etiquetada com a Destainer (destenyidor). Per a veure bé les bandes de bR es fan dos rentats curts a temperatura ambient i després deixar *o/n* destenyint en agitació a 4 °C.

Destenyidor:	Metanol	40%
	Àcid acètic	10%
	Aigua destil·lada	50%

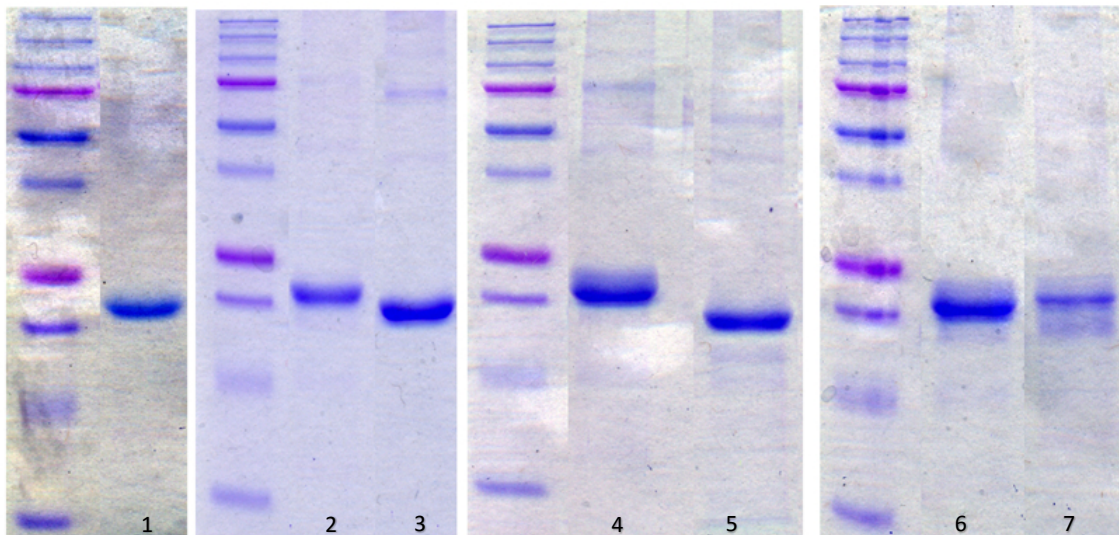


Fig. 32. Gel de poliacrilamida dels mutants citoplasmàtics. La primera banda de cada bloc de gel correspon al patró de pesos moleculars. Les mostres estan numerades i corresponen a: 1. WT, 2. V101C/M163Cred, 3. V101C/M163Cox, 4. T157C/K172Cred, 5. T157C/K172Cox, 6. A160C/A168Cred i 7. A160C/A168Cox. Les mostres poden córrer una mica diferent depenent de diversos factors com la compactació de la mostra, però en tots els casos es veu una sola mostra.

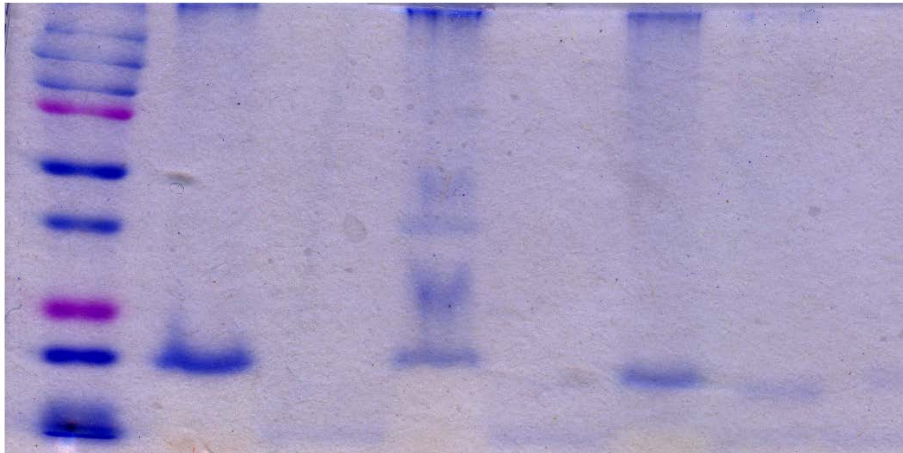


Fig. 33. Gel de poliacrilamida dels mutants extracel·lulars. Les bandes són, per ordre d'esquerra a dreta: WT, K129C/F71Cred, K129C/F71ox, K129C, L13C/L61Cred, L13C/L61Cox, L61C. A ull nu es veu una única banda en cada mostra, però algunes no s'observen al digitalitzar el gel.

e. Determinació de l'estat d'oxidació de les cisteïnes.

S'ha de comprovar que les mostres reduïdes i oxidades tinguin efectivament reduïdes i oxidades les cisteïnes. Per comprovar-ho utilitzem una sonda fluorescent anomenada 2-(4'-maleimidilanil)naftalé-6-àcid sulfònic (MIANS) de Molecular Probes. El Mians reacciona específicament amb els grups tiols lliures (-SH) i té molt poca intensitat de fluorescència quan reacciona amb una molècula petita o extrems de proteïna exposats al dissolvent. Però la seva fluorescència augmenta en ambients hidrofòbics i a més és proporcional al número de cisteïnes amb les que reacciona. Aquesta característica fa el Mians idoni per a marcar residus d'hèlixs transmembrana.

Per a treballar amb fluorescència són recomanades concentracions petites de mostra, així que es treballa a una concentració de proteïna de 2 μ M en tampó fosfat 50 mM pH 7 i una concentració final de 24 μ M a partir de l'estoc 24 mM de Mians. Com hem dit abans, el Mians reacciona amb els grups tiol, així que abans d'afegir-lo a les mostres reduïdes haurem d'eliminar el DTT. L'estoc de proteïna reduïda està dissolt en aigua destil·lada i DTT 1 mM i s'han de rentar tres vegades amb aigua destil·lada centrifugant amb la microultracentrífuga Sorvall Discovery M150 a 55.000 rpm (197.000 g), 5 minuts.

Les mesures de fluorescència es fan amb un espectrofluorímetre PTI QuantaMaster de Photon Technology International, Inc. És un aparell sensible així que per a engegar-lo s'han de seguir estrictament les instruccions indicades pels tècnics. Es treballa amb la mostra termostatitzada a 20 °C, s'excita usant dues esletxes de 1 i 5 nm i dues de 4 i 4 nm per a l'emissió. Les mostres es posen en cubetes d'1,5 ml amb les quatre cares de quars transparent i 1 cm de pas de llum. Es treballa amb volums d'1 ml en agitació constant.

Materials i Mètodes

Per a l'adquisició dels espectres s'utilitza en programa Felix 32TM. S'agafen espectres excitant els triptòfans a una longitud d'ona de 290 nm i captant l'emissió entre 300 i 500 nm, i excitant el Mians a 325 nm i captant entre 350 i 600 nm, ja que té el màxim d'emissió aproximadament en 430 nm. S'agafen ambdós tipus d'espectre sols amb tampó, per a tenir la línia base, sols amb proteïna i després de la cinètica. També s'agafa espectre excitant a 325 nm al moment d'afegir el Mians. Per a seguir la cinètica d'unió del Mians a les cisteïnes s'usen unes longituds d'excitació i d'emissió de 325 i 430 nm respectivament.

4. Estudis estructurals.

Els experiments realitzats per estudiar els mutants de la bR es poden classificar en dos grans grups, els estudis estructurals i els funcionals. Els estudis estructurals ens donaran informació sobre característiques que estan afectades per l'estructura, com per exemple l'estabilitat tèrmica del centre actiu, l'accessibilitat de la Base de Schiff al dissolvent o la isomerització del retinal. Amb els estudis funcionals estudiem el fotocicle (o part d'ell) de la bR.

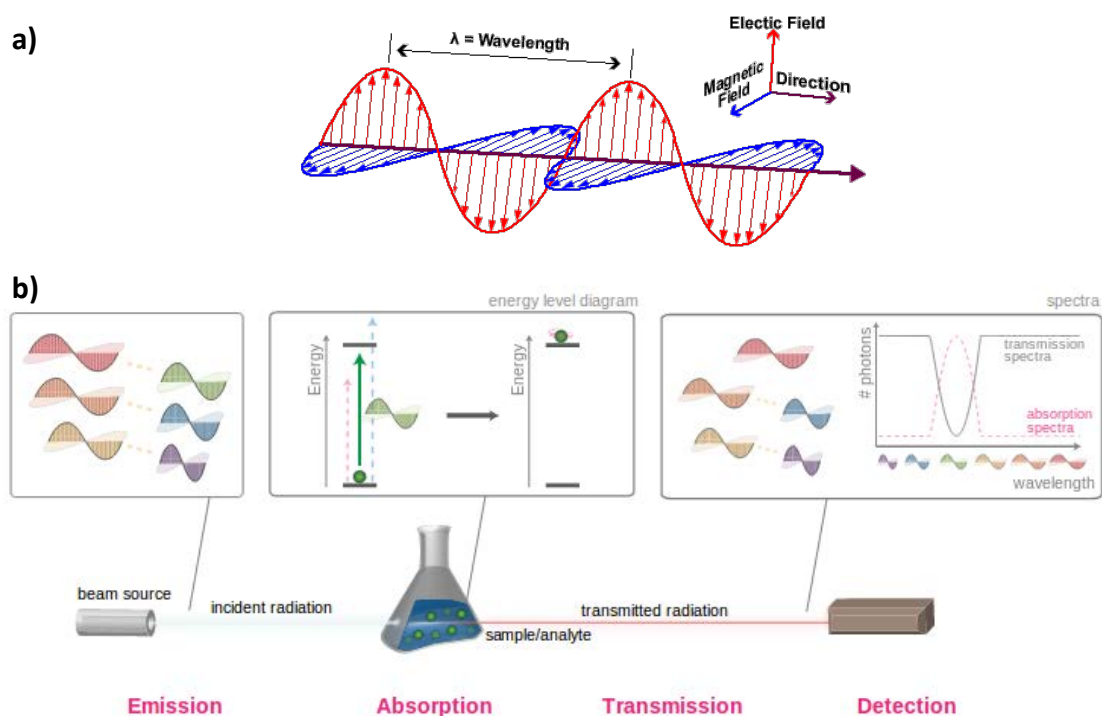


Fig. 34. a) Esquema d'una ona electromagnètica. La llum està formada per dos camps, l'elèctric i el magnètic, que són perpendiculars entre si. **b)** Esquema de la base del funcionament de l'espectroscòpia. Un feix de llum es dirigeix cap a la mostra. Si la longitud d'ona és l'adequada, serà absorbida per la mostra passant les molècules d'aquesta d'un estat basal a un excitat. Després amb un detector es poden veure quines longituds d'ona han sigut absorbides per la mostra.

En aquests estudis estructurals una tècnica important que s'utilitza és l'espectroscòpia de UV-Vis. L'espectroscòpia és l'estudi de la interacció de la radiació

electromagnètica amb la matèria. Quan la radiació electromagnètica travessa un sistema de partícules carregades, els camps elèctric i magnètic de la radiació interactuen amb les càrregues provocant una pertorbació que pot induir transicions entre diferents estats d'excitació.

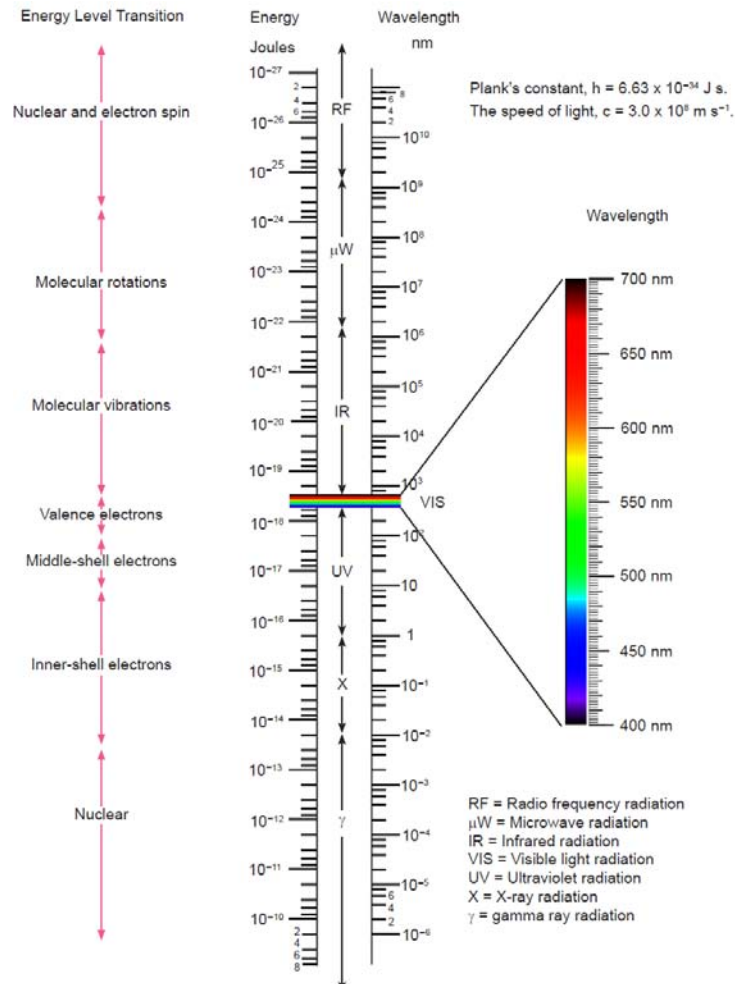


Fig. 35. Esquema de les diferents freqüències de l'espectre electromagnètic. S'indiquen les interaccions que poden establir amb molècules i àtoms, l'energia, el nom que se li dona a la radiació i la longitud d'ona. Figura obtinguda de [259].

a. Adaptació llum-fosc.

Per a fer els estudis d'adaptació llum-fosc de la bR cal treballar amb la proteïna adaptada a la foscor (DA), pel que es deixa en la foscor a 4 °C durant tota la nit. S'ha de tenir en compte que els mutants podrien necessitar més temps. L'adaptació a la llum es fa il·luminant les mostres amb una font de llum, a través d'un tub de fibra de vidre al que s'ha col·locat un filtre groc, durant 2 minuts a màxima potència i amb la cubeta a 3 centímetres de la llum (60.000 lux).

Materials i Mètodes

Amb l'espectrofotòmetre s'agafa un espectre d'absorbància en els dos estats entre 250 i 800 nm, a una velocitat d'escaneig de 600 nm/min, interval de dades de 1,0 nm, temps mitjà de 0,1 segons, amb una amplitud del feix de 2,0 nm, canvi de làmpada a 350 nm i amb correcció de línia base. Un espectre d'absorció característic de la bR en aquest rang té dos pics, un més ample entre 500 i 700 nm corresponent a l'absorbància del retinal unit a la bR i un pic més estret entre 250 i 300 nm corresponent principalment a l'absorbància dels triptòfans, encara que les tirosines també absorbeixen, però amb menor intensitat. Quan ja es tenen els dos espectres es resta l'espectre de l'adaptada a la foscor (DA) a l'adaptada a la llum (LA) per a obtenir el que s'anomena espectre de diferència. Aquest espectre mostra el que ha canviat entre la LA i la DA.

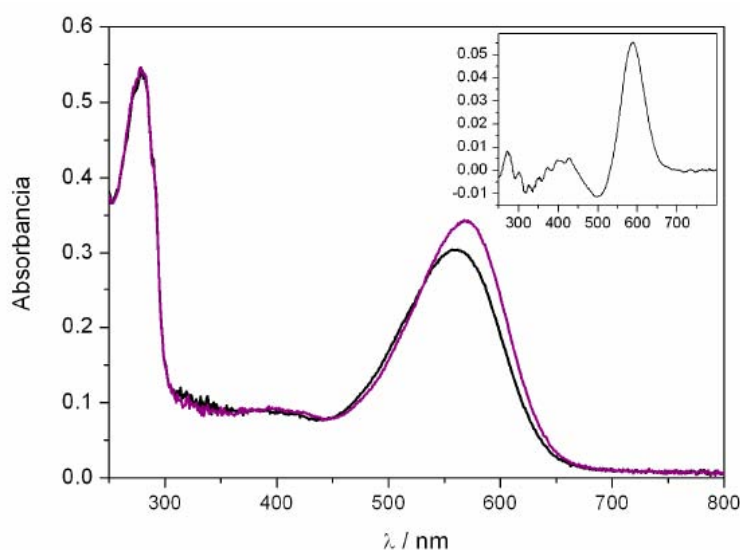


Fig. 36. El màxim d'absorbància del retinal canvia depenent de si la proteïna està adaptada a la llum (LA) o adaptada a la foscor (DA). En WT la DA té el màxim d'absorció a 558 nm i un coeficient d'extinció molar (ϵ) de $58.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La forma LA té el màxim desplaçat 10 nm cap al vermell, a 568 nm i un ϵ de $63.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En petit dalt i a la dreta veiem un espectre de diferència obtingut al restar l'espectre de la bR adaptada a la foscor al de l'adaptada a la llum. Aproximadament en 500 i 600 nm hi ha un pic negatiu i un positiu, que indica el desplaçament cap al vermell del màxim d'absorció degut a l'adaptació a la llum. En la zona de entre 300 i 450 nm, s'observen uns petits pics anomenats bandes β , associades a la isomerització del retinal durant l'adaptació de la proteïna a la llum [260].

b. Titració de la BR front al pH.

L'absorbància del retinal està afectada pels residus veïns de la butxaca d'unió del retinal (en anglès, *Retinal Binding Pocket*, RBP). El residu que més afecta és el Asp85 i un canvi en la protonació del Asp85 causa un canvi en la longitud d'absorció màxima. Quan està protonat la longitud d'ona d'absorció màxima es desplaça cap al vermell, donant lloc a la forma blava.

La tècnica de titració de la bR front al pH consisteix en agafar espectre d'absorció entre 250 i 800 nm a diferents pHs. Utilitzem bR a $15 \mu\text{M}$ i KCl 150 mM adaptada a la

fosc, HCl o NaOH per a ajustar el pH i un pHmetre Metrohm 713 serie 01 amb un elèctrode de pH Crison 52 08.

La titració àcida es fa des de pH 7 fins a pH 1. Es va acidificant la mostra i cada 0,5 unitats de pH s'agafa un espectre d'absorció i seguim la transició de membrana púrpura a membrana blava.

A_1 = Valor final de l'absorbància

A_2 = Valor inicial de l'absorbància

X_0 = Punt mig de la corba

dx = amplitud de la corba

X = pH

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

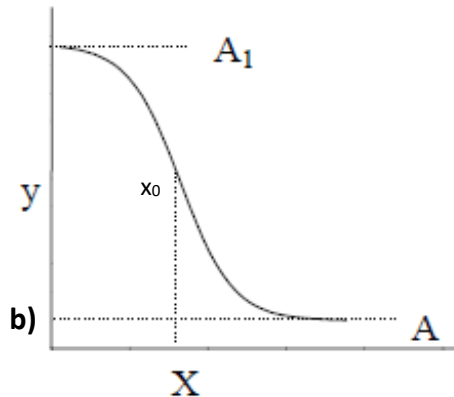


Fig. 37. Representació d'una corba d'ajust sigmoïdal. Per a calcular el pK_a aparent del Asp85 representem la variació de l'absorbància a 630 nm, on és major deguda a l'aparició de la forma blava, respecte al pH. La representació de la gràfica (b) és tipus sigmoïdal on el punt d'inflexió (x_0) és el pK_a aparent de la transició. Ajustant la corba a l'equació de Boltzmann (a) ens permet calcular els diferents paràmetres. Aquest ajust també s'utilitza per a calcular la temperatura de desnaturalització (T_m) del lloc d'unió del retinal. La representació es fa respecte a la temperatura, en compte de respecte al pH i el punt mig de la corba és la T_m .

c. Estabilitat tèrmica.

Per a determinar la temperatura de desnaturalització (T_m) del centre actiu de la bR s'utilitzen mostres adaptades a la foscor a una concentració de 15 μ M, en tampó KCl 150 mM pH 7. S'incuba la bR durant 8 minuts a temperatures entre 25 $^{\circ}$ C i 95 $^{\circ}$ C i s'agafen espectres d'absorció a cada temperatura. La temperatura s'ajusta a intervals de 5 $^{\circ}$ C en la cel·la de l'espectrofotòmetre amb un termostatitzador complementari.

La representació de la variació d'absorció a 568 nm respecte a la temperatura s'ajusta a una corba sigmoïdal, igual que passava amb el pK_a (Fig. 35) i el punt d'inflexió indicarà la T_m del centre actiu de la bR.

d. Hidròlisi de la Base de Schiff amb hidroxilamina.

Aquesta tècnica s'utilitza per a calcular l'accessibilitat de la Base de Schiff (BS) a la hidroxilamina. La hidroxilamina reacciona amb la Base de Schiff donant lloc a bacterioopsina (bR sense retinal) i retinal oxima. Aquest procés es pot seguir adquirint espectres d'absorció entre 250 i 800 nm a diferents temps i veient la desaparició del pic a 570 nm i l'aparició d'un nou pic a 370 nm. L'experiment es pot fer amb mostres

Materials i Mètodes

adaptades a la llum i adaptades a la foscor, sent amb les adaptades a la llum i il·luminació constant molt més ràpida (minuts i hores respecte a dies).

En aquest cas la corba que es forma per la representació de la variació d'absorbància a 570 nm respecte al temps s'ajusta a una exponencial.

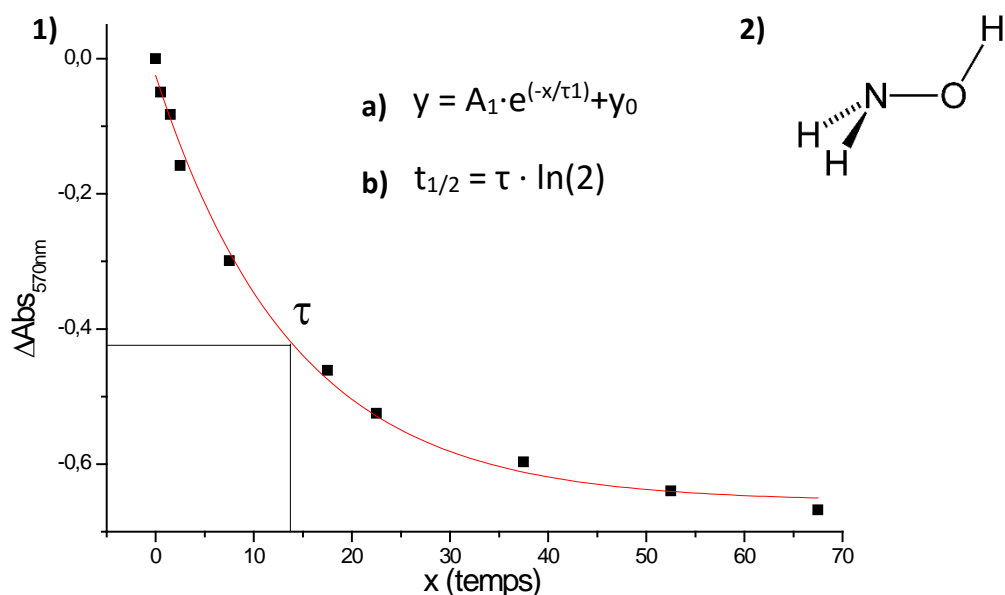


Fig. 38. 1) Representació de la variació de l'absorbància a 570 nm amb el temps (■) i el seu ajust a una corba monoexponencial decaent (—). **1.a)** Fórmula de l'ajust exponencial on y és la variació de l'absorbància en funció del temps, y_0 és el valor de y cap on tendeix la corba, A_1 és l'amplitud del canvi de variació d'absorbància, τ és la constant de caiguda de la corba i x és el temps. **1.b)** L'ajust ens dona el valor de τ , però el valor utilitzat per a determinar la velocitat de la reacció és $t_{1/2}$ (temps de vida mitjà o vida mitjana), que es calcula amb aquesta fórmula. **2)** Molècula d'hidroxilamina.

5. Estudis funcionals.

a. Determinació del transport de protons de la bR

La mesura del transport de protons per part de la bR es pot fer mitjançant dos sistemes:

- Bacteriorodopsina incorporada en liposomes

Es mesura el canvi de pH del medi degut al bombeig de protons cap a l'interior de liposomes, on incorporem fragments de membrana púrpura. Preparem proteoliposomes a partir d'una mescla de bR i fosfatidilcolina (PC) d'ou (Lipoid E PC S al 96%) en 15 ml de KCl 150 mM a una concentració final de PC de 6 mg/ml i 0,12 mg/ml de bR. Els passos per a preparar-los són [261, 262]:

1. Afegir 0,45 ml de PC dissolta en cloroform a 200 mg/ml en un baló de vidre i rotavaporar a temperatura ambient durant uns 15 minuts. Hauria de veure's la PC precipitada en les parets.

2. Per a assegurar-se de que s'ha eliminat bé el cloroform s'embolica el baló amb paper d'alumini i es col·loca en una campana de buit durant 30 minuts. En acabar, i com a última mesura per a assecar, s'introdueix nitrogen al baló.

3. Es preparen 10 ml d'una suspensió de membrana púrpura a una concentració de BR de 0,12 mg/ml en KCl 150 mM pH 7 i s'afegeix al baló.

4. Es tapa la boca del baló amb parafilm i es vortexa durant uns 10 minuts per a dissoldre la PC. En aquest pas es formen proteoliposomes multilamel·lars i amb mides variables.

5. Per a aconseguir proteoliposomes unilamel·lars i homogenis, en torn a un diàmetre de 60 nm, es passa la mescla per un microfluiditzador. És un aparell que fa passar líquids per una sèrie de filtres a alta pressió (4 bars), sotmetent-los a fortes compressions i descompressions. L'aparell utilitzat és un Microfluidizer 110S.

Abans d'utilitzar-lo s'ha de rentar primer amb etanol, aigua destil·lada i KCl 150 mM. Es renta amb KCl 150 mM per a evitar la dilució de la mostra. Els liposomes es recircularitzen pel circuit durant dos tandes, una de dos minuts i una altra d'un minut. Durant el procés l'aparell genera molt de calor i la mostra pot arribar a escalfar-se massa. Per a esmorteir l'augment de temperatura es col·loca a sobre una bossa de plàstic amb gel.

6. Per comprovar la mida dels liposomes s'utilitza un Microtrack UPA 150 (Honeywell, USA). El mecanisme subjacent es basa en que si fem incidir un làser (a 780 nm en el nostre cas) en una solució de liposomes produeixen una dispersió que depèn de la mida dels liposomes.

La llum dispersada sofreix un desplaçament de la freqüència original, degut a l'efecte Doppler, que depèn de la velocitat de les partícules. Part de la llum es dispersa en un angle de 0° respecte al feix de llum incident i va a un detector. La diferència de freqüència es detecta mesurant la interacció del feix dispersat amb el feix original. Tractant matemàticament les dades es passa de dades de la intensitat respecte al temps a intensitat-freqüència. Si aquestes dades es representen s'obté una corba lorentziana (quan totes les partícules són de la mateixa mida) o una multilorentziana quan hi han diverses poblacions. Amb la deconvolució de les dades s'obté la distribució de les poblacions de mesures de liposomes. Totes aquestes operacions les fa el programari de l'aparell.

Per a la mesura les mostres es dilueixen en tampó fins a tenir un índex de càrrega de entre 0,1 i 0,2. Els paràmetres utilitzats són: viscositat a 25 °C de 1,002 cP, índex de refracció d'1,332, temps de lectura de 10 minuts, índex de refracció del fosfolípid d'1,49, densitat dels liposomes 1,01 g/cm³ i partícules esfèriques.

Materials i Mètodes

Una vegada preparats els liposomes amb proteïna, ja es pot fer la mesura del transport. Per a fer-ho s'introdueixen 2,5 ml de mostra en una cubeta de plàstic amb un petit agitador magnètic. Aquesta cubeta s'introdueix en un vas de precipitats de vidre amb aigua per a que termostatitzi la mostra. S'il·lumina amb un transil·luminador a màxima potència situat a 6,5 cm del centre de la cubeta i amb filtre groc per a filtrar la llum UV (39.000 lux). La mesura del pH es fa amb el mateix elèctrode que l'experiment de titració, sols que aquesta vegada el pH-metre està connectat a l'ordinador i un programa registra els valors de pH a diferents temps.

Abans de començar l'experiment la mostra s'il·lumina dos minuts per a adaptar la proteïna a la llum i es deixa 10 minuts a la foscor per a que els protons tornin a sortir per difusió.

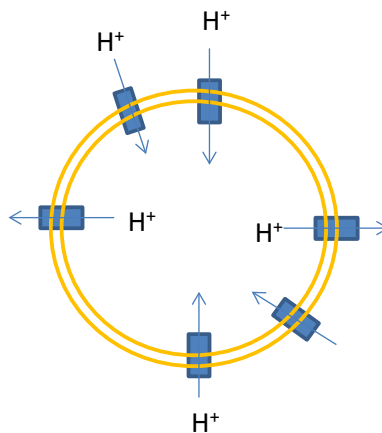


Fig. 39. Esquema dels proteoliposomes preparats. La bR es troba embebuda a la bicapa lipídica dels liposomes amb una orientació de bombeig dels protons majoritàriament de fora cap a dins, de tal manera que quan bomben protons els transporten de la dissolució cap a l'interior dels proteoliposomes.

Enguegem el programa d'anotar el pH amb el temps i deixem un minut a la foscor. Aleshores encenem la llum durant 1:30 minuts i tornem a deixar en la foscor uns 10 minuts fins que el pH es torni a estabilitzar. S'ha d'il·luminar fins que el pH ja no pugi més i arribi a un màxim (*plateau*). En WT amb 1:30 minuts hi ha suficient però en els mutants podria caler més temps si són més lents.

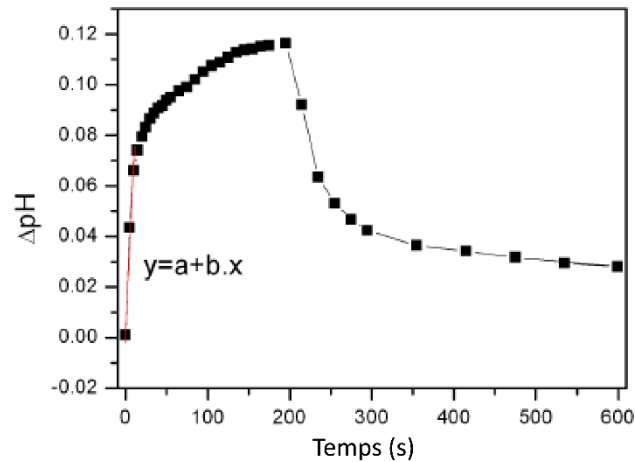


Fig. 40. Durant el processament de dades representem la variació del pH amb el temps. Ajustant els primers punts amb il·luminació a una equació lineal (línia vermella) obtenim una pendent (b) que representa la velocitat de bombeig de protons. Aquest valor ens servirà per a comparar els diferents mutants.

- Transport mesurat amb piranina.

Aquesta és una tècnica indirecta per a mesurar el transport de protons basat en el canvi d'absorció d'un colorant (piranina) dependent del pH. Per a poder entendre-la bé primer cal explicar els que és la fotòlisi de llampec. Una vegada explicat s'abordarà aquesta qüestió.

b. Fotòlisi de llampec.

Amb l'espectrofotòmetre de UV-Vis sols es pot veure l'intermediari més llarg, que és la bR en estat basal, així que no ens dóna informació sobre el fotocicle. Doncs aquesta tècnica permet observar espectroscòpicament canvis d'absorbància a temps molt curts, des de microsegons a mil·lisegons.

L'aparell que s'utilitza és un LKS50 d'Applied Photophysics amb un làser Nd:YAG (abreviatura de Neodymium: Ytrium Aluminium Garnet, de Spectron Laser Systems). L'energia del làser necessària és de 5 mJ/pols·cm² amb una freqüència de repetició de 0,5 Hz. L'aparell està connectat a un oscil·loscopi i a un ordinador amb el programa de processament de dades LASER Applied Photophysics.

Materials i Mètodes

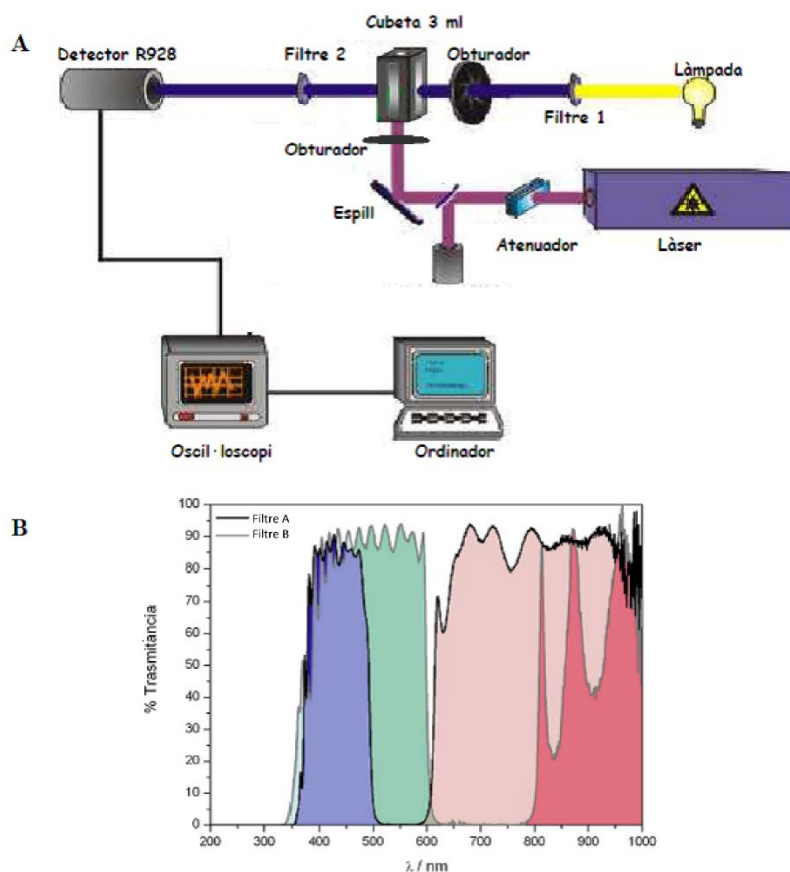


Fig. 41. a) El làser incideix en la cubeta de quars de 4 cares transparents on està la mostra i excita les molècules de bR. Al mateix temps es fa incidir un feix de llum perpendicularment per a mesurar l'absorbància a una longitud d'ona que depèn de l'intermediari a estudiar. **b)** S'utilitzen 2 filtres de llum per a seleccionar un rang de longituds d'ones per al feix perpendicular. Així, es posa l'A, el B o ambdós dependent de la longitud d'ona a la que volem treballar. Els filtres es col·loquen just després de la làmpada.

Així, aquesta tècnica ens permetrà l'estudi d'intermediaris del fotocicle i determinar indirectament el transport de protons.

- Estudi de cinètiques d'intermediaris del fotocicle.

L'estudi es fa amb bR 15 μ M adaptada a la llum, KCl 150 mM, a 20 $^{\circ}$ C i pH 7 i pH 10 i consisteix en mesurar l'absorbància amb el temps i fer la diferència entre l'absorbància de la mostra excitada amb el làser i sense excitar. L'escala temporal depèn del mutant i de la fase del fotocicle i va des de microsegons a segons. La termostatització es fa amb un bany d'aigua connectat al portacubetes.

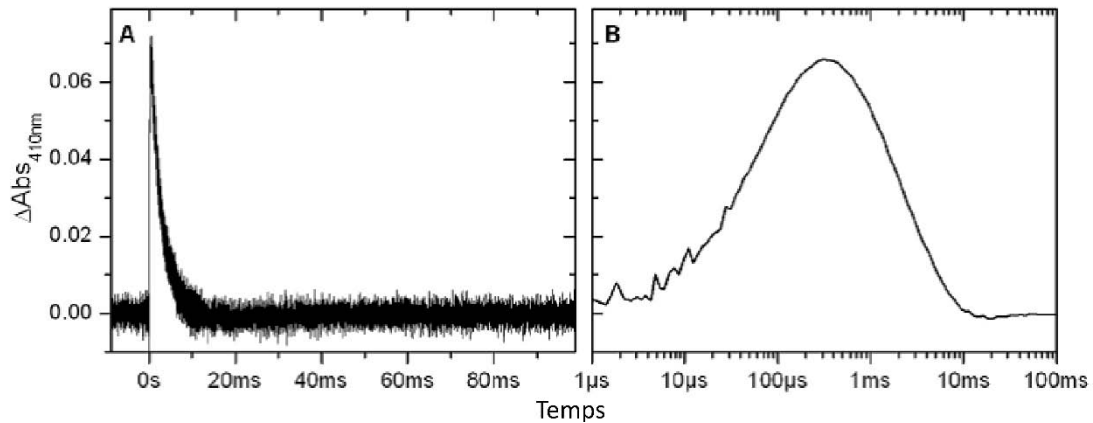


Fig. 42. a) Evolució temporal de l'absorbància de bR, 15 μ M, pH 7 i KCl 150 mM a 410 nm. A 410 nm té el seu màxim d'absorció l'intermediari M i com és el que té el màxim més diferenciat de la resta, és el que millor es pot estudiar. Per a cada valor de longitud d'ona es fan almenys tres mesures cada tres segons i es fa la mitjana. **b)** Representació de la cinètica amb una escala temporal logarítmica i suavitzant la gràfica reduint el nombre de punts per dècada fent la mitjana.

L'absorbància s'ha mesurat a tres longituds d'ona diferents: a 410 nm per a l'intermediari M; a 570 nm per a la desaparició i formació de l'estat basal i per l'intermediari N; i a 660 nm, influenciat principalment per l'intermediari K a temps massa curts per a mesurar-los i per l'intermediari O en l'escala dels mil·lisegons.

És possible comparar mesures entre mostres a diferents concentracions perquè l'absorbància es proporcional a la concentració, encara que no es recomana utilitzar concentracions molt més baixes degut a que s'obtidria una mala relació senyal/soroll.

- **Determinació de canvis de pH al medi.**

Amb l'aparell de la fotòlisi de llumpec es poden mesurar canvis locals de pH fent ús del colorant piranina (àcid-8-hidroxi-1, 3, 6-piretrisulfonat trisòdic), que és capaç de detectar els canvis de pH del medi on es troba dissolt [263].

En aquest cas, al contrari que en l'estudi de les cinètiques dels intermediaris, no s'usa tampó de pH, sols KCl 150 mM ajustat a pH 7,2. A més, es fan 5 mesures en compte de tres i es fa la mitjana. El resultat es representa logarítmicament i es fa una mitjana de punts per a reduir el nombre de punts per dècada.

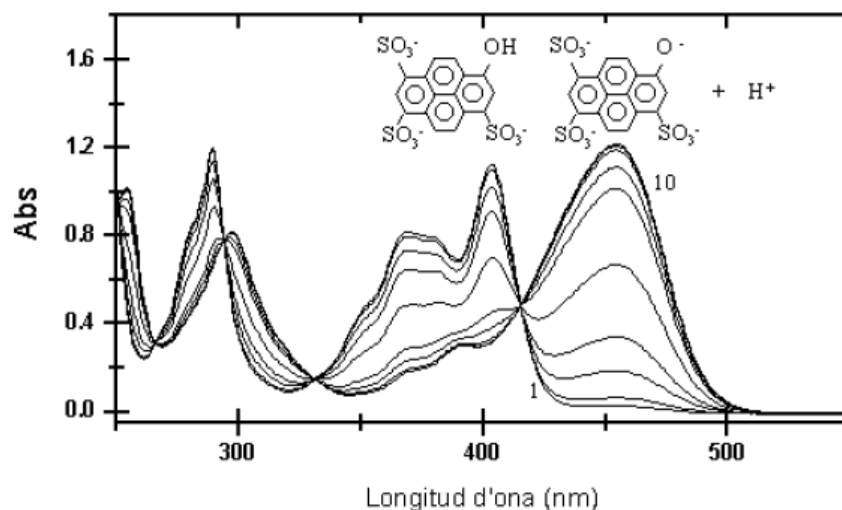


Fig. 43. Espectre d'absorbància UV-Visible de la piranina a 20 μM en KCl 150 mM a diferents valors de pH (de l'1 al 10, 5'1, 5'5, 6'0, 6'4, 6'9, 7'2, 7'6, 8'5, 8'8 i 9'2). Es mostra l'estat de ionització corresponent a cada pic. La piranina té un màxim d'absorció a 460 nm i aquest màxim depèn de l'estat de ionització del grup hidròxid. El colorant canvia la seva absorbància en funció del pH i ja que a KCl 150 mM el pK_a de la piranina és 7,2, es poden mesurar espectroscòpicament els canvis de pH al voltant d'aquest valor. El procediment per a obtenir els canvis d'absorbància a 460 nm consisteix en mesurar l'absorbància amb el temps sense piranina i després amb piranina i obtenir l'espectre de diferència de la segona menys la primera mesura. Açò ens permet restar a contribució d'intermediaris que puguin absorbir en aquesta longitud d'ona.

Aquest és el segon mètode mencionat abans per a mesura el transport de protons per part de la bR. Si transporta protons causarà un canvi en el pH del medi que serà mesurat amb l'ajuda de la piranina.

c. Caracterització d'intermediaris del fotocicle mitjançant FTIR.

L'espectroscòpia d'infraroig és una tècnica que podríem anomenar clàssica. És una tècnica de gran sensibilitat per a determinar la composició química i l'arquitectura de petites molècules. A pesar de que hi ha qui la considera ja una tècnica obsoleta, és molt útil per a l'estudi de proteïnes ja que pot proporcionar molta informació sobre grups químics i paràmetres estructurals. En una proteïna com la bR que passa per diversos intermediaris a través de canvis conformacionals i canvis de protonació de grups és una tècnica molt útil, ja que cada intermediari presenta un espectre característic.

Si tornem a veure les figures 32 i 33, veurem que en el cas de la radiació infraroja, la interacció amb la matèria té lloc a nivell molecular, de vibracions moleculars, ja que l'energia de la llum infraroja no és suficient per a induir transicions en els electrons de valència. Per contra, la radiació infraroja excita els moviments vibracionals i rotacionals de les molècules.

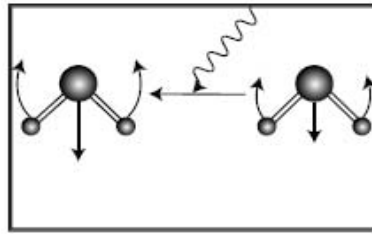


Fig. 44. L'absorció d'un fotó de l'espectre de l'infraroig pot incrementar l'energia vibracional d'una molècula.

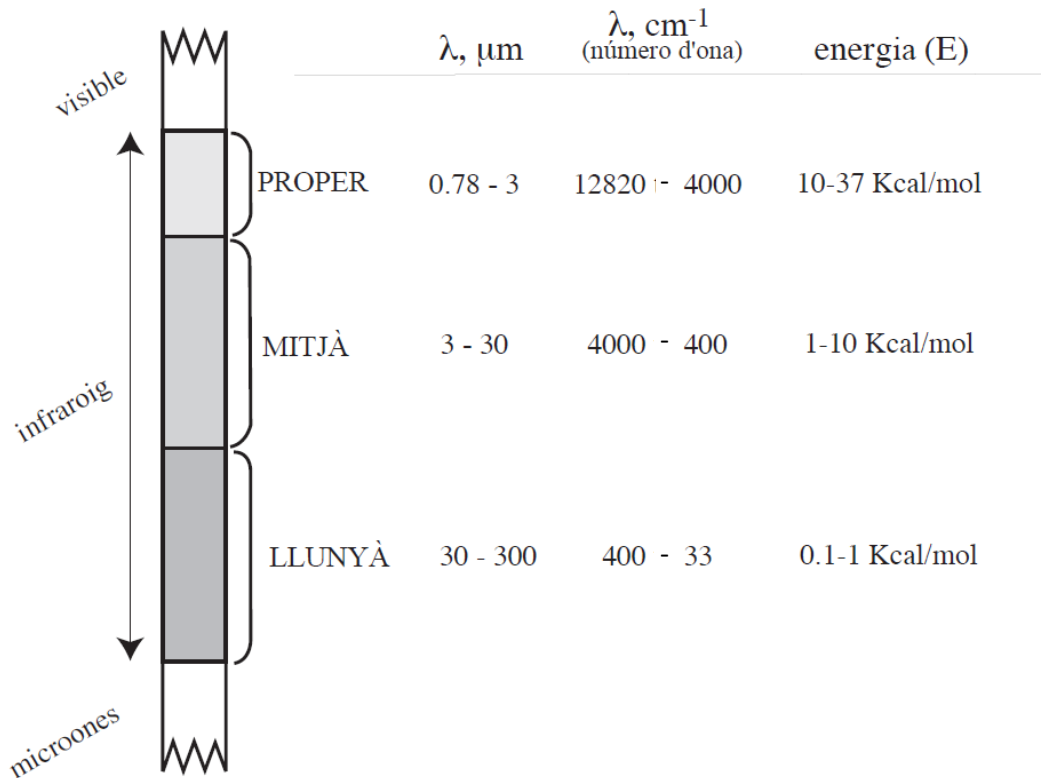


Fig. 45. Excepte per les diferències en la transferència d'energia de la radiació a la molècula, els principis de l'espectroscòpia d'IR són els mateixos que els de l'espectroscòpia de UV/VIS. Així, l'absorció de la radiació infraroja és caracteritzada per la llei de Lambert-Beer. L'espectre de l'IR es divideix en 3 regions, l'infraroig llunyà, mitjà i proper segons la seva proximitat a les longituds d'ona de la regió del visible.

La radiació interacciona mitjançant els camps elèctrics i magnètics. La força de la interacció entre un sistema de partícules carregades i un camp elèctric ve donada per:

$$V_{\text{int}} = -\mu \cdot E$$

La fórmula ve de la llei d'Ohm on V és l'energia potencial de la interacció, E és el camp elèctric i μ és el moment dipolar elèctric. El moment dipolar depèn de la posició i càrrega de les partícules. Així, per a que la llum i la matèria puguin interaccionar, les partícules han de tenir un moment dipolar no nul.

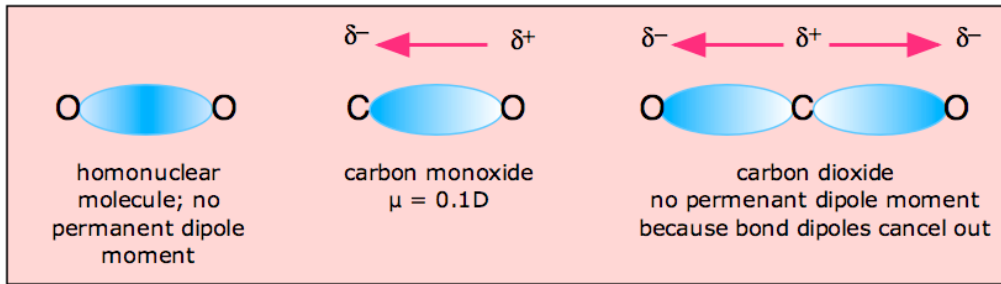


Fig. 46. Exemple de tres molècules amb diferents moments dipolars. El CO₂ encara que en quant a moment dipolar es cancel·laria, la longitud i orientació dels enllaços va variant, no té moment dipolar permanent

Per explicar el mode en que la radiació IR interacciona amb la matèria, s'agafa el model de l'oscil·lador harmònic, en el que s'estudia la vibració entre dos àtoms d'una molècula diatòmica. S'assumeix que aquesta situació és comparable a una molla elàstica que uneix dos esferes de massa m_1 i m_2 . Es considera que r_0 és la distància mitjana internuclear (distància d'equilibri), que apropar les esferes causa una força de repulsió i allunyar-les està dificultat per una força atractiva. La força d'expansió i compressió de l'enllaç vindria donada per la llei de Hook: $F = -k(r - r_0)$.

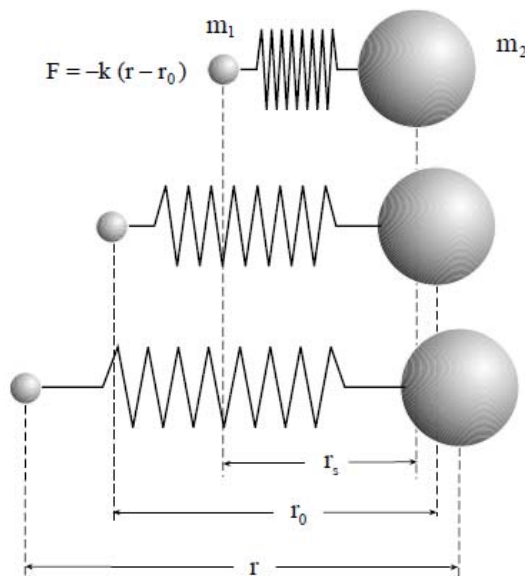


Fig. 47. Esquema de l'aplicació de la llei de Hook a un model diatòmic.

Segons aquest model de la mecànica clàssica, l'energia potencial és funció de la distància i es podria representar com a:

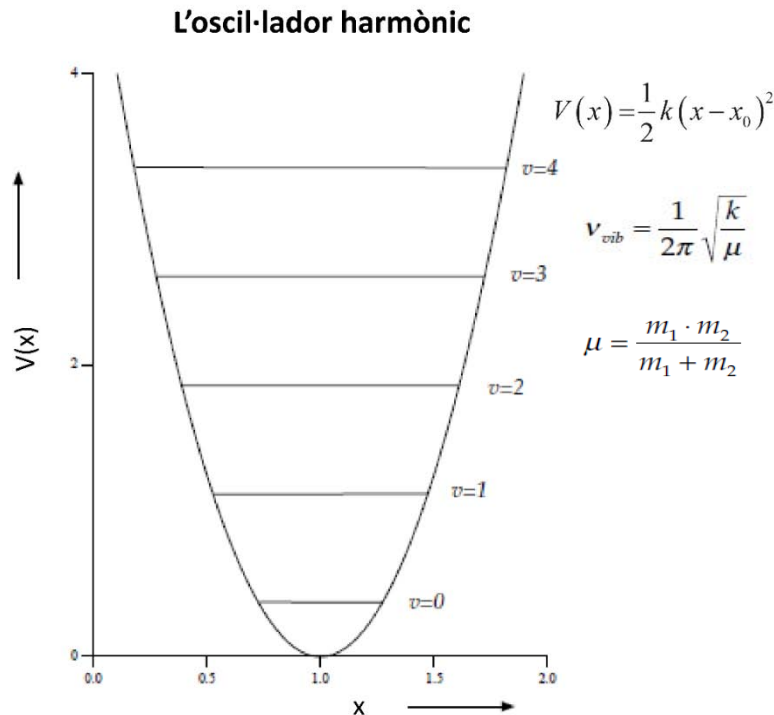


Fig. 48. Representació de l'energia potencial respecte a la distància entre les dues partícules. ν_{vib} seria la freqüència d'oscil·lació, on k és la constant de força i μ és la massa reduïda del sistema.

Segons l'equació de Schrödinger, els moviments de les partícules estan sotmesos a l'energia potencial $[V(x)]$. Si el potencial obliga a la partícula a moure's en una zona restringida de l'espai, els valors propis de l'energia formen un conjunt discret. El confinament d'una partícula (limitació del seu moviment) es manifesta en la quantització de la seua energia total. Així en el model de l'oscil·lador harmònic, on $V(x) = \frac{1}{2}k(x - x_0)^2$, l'aplicació de l'equació de Schrödinger ens dona que els valors possibles de l'energia són: $E_v = (v + 1/2)h\nu$, on v és el número quàntic vibracional de valors enters 0, 1, 2, 3... h és la constant de Planck i ν és la freqüència de vibració. Així, en contrast amb la mecànica clàssica, l'energia vibracional de les molècules està quantitzada. Aplicant la mecànica quàntica a l'oscil·lador harmònic, hi ha una sèrie de regles de selecció, unes condicions que s'han de complir per a que es puguin donar les transicions. Una és la del moment dipolar no nul, altra és que els canvis vibracionals permesos són de $\Delta v = \pm 1$.

La tercera té ha veure amb la **condició de ressonància**. La condició de ressonància és la energia necessària per a que la radiació provoqui que el sistema material passi d'un estat basal a un d'excitat. Tenint en compte l'equació, la condició de ressonància serà:

$$E_{v+1} - E_v = \left(v + 1 + \frac{1}{2}\right)h\nu - \left(v + \frac{1}{2}\right)h\nu = h\nu$$

Així, per a tenir ressonància entre la molècula vibrant i la radiació, la freqüència de radiació ha de ser idèntica a la freqüència de vibració.

Si es vol aprofundir més, es pot tenir en compte que les molècules no es comporten exactament com dos masses connectades per una corda. Els enllaços reals no obeeixen la llei de Hook. S'ha proposat un model empíric per descriure-ho, el model de l'Oscil·lador Anharmònic:

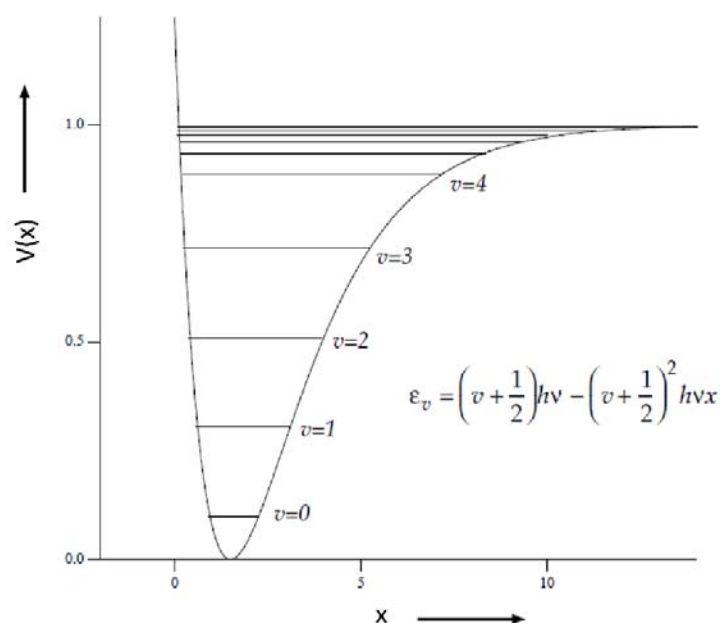


Fig. 49. Model de l'oscil·lador anharmònic. En aquest cas les transicions permeses serien de $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$

Aleshores, amb la radiació infraroja podem provocar vibracions moleculars. Però, com són aquestes vibracions? I són totes iguals? Per a poder descriure la forma de les vibracions, hem de poder descriure la molècula. Per a una molècula amb N àtoms, es pot descriure la localització de cada àtom en l'espai amb 3 coordenades, x , y i z . Aleshores el nombre total de coordenades possibles en la molècula és de $3N$. Parlant de graus de llibertat, una molècula amb N àtoms té un total de $3N$ graus de llibertat, que corresponen amb les coordenades cartesianes de cada àtom. En una molècula no lineal, 3 d'aquests graus són rotacionals i 3 són translacionals.

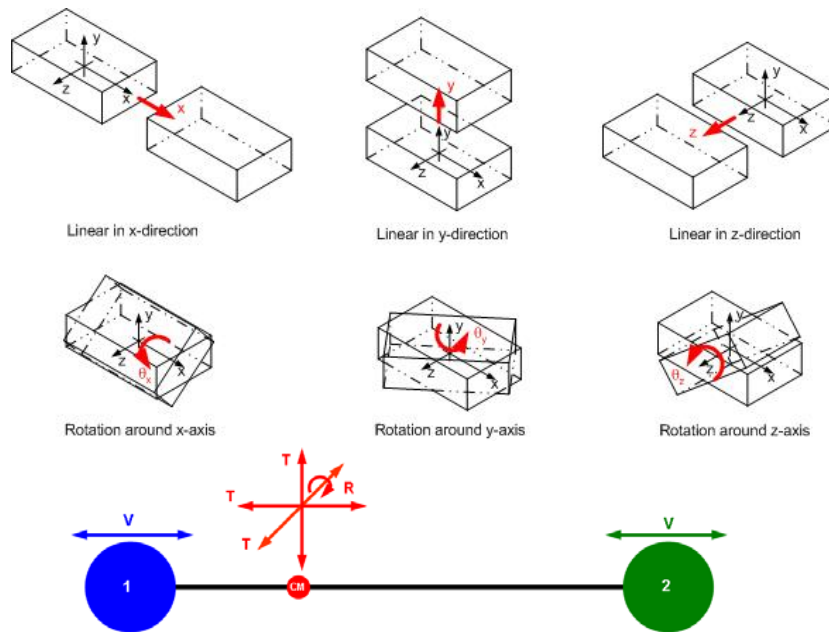


Fig. 50. Tipus de vibracions que poden tenir lloc en una molècula no lineal amb $3N$ graus de llibertat.

A partir d'aquí, podem classificar les vibracions. La classificació més general és classificar-les en vibracions simètriques i asimètriques depenent de si mantenen la simetria de la molècula. A més es poden diferenciar en vibracions al llarg de l'enllaç (*stretching vibrations*) i vibracions que canvien la forma de la molècula (vibracions de deformació o *bending*).

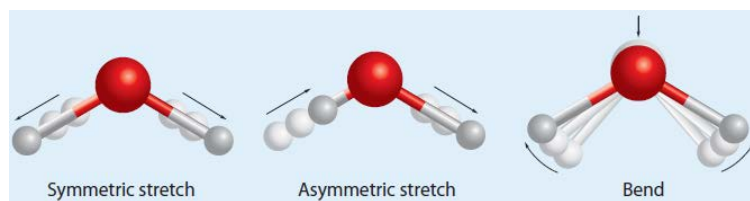


Fig. 51. Esquema de vibracions de *stretching* i de *bending*.

En biomolècules podem trobar alguns grups químics que compleixen les característiques per a poder ser observats per espectroscòpia d'infraroig:

C—H: aquest grup químic és molt comú en les biomolècules. Té unes bandes d'absorció característiques i la banda està a un número d'ona diferent depenent de quins enllaços forma el carboni a part de amb l'hidrogen.

O—H: Aquest grup químic és molt important. No només és un dels grups que forma ponts d'hidrogen, sinó que, a més, està present en l'aigua. Aquest grup en l'aigua presenta un pic molt gran i pot emascarar altres bandes. L'espectre d'IR d'aquest grup químic en les biomolècules dóna informació sobre com de fort és un pont d'hidrogen. Quan més fort és un pont d'hidrogen, més llarga és la distància d'enllaç O—H i més baixa és la freqüència de vibració i més ampla i intensa és la banda d'absorció. Cal tenir

Materials i Mètodes

present, però, que altres factors com la naturalesa de l'entorn, acoblaments vibracionals o ressonàncies influencien la posició i la forma de les bandes.

N—H: en les biomolècules, aquest enllaç pot trobar-se formant ponts d'hidrogen, però també en l'enllaç peptídic (amina monosubstituída), en forma d'imines, $-NH_3$,

C=O: La banda d'absorció d'aquest enllaç produeix una de les bandes més intenses de l'espectre IR. L'ordre en intensitat d'absorció de les diferents formes en les que pot aparèixer aquest enllaç és: Àcid carboxílic > Èster > Cetones.

Interferòmetre de Michelson.

Els espectrofotòmetres d'infraroig amb transformada de Fourier tenen tres components bàsics: la font de radiació, l'interferòmetre i el detector. L'interferòmetre de Michelson consisteix en tres components: un espill mòbil, un espill fix i un divisor de feix. Els espills són perpendiculars l'un respecte de l'altre. El divisor de feix és un dispositiu semireflectant. Es dirigeix un raig col·limat al divisor de feix que el divideix en dos raigs amb aproximadament la mateixa intensitat, un dels quals va a l'espill fix i l'altre al mòbil. Aquests dos raigs són reflectits i retornen al divisor de feix on recombinen creant interferències i van a un detector. Si es mou un dels espills es crea una diferència de pas entre els dos raigs. Conforme la diferència de pas canvia, els dos raigs estan en fase o no l'un amb l'altre, alternant interferències constructives i destructives.

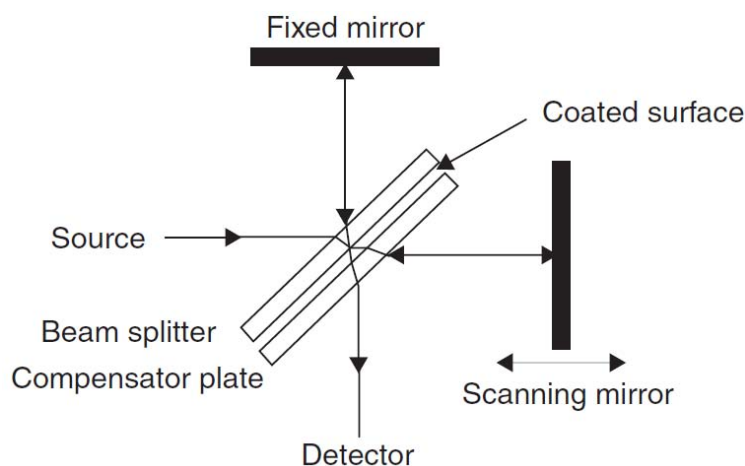


Fig. 52. L'òptica bàsica d'un interferòmetre de Michelson [264].

Com a curiositat històrica, quan Michelson va construir l'interferòmetre la seva intenció era demostrar l'existència de l'èter, una substància que seria omnipresent i sobre la qual "nadarien" els planetes en l'univers. L'experiment per a mesurar l'efecte de l'èter es va fer famós precisament pel contrari, va demostrar que l'èter no existia, encara que sembla que tant Michelson com Morley seguien convençuts de la idea original, tal com diuen al seu article [265]:

“Sembla que, per tot el precedent, hi ha una certesa raonable de que si hi ha cap moviment relatiu entre la terra i l’èter lumínic, aquest deu ser petit; suficientment petit per a refutar l’explicació de l’aberració per part de Fresnel. Stokes donà una teoria de l’aberració que assumeix que l’èter en la superfície de la Terra està en repòs respecte a aquesta, i sols requereix que la velocitat relativa tingui potencial; però Lorentz mostra que aquestes condicions són incompatibles. Lorentz aleshores proposa una modificació que combina algunes idees de Stokes i Fresnel, i assumeix l’existència del potencial, junt amb el coeficient de Fresnel. Si ara estem legitimats per a concloure pel present treball que l’èter està en repòs respecte a la superfície de la Terra, d’acord amb Lorentz no pot haver una velocitat potencial, i la seva pròpia teoria també falla”.

Nota: Fresnel proposava que l’èter es trobava parcialment intricat en la matèria i Stokes proposava que estava intricat en el buit de matèria.

Es van fer repeticions més acurades de l’experiment que van acabar sent proves irrefutables per a la posterior teoria de Lorentz i finament per a que Einstein descartés del tot l’existència de l’èter a la seva teoria de la Relativitat Especial (any 1905).

Una radiació monocromàtica produeix una senyal sinusoidal, la freqüència del qual és directament proporcional al número d’ona. La senyal d’una font complexa consisteix en una combinació de senyals sinusoidals superposades, anomenat interferograma. Un interferograma típic té una senyal forta on els passos de dos ones són iguals, i decau conforme la diferència de pas s’incrementa. Aquest interferograma pot ser convertit en un espectre d’intensitats a diferents números d’ona mitjançant la transformada de Fourier.

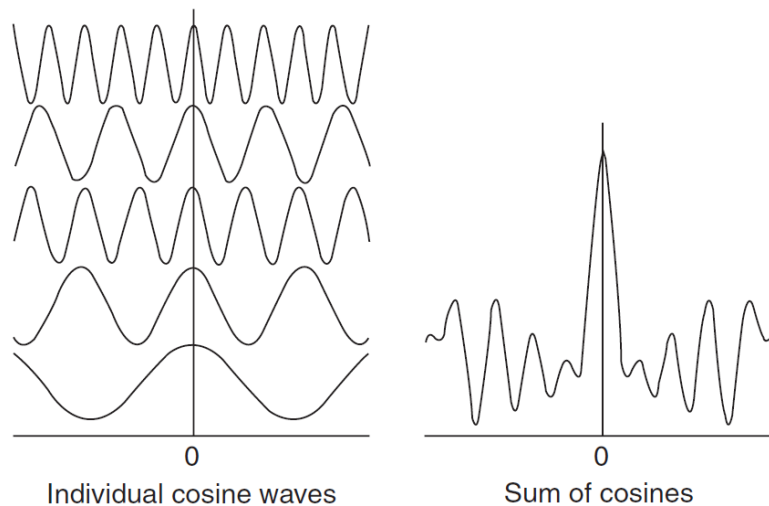


Fig. 53. L’interferòmetre capta interferogrames com els de la figura de la dreta i aquests consisteixen en la combinació de senyals individuals. Per explicar-ho, totes les senyals individuals que provenen de la mostra (figura de l’esquerra) es combinen en una sola ona complexa (dreta) [264].

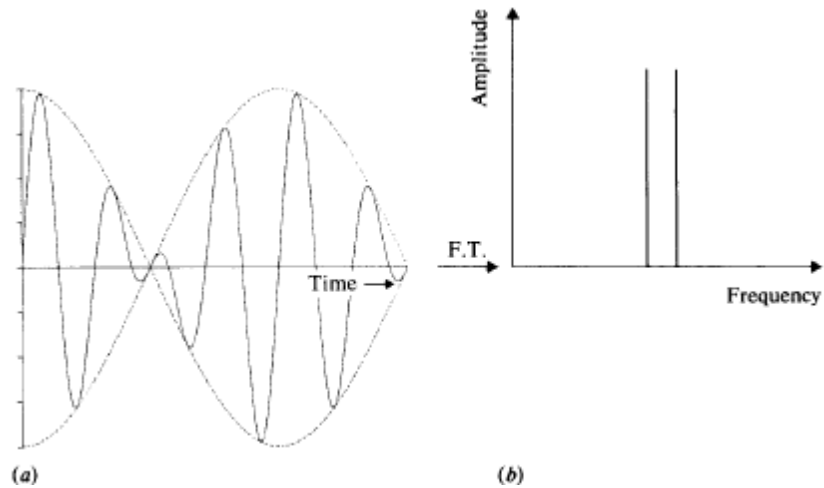


Fig. 54. Ús de la transformada de Fourier (FT) per a convertir la suma d'ones sinusoidals (a) en el seu espectre de freqüències (b).

Mesurant l'interferograma.

Per establir l'escala de longituds d'ona de l'espectròmetre, l'interferograma s'ha de mesurar a intervals coneguts. Açò s'aconsegueix amb una senyal de referència proporcionada per un làser, que passa per l'interferòmetre fins a un detector separat. El temps que li costa a un interferòmetre escanejar des de zero fins a la diferència de pas màxima sol ser de l'ordre d'1 segon.

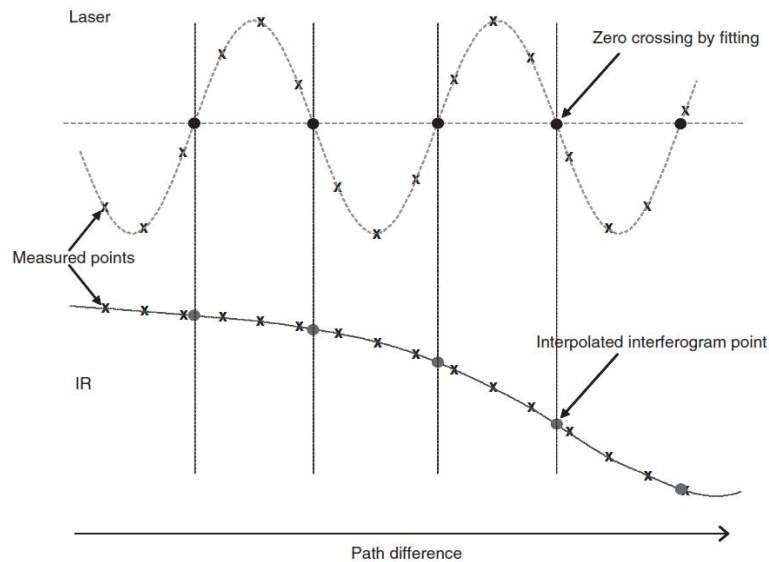


Fig. 55. Esquema de la mesura de l'interferograma i l'ús del làser com a referència [264].

En resum, l'interferòmetre converteix la presència d'un número d'ona particular en la senyal en variació de la intensitat de radiació que arriba al detector. Sense aprofundir matemàticament, la intensitat que arriba al detector és $I(p)$, que és la suma de les contribucions de tots els números d'ona presents en la senyal:

$$I(p) = \int_0^{\infty} I(p, \tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \int_0^{\infty} I(\nu) (1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}p)) d\tilde{\nu}$$

$I(\nu)$ és la variació de la intensitat amb el numero d'ona, que és l'espectre final que es vol aconseguir. Per a calcular $I(\nu)$ s'usa la transformada de Fourier, que és:

$$I(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} \left(I(p) - \frac{1}{2} I(0) \right) \cos(2\pi\tilde{\nu}p) dp$$

Aquest càlcul el sol fer un ordinador que va acoblat a l'espectròmetre, i el resultat, $I(\tilde{\nu})$ és l'espectre d'absorció de la mostra.

Preparació de la mostra:

En condicions normals els intermediaris del fotocicle de la bR tenen una vida mitjana massa curta com per a ser vistos per FTIR. Però treballant en unes condicions concretes de pH i temperatura es poden atrapar diferents intermediaris del fotocicle, com per exemple treballant a pH 7 i pH 10 es poden atrapar els intermediaris M i N [266].

Depenent de si volem treballar a pH 7 o pH 10 afegim tampó 150 mM KCl, 3 mM fosfat/bifosfat o carbonat/bicarbonat respectivament. Resuspenem 0,4 mg de MP en 1 ml de tampó i centrifuguem 20 minuts, 19.000 rpm (16.000 g) i 4 °C amb la microultracentrífuga. Descartem el sobrenedant i resuspenem el precipitat en 100 µl del tampó adequat. A continuació agafem 50 µl amb una pipeta i els posem sobre una finestra de CaF₂ estenent la proteïna formant un cercle al mig de la finestra. La gota s'ha d'assecar amb aire sec o depositant la finestra en una campana de buit. Per a obtenir films humits utilitzem sals de CuSO₄ que mantenen el film amb la humitat adient dins de la campana de buit. Els films també es poden hidratar *a posteriori* afegint petites gotes de tampó i controlant el nivell d'humitat amb els espectres d'absorció de FTIR. La mostra s'asseca perquè l'aigua absorbeix molt en la regió de l'infraroig solapant-se amb l'espectre de la proteïna.

Quan s'ha assecat i s'ha format el film, muntem el portamostres. Al portamostres posem, en aquest ordre, un anell de cautxú, la finestra amb la mostra, l'espaiador, la segona finestra, un altre anell de cautxú, una anella metàl·lica i, finalment, la rosca que tanca el portamostres ajustant els diferents components, permetent un tancament hermètic per mantenir constant la humitat de la mostra.

Adquisició dels espectres:

A l'espectròmetre d'infraroig sempre hi ha corrent d'aire sec per a fer funcionar l'espill de l'interferòmetre, eliminar el vapor d'aigua i que no interfereixi amb les mesures. La temperatura es controla amb un bany Julabo FP 50 amb etanol al 96%. La mostra ha d'estar com a mínim 30 minuts per a que s'estabilitzi la temperatura i la

Materials i Mètodes

humitat ambiental (el vapor d'aigua). Una vegada estabilitzat ja es poden adquirir els espectres.

Obtenim espectres de diferència restant els espectres adquirits a la foscor als espectres adquirits il·luminant amb llum groga. Així obtenim un espectre que mostra les variacions en l'intermediari atrapat respecte a la bR en estat basal. Per a cada mostra es fan 4 tandes de 250 escombratges a una resolució de 2 cm^{-1} i es fa la mitjana. La il·luminació es fa amb el transil·luminador. L'espectròmetre utilitzat es el Varian 7000-e, el programari utilitzat per a adquirir els espectres és el Varian Resolutions Pro i per a processar les dades s'ha utilitzat el GRAMS Suite 9 i OriginPro 8.

d. Caracterització d'intermediaris del fotocicle mitjançant espectroscòpia de UV-Vis.

Mitjançant la espectroscòpia de UV-Vis es sol estudiar l'estat basal de la bR, ja que és la forma estable. La bR podria estar duent a terme el fotocicle durant la mesura amb l'espectrofotòmetre i sols veuríem l'estat basal. En alguns casos, com per exemple en alguns mutants, podrien haver intermediaris que tinguessin una vida mitjana molt més llarga, suficient per a ser mesurada per UV-Vis.

En aquest treball estudiarem mutants en els que treballant a pH 10 i amb films secs s'atrapa un intermediari visible a simple vista que no és l'estat basal. Açò ens permet estudiar-lo per espectroscòpia de UV-Vis, però com cal treballar amb films secs no es pot fer en dissolució i amb cubetes. El problema es soluciona amb un muntatge casolà que subjecta el portamostres en la trajectòria del feix de llum de l'espectrofotòmetre. Per a col·locar el muntatge s'ha de llevar el portamostres incorporat a l'espectrofotòmetre.

Resultats i discussió Part 1:
Restricció del moviment de
les hèlixs pel costat
citoplasmàtic

La primera part de la tesi consisteix en restringir el moviment dels extrems d'hèlix pel costat citoplasmàtic i estudiar els seus efectes. Per fer-ho s'han buscat residus que estiguin pròxims entre ells i que puguin formar ponts disulfur que dificultin o impedeixin el moviment de les hèlixs connectades. Basant-se en estructures cristal·logràfiques i en la bibliografia publicada, s'han elegit tres dobles mutants on no s'han descrit implicacions importants dels mutants simples en la funció de la bR. Així, s'espera que el doble mutant reduït, amb les hèlixs amb moviment lliure, es comporti com *wild type* (WT) i observar en l'oxidat l'efecte (si hi ha) de la restricció del moviment de les hèlixs.

Els dobles mutants construïts són el V101C/M163C, el T157C/K172C i l'A160C/A168C.

Mutant	Hèlixs connectades	Distància (Å)
V101C/M163C	hèlix C-bucle EF	4,89
T157C/K172C	hèlix E- hèlix F	5,50
A160C/A168C	hèlix E- hèlix F	4,19

Taula 4. A la taula s'indiquen les hèlixs connectades pels mutants i la seva separació, segons l'estructura 1BRR del PDB.

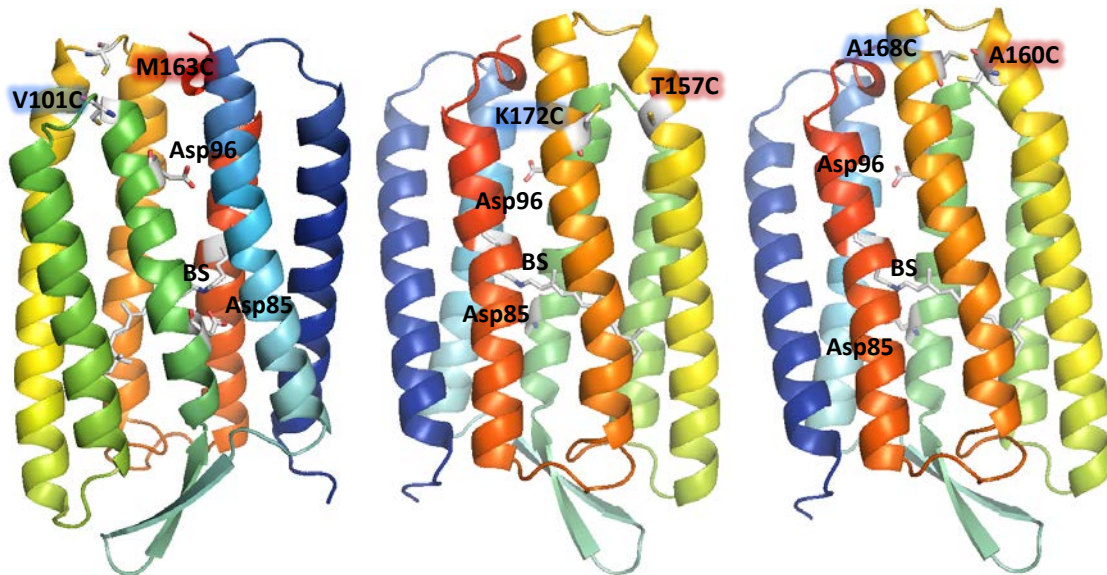


Fig. 56. A l'esquerra es representen les mutacions del doble mutant V101C/M163C, al mig el T157C/K172C i a la dreta l'A160C/A168C. Les hèlixs estan acolorides per ordre cromàtic de la A a la G (A, B, C, D, E, F i G). La part superior de la figura correspon a la part citoplasmàtica i l'inferior correspon a l'extracel·lular.

Per a confirmar que les mostres tinguin les cisteïnes reduïdes, lliures o oxidades formant un pont disulfur, es feien estudis de fluorescència, el procediment dels quals

Resultats i Discussió: Part 1

està explicat a l'apartat 3.e. de Materials i Mètodes. Restem l'emissió del Mians a l'inici de la seva reacció amb la mostra a l'espectre d'emissió de quan la reacció ja ha acabat. El resultat és un espectre de diferència que ens mostrarà quant de Mians ha reaccionat amb grups tiol i així comparar les mostres reduïdes amb les oxidades i amb WT. Un espectre típic és el següent:

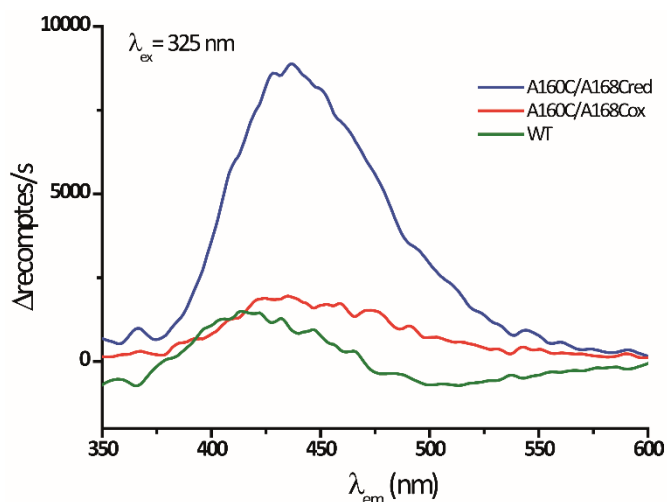


Fig. 57. Espectre d'emissió del Mians reaccionant amb els mutants A160C/A168Cred, A160C/A168Cox i WT. La mostra s'excita a 325 nm i s'adquireix l'espectre d'emissió des de 350 nm fins a 600 nm.

Amb aquestes gràfiques podem calcular la proporció de molècules reduïdes presents en les mostres oxidades. Es calcula considerant que la mostra reduïda ha reaccionat al 100%. Els resultats es resumeixen a la següent taula:

Mostra	% de cisteïnes reduïdes
V101C/M163Cox	21,1%
T157C/K172Cox	11,6%
A160C/A168Cox	22,6%
K129C/F71Cox	15,2%
L13C/L61Cox	19,4%

Taula 5. Percentatge de les cisteïnes que es troben en la forma reduïda als mutants tractats amb GSSG per a formar els ponts disulfur. Aproximadament el 80% de les cisteïnes de les mostres es troben oxidades formant ponts disulfur. Es mostren els resultats tant dels mutants citoplasmàtics com els dels extracel·lulars que s'estudiaran a la Part 2.

En les mostres oxidades la gran majoria de les cisteïnes es troben formant ponts disulfur. Sols una petita part de les cisteïnes es troben reduïdes, pel que el seu efecte serà menor.

1. Estudi estructural dels dobles mutants citoplasmàtics.

Gràcies a que el retinal absorbeix en el visible i a que la seva absorció és sensible a l'entorn, es poden utilitzar tècniques fisico-químiques i seguir els canvis mitjançant espectroscòpia de UV-Visible.

Mostra / Propietat	WT	V101C/ M163C red	V101C/ M163C ox	T157C/ K172C red	T157C/ K172C ox	A160C/ A168C red	A160C/ A168C ox
$\lambda_{\text{màx}}DA[LA]$ (nm)	558 [568]	564 [567]	563 [566]	561 [568]	562 [568]	563 [569]	560 [568]
$\Delta\lambda_{\text{màx}}$ (nm)	10	3	3	7	6	6	8
$\Delta\epsilon$ (LA-DA)	+10%	+6,7%	+8,1%	+6,3%	+8,3%	+7,3%	+9,3%
$t_{1/2}$ (min)	70,2± 6,5	37,4± 8,9	35,1± 10,9	40,9± 12,4	42,5± 7,2	69,3± 3,2	59,4± 7,4
T_m (°C)	87,6± 0,8	81,5± 5,1	84,8± 3,0	85,7± 4,2	88,8± 0,8	89,3 ± 9,8	81,8± 1,3
pK_a (KCl 150 mM)	2,54± 0,06	2,4± 0,6	2,2± 0,08	2,8± 0,6	2,4± 0,07	2,6± 0,13	2,77± 0,24

Taula 5. Resum dels resultats de la caracterització estructural dels mutants en comparació amb WT.

a. Adaptació llum-fosc.

En la bR adaptada a la fosc (DA) trobem el retinal en dues conformacions, *13-cis*, *15-syn* i *tot-trans* en una proporció molar de 2:1 [86]. Quan s'il·lumina i aquesta s'adapta a la llum (LA) el retinal s'isomeritza i es troba tot en la conformació *tot-trans* (veure Materials i Mètodes). Ja que el màxim d'absorció del retinal està influenciat per l'entorn de la butxaca d'unió del retinal (RBP), l'estudi del procés d'adaptació a la llum ens pot dir si aquest entorn està afectat per les mutacions o pel pont disulfur.

Tots els mutants citoplasmàtics presenten adaptació llum-fosc, amb la forma adaptada a la llum desplaçada lleugerament cap al vermell, un major coeficient d'absorció molar (ϵ) i bandes β en l'espectre de diferència, degudes a la isomerització del retinal durant el procés d'adaptació a la llum [260], tal i com ocorre a WT.

Resultats i Discussió: Part 1

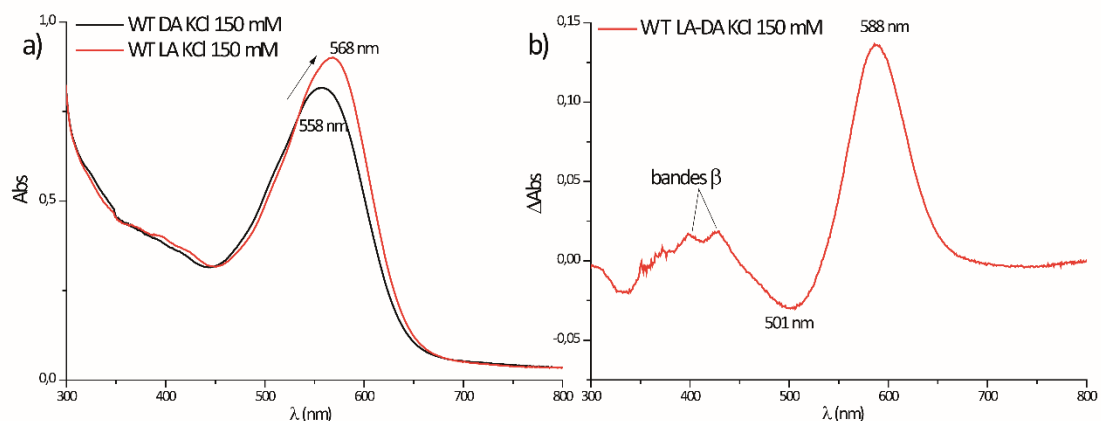


Fig. 58. a) Espectres d'absorció de la bR WT adaptada a la foscor (DA) i adaptada a la llum (LA) a una concentració de KCl de 150 mM. **b)** Espectre de diferència resultat de restar l'espectre DA al LA. Així es veuen més clars els canvis que es produeixen, apareixent com a pics positius les longituds d'ona a la que absorbeixen les noves espècies i com a pics negatius on desapareixen.

A pesar de que hi ha adaptació llum-foscor en tots els mutants, aquesta es troba lleugerament alterada. El màxim d'absorció de les formes adaptades està en tots els casos entre 566 i 569 nm, sent molt semblant a la WT (568 nm). Però el màxim d'absorció de la forma DA canvia més, estant entre 560 i 564 nm front a 558 nm en WT. Així, en els mutants V101C/M163Cred i V101C/M163Cox sols hi ha una variació de 3 nm en el màxim d'absorció (10 nm en WT), de 7 i 6 nm en T157C/K172Cred i T157C/K172Cox i de 6 i 8 nm en A160C/A168Cred i A160C/A168Cox respectivament (veure Taula 5). En quant a les diferències entre reduïts i oxidats la restricció de les hèlixs en T157C/K172C provoca una petita disminució d'1 nm en el màxim d'absorció i en A160C/A168C és 2 nm major. Sembla que en V101C/M163C són les mutacions en si mateixes les que provoquen el canvi més gran, ja que $\Delta\lambda_{\text{màx}}$ és tan sols de 3 nm i $\lambda_{\text{màx}}$ en V101C/M163Cred està desplaçat cap al vermell respecte a WT.

En WT, el coeficient d'absorció molar de la forma LA és un 10% major que la de la forma DA. L'augment en els mutants oxidats és semblant a aquest, però, en canvi, en els mutants en estat reduït l'augment és d'aproximadament el 7%. En general, les mutacions i la restricció del moviment de les hèlixs sembla que sols causen petites perturbacions, sense afectar al procés general de l'adaptació a la llum.

b. Mesura del pK_a del Asp85.

El Asp85 és el contrari de la Base de Schiff i afecta fortament a l'espectre d'absorció del retinal. Per exemple en l'estat basal, quan el Asp85 està desprotonat, el retinal unit a la bR té el màxim d'absorció a 558 nm (DA). Si el Asp85 es protona, apareix la forma blava de la bR, que absorbeix cap a 600 nm. La protonació i desprotonació del Asp85 també té importància funcional durant el fotocicle, així que el pK_a d'aquest residu és molt important. El pK_a és el logaritme negatiu de la constant de dissociació d'un àcid, o

sigui, $pK_a = -\log K_a$, el que simplificant es podria explicar dient que és el pH al qual estan protonats el 50% dels Asp85.

Hi ha dues formes per a determinar el pK_a del Asp85, mitjançant la cinètica d'adaptació a la foscor i per titració àcida.

Càlcul del pK_a Asp85 mitjançant la cinètica d'adaptació a la foscor.

L'observació de que la velocitat d'adaptació de la bR a la foscor era pH-dependent [103, 267] i que la disminució d'aquesta estava correlacionada amb el pK_a de la transició de la forma púrpura a la blava de la bR, va fer que es proposés que el mateix residu que controlava la transició, el Asp85, seria el que catalitzaria l'adaptació a la foscor [173]. Per a l'adaptació a la foscor caldria que el Asp85 estigués transitòriament protonat.

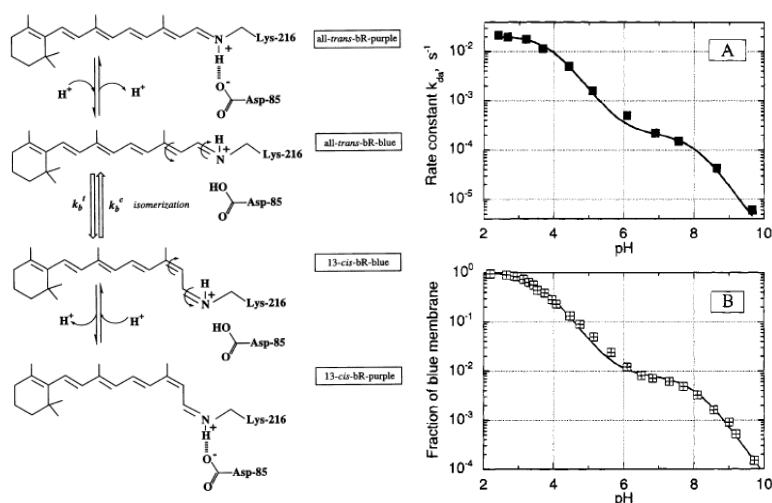


Fig. 59. Esquema del paper que es va proposar per al Asp85 durant la relaxació tèrmica del retinal de la conformació *tot-trans* a la *13-cis* (esquerra) i gràfiques de la constant d'adaptació a la foscor i fracció de membrana blava respecte al pH (dreta). Adaptat de [106, 165]

En estudis posteriors es va concretar més el paper del Asp85. La protonació d'aquest residu reduiria la barrera energètica per a la reisomerització del retinal, degut a l'increment en la deslocalització dels seus electrons π i per la major mobilitat del retinal deguda a la reducció de l'atracció electrostàtica entre aquest i el Asp85, permetent la transició de retinal *tot-trans* a *13-cis*. Aleshores, la fracció d'Asp85 (o sigui, la fracció de membrana blava) seria proporcional a la constant de velocitat d'adaptació a la foscor [106].

Així, segons aquest mètode, el pK_a del Asp85 es calcula representant els punts de la constant d'adaptació a la foscor (k_{da}) respecte al pH i ajustant les dades a la fórmula $f_{DH}(pH) = \alpha / (\alpha + \beta \gamma)$, on $\alpha = 1 + 10^{(pH - pK_{a3})}$, $\beta = 1 + 10^{(pH - pK_{a2})}$, i $\gamma = 10^{(pH - pK_{a1})}$ [165].

Càlcul del pK_a del Asp85 per titració àcida de la bR.

Aquest mètode s'explica a l'apartat 5.b. dels Materials i Mètodes. La membrana púrpura (MP) en estat basal, sense il·luminar, és color púrpura, però si s'acidifica es forma la membrana blava, degut a que el Asp85 passa a estar protonat en l'estat basal. Així, s'agafen espectres d'absorció de la bR a pHs que van de pH 7 a pHs cada vegada més àcids i es representa la variació d'absorbància a 630 nm respecte al pH. L'ajust de les dades a una sigmoïdal dona el valor del pK_a [165, 173, 268]. En aquest treball s'ha calculat el pK_a seguint aquest mètode.

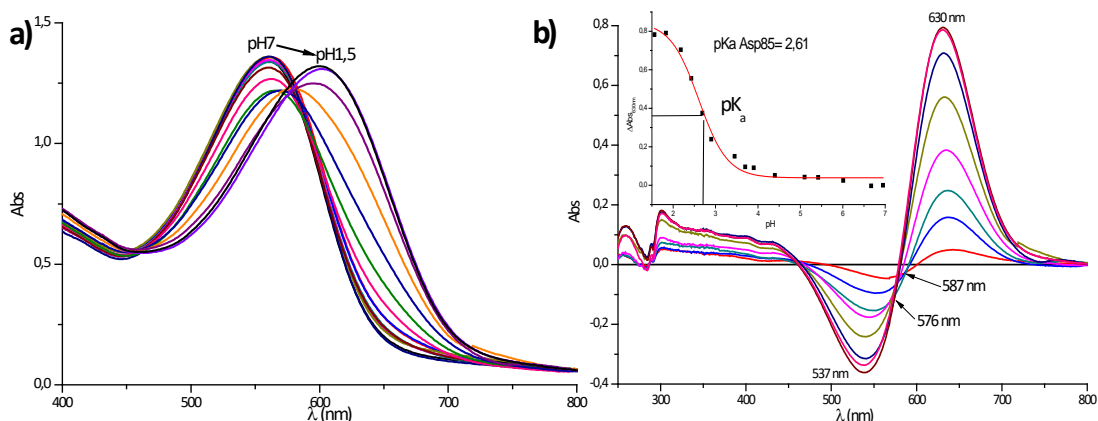


Fig. 60. a) Espectres d'absorbància de la bR de pH 7 a pHs àcids. Amb l'acidificació del medi el màxim d'absorció es va desplaçant cap al vermell passant de 558 nm a 600 nm, a la forma blava. **b)** Espectres de diferència obtinguts de restar a cada espectre l'espectre a pH 7. Aquest espectre mostra els canvis que es produeixen en l'absorció conforme es va acidificant el medi durant la conversió de membrana púrpura a blava. En WT es forma un pic negatiu en 540 nm degut a la desaparició del pic de 558 nm i es forma un a 632 nm, indicant la formació de l'espècie blava. En petit es mostra l'ajust a una sigmoïdal de la variació de l'absorbància a 632 nm respecte al pH. El punt d'inflexió de la corba indica el pH al que el 50% dels Asp85 estan protonats, o sigui, el pK_a del Asp85.

En els espectres de diferència, la presència d'un punt isobèstic o no entre el pic que desapareix i el nou que es forma dona informació sobre si la transició és entre dues o més espècies. Si un pic desapareix i es forma sols un nou amb un punt isobèstic, una espècie desapareix per a convertir-se en una altra. En altres casos podria veure's que mentre desapareix un pic es formen dos de nous amb els corresponents punts isobèstics, indicant que desapareix una espècie i es formen dues. En la proteïna WT i a una concentració de KCl de 150 mM, en l'espectre de diferència sembla que hi ha dos punts isobèstics molt pròxims, els dos entre el pic negatiu i el positiu. Açò es deu a que conforme va baixant el pH es va formant una espècie blava però després aquesta estarà encara més desplaçada cap al vermell.

El mutant V101C/M163Cred té un pK_a del Asp85 una mica més àcid que WT (2,4 el mutant i 2,6 WT) i sols s'observa un punt isobèstic. En canvi, en V101C/M163Cox Asp85 té un pK_a encara més àcid (2,2) i es veuen més clarament dos punts isobèstics com en

WT, mostrant que la transició a la primera forma blava i després a la segona estan més definides en el mutant quan el moviment de les hèlix està restringit. Podria significar que per a la transició de membrana púrpura a blava cal certa rigidesa de l'estat basal i la forma reduïda és menys compacta.

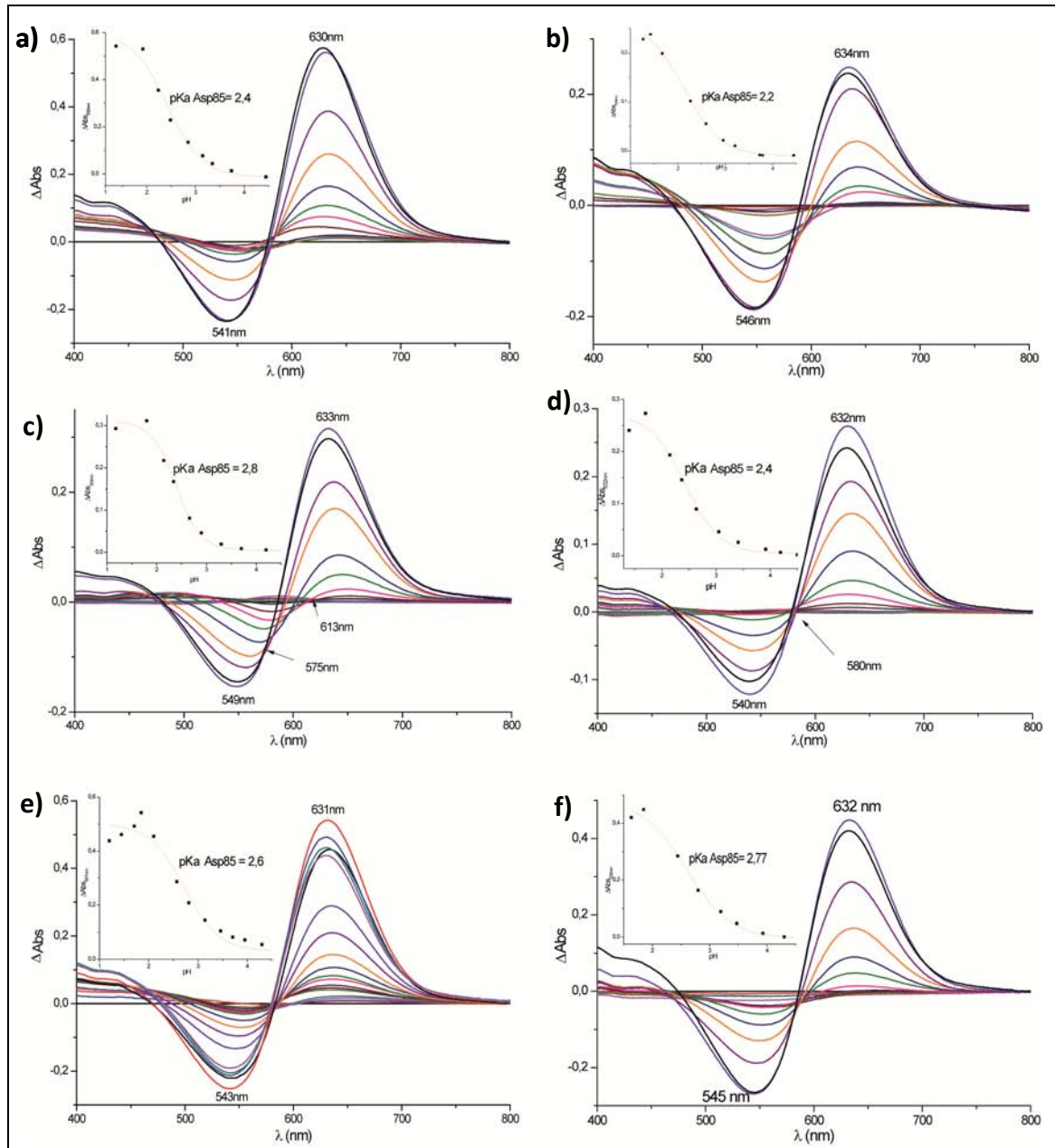


Fig. 61. Espectres de diferència i variació de l'absorbància a 630 nm respecte al temps dels mutants **a)** V101C/M163Cred, **b)** V101C/M163Cox, **c)** T157C/K172Cred, **d)** T157C/K172Cox, **e)** A160C/A168Cred i **f)** A160C/A168Cox.

Els mutants T157C/K172C tenen el pK_a similar a WT, el T157C/K172Cred una mica més bàsic (2,8) i T157C/K172Cox més àcid (2,4). La diferència de pK_a entre la forma oxidada i reduïda és la més gran de les que trobem en els dobles mutants citoplasmàtics d'aquest treball, ja que la diferència és de 0,4, front als 0,2 punts de V101C/M163C i els

Resultats i Discussió: Part 1

0,1 punts d'A160C/A168C. En el mutant T157C/K172C, al contrari que en V101C/M163C, és en la versió reduïda on es veuen clarament els dos punts isobèstics i en l'oxidada sols un.

Els mutants A160C/A168C, tant reduïts com oxidats, els resultat són molt similars entre ells i sembla haver un sol punt isobèstic. Les petites variacions observades en les mesures dels pK_a en els mutants ens indiquen que l'entorn del Asp85 és afectat per les mutacions però no li causen grans canvis.

c. Estabilitat tèrmica de la bR.

Un altre factor que afecta al lloc d'unió del retinal i al seu espectre d'absorció és la temperatura. A altes temperatures, les proteïnes es desnaturalitzen perdent la seva estructura terciària nativa. La bR, com és obvi, també es desnaturalitza. Però amb espectroscòpia de UV-Vis no és possible seguir la desnaturalització de la bR entesa com el trencament de l'estructura terciària. En canvi, el que sí es pot veure és com afecta la temperatura al RBP, ja que les perturbacions causades sobre aquest es reflectiran en canvis en l'absorbància del retinal. Tal com s'explica a l'apartat 5.c. de Materials i Mètodes, per a veure com afecta la temperatura al RBP s'escalfa la mostra progressivament i es van adquirint espectres d'absorció.

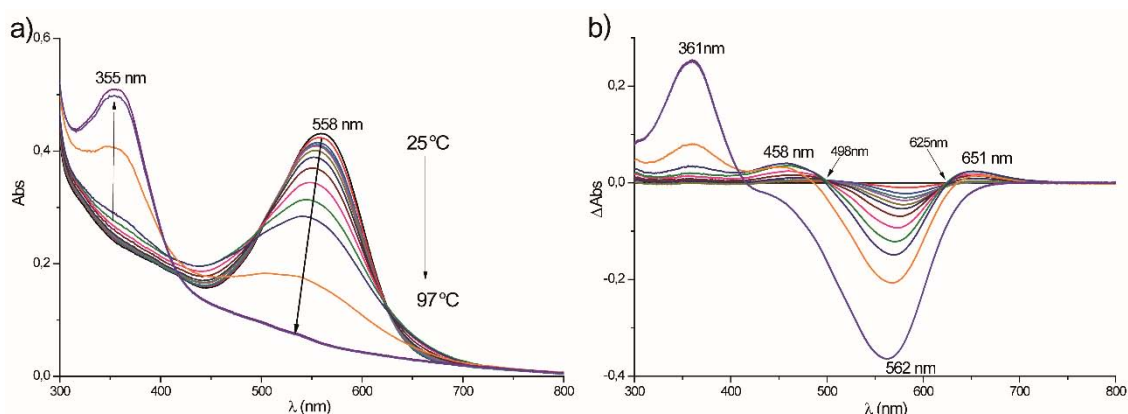


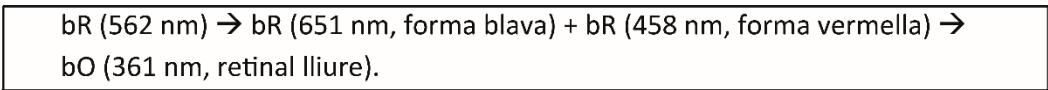
Fig. 62. a) Espectres d'absorció de la bR WT en KCl 150 mM a diferents temperatures entre 25 i 97 °C. b) Per veure millor els canvis que es produeixen, es resta a cada espectre l'espectre d'absorció a 25 °C, obtenint l'espectre de diferència tèrmic (TDS, *thermal difference spectra*).

Les longituds d'ona en les que es veuen els màxims d'absorbància depenen del mutant i del pH. En la bR WT amb l'augment de la temperatura es veu que el pic de 558 nm, que correspon a l'absorció del retinal unit a la Lys216 en la butxaca de la bR a temperatura ambient i adaptada a la foscor, va desplaçant-se cap al blau, cap a 540 nm, disminuint la intensitat de l'espectre d'absorció. A 60 °C ja es veu aquest desplaçament cap al blau i continua produint-se fins als 80 °C. A partir dels 85 °C es veu l'aparició molt clara d'un nou pic a 355 nm, que correspon a l'absorció del retinal lliure, ja que s'ha produït la hidròlisi de la base de Schiff i ha quedat exposat al dissolvent al situar-se a la

superfície de la bR interaccionant amb aminoàcids i lípids, raó per la qual pot donar màxims d'absorció lleugerament diferents. Aquests canvis ja són irreversibles.

A l'espectre de diferència (TDS) de WT (Fig. 5.b) es veu una única banda negativa amb un màxim que es va desplaçant de 580 nm fins a 562 nm i tres bandes positives a 361, 458 i 651 nm. Junts a la desaparició de la banda a 560 nm van apareixent les dos bandes positives a 458 i 651 nm fins que s'arriba als 85 °C on es veu el seu màxim d'intensitat i aleshores van desapareixent a la vegada que es forma el pic del retinal lliure en 361 nm. En la transició entre la banda de la bR en estat basal i les dues bandes que es formen hi ha dos punts isosbètics, un per a cada banda que es forma. Els punts isosbètics en 498 i 625 nm representen que hi ha una transició de la bR en estat basal a la forma vermella (banda a 458 nm) i forma blava (banda a 651 nm) respectivament. Posteriorment aquestes formes desapareixerien per a formar la banda del retinal lliure.

Les transicions entre les diferents formes degudes a l'augment de la temperatura quedarien així:



bO és bacterioopsina, la bacteriorodopsina sense retinal unit a la Lys216.

Independentment de si les transicions són reversibles o irreversibles, aquestes tenen forma de sigmoïdal [269]. Representant la variació de l'absorbància a cadascuna de les bandes respecte al temps, ajustem les dades a una sigmoïdal i es calcula la temperatura de desnaturalització o T_m (*melting temperature*) (veure l'apartat 4.c. de Materials i Mètodes).

Resultats i Discussió: Part 1

	T_m (°C) ^a 370 nm	T_m (°C) ^a 450 nm	T_m (°C) ^a 560 nm	T_m (°C) ^a 650 nm
WT	90,8±1,6	74,2±2,4	87,6±0,76	67,9±4,5
		91,5±0,6		90,0±0,5
V101C/M163Cred	83,3±5,3		80,5±3,4	67,9±7,3
				86,7±6,3
V101C/M163Cox	89,9±2,5	78,9±1,9	84,8±3,0	-
T157C/K172Cred	78,2±2,9	66,7±2,5	83,6±0,3	66,2±1,8 ^a
		89,2±1,1		87,5±1,1 ^a
T157C/K172Cox	84,3±2,1	68,6±1,6	88,0±0,8	-
		90,9±0,1		
A160C/A168Cred ^b	89,0±1,3	71,0±1,0	86,0±0,9	-
A160C/A168Cox ^b	85,5±0,2	73,4±0,8	81,8±1,3	-

Taula 6. Temperatures de desnaturalització tèrmica (T_m) de les diferents bandes que apareixen en la bR silvestre i en els mutants citoplasmàtics, tant oxidats com reduïts. ^a. La forma blava sols apareix en la meitat dels experiments. ^b. A 95 °C encara quedava bR sense desnaturalitzar.

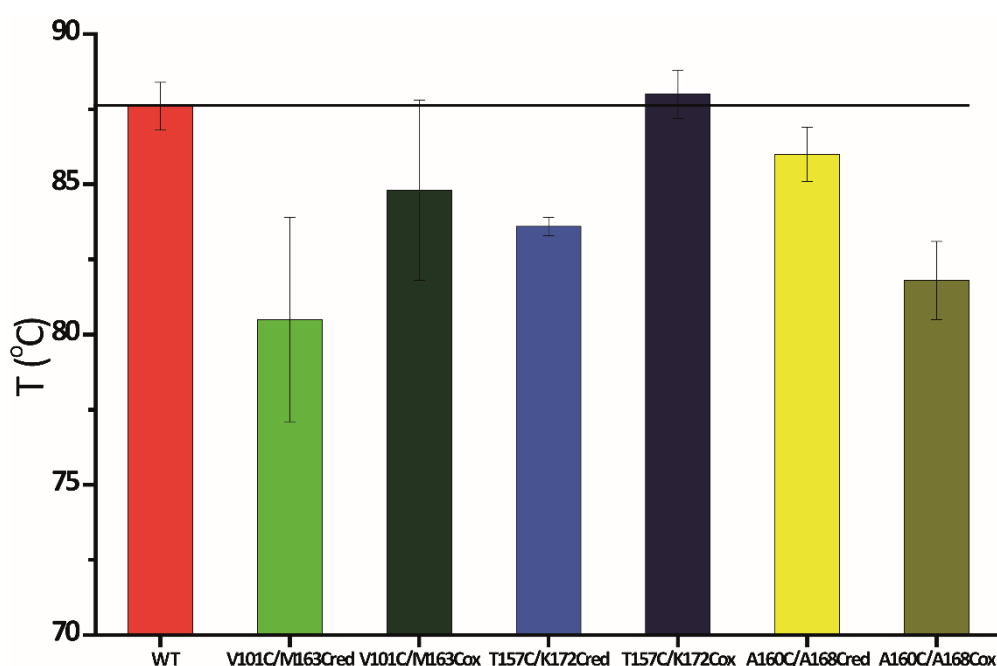


Fig. 63. Histograma de les temperatures de desnaturalització del RBP mesurat com la desaparició de la forma púrpura en WT i els diferents mutants.

La mitjana de la T_m varia entre els diferents mutants. Els mutants A160C/A168Cred i A160C/A168Cox tenen una T_m menor que WT i la fixació de les hèlix disminueix encara més l'estabilitat tèrmica del centre actiu. La introducció de les mutacions fa que la T_m

disminueixi lleugerament de 87,6 °C en WT a 86,0 °C i al constrènyer el moviment de les hèlix mitjançant els ponts disulfur aquesta T_m baixa encara més fins a 81,8 °C. En el cas dels dobles mutants T157C/K172C la formació dels ponts disulfur no afecta a l'estabilitat tèrmica del RBP, en canvi la introducció de les cisteïnes lliures disminueix la T_m fins als 83,6 °C. El mutant V101C/M163Cred és el que ha vist més reduïda la T_m del seu RBP, que és de 80,5 °C. El mutant V101C/M163Cox també té una T_m menor que WT però major que la forma reduïda (84,8 °C). En V101C/M163C i T157C/K172C la formació del pont disulfur compacta l'estructura recuperant estabilitat tèrmica.

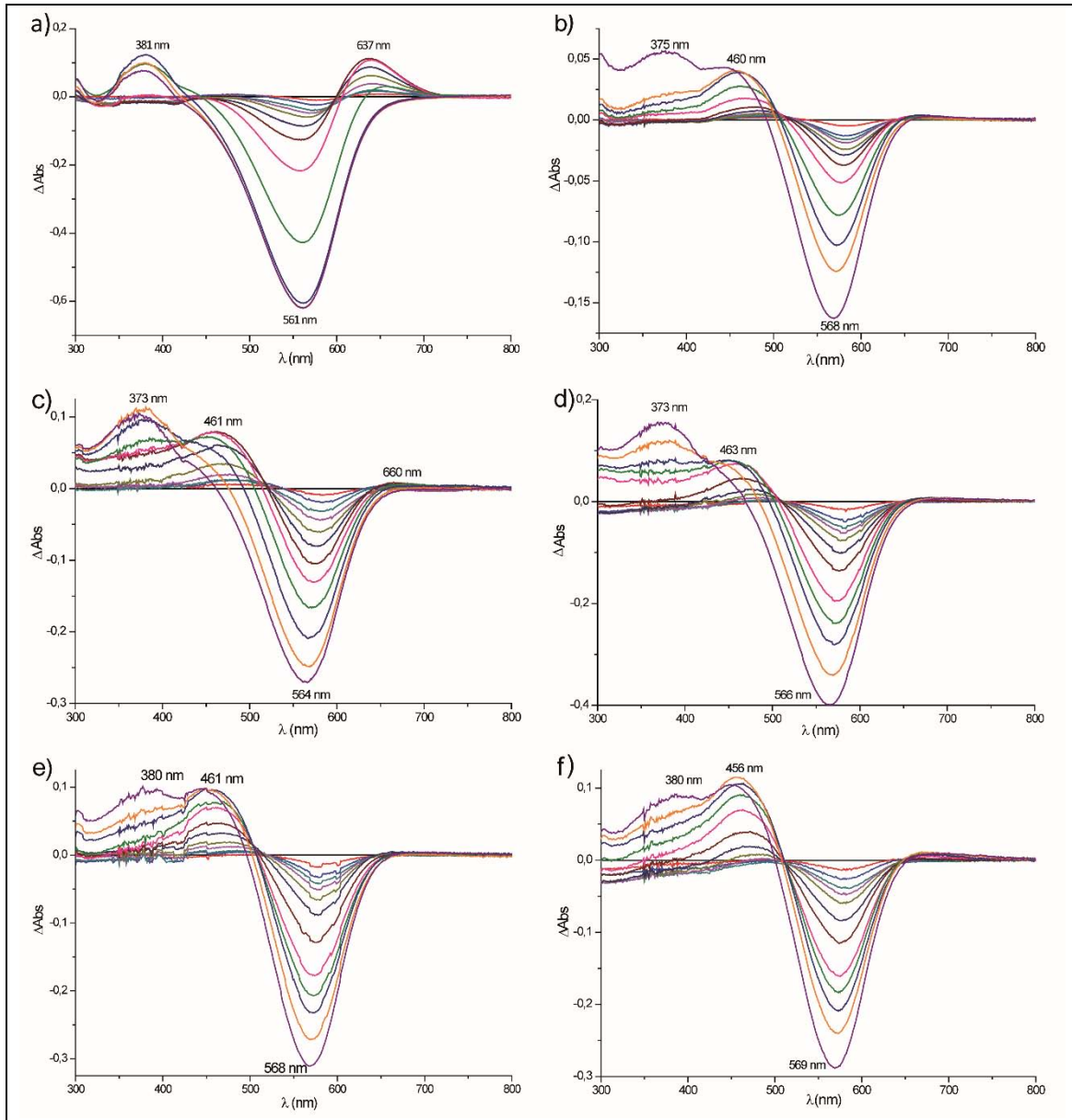


Fig. 64. Espectres TDS dels mutants V101C/M163Cred (a) V101C/M163Cox (b), T157C/K172Cred (c) T157C/K172Cox (d), A160C/A168Cred (e) i A160C/A168Cox (f). En tots es veu la banda negativa al voltant de 560 nm i la banda positiva en 370 nm. El pic de la forma blava sols està present en V101C/M163red (a) i justament aquest és l'únic al que li falta el pic en 450 nm.

Resultats i Discussió: Part 1

Fent ús de la Taula 6 i la Fig. 64 podem fer un esquema de les transicions que tenen lloc en els mutants i comparar-ho amb la proteïna silvestre.

bR (562 nm) → bR (458 nm, forma vermella) + bR (651 nm, forma blava) → bO (361 nm, retinal lliure).
bR _{V101C/M163red} (561 nm) → bR _{V101C/M163red} (637 nm, forma blava) → bO _{V101C/M163red} (381 nm, retinal lliure).
bR _{V101C/M163ox} (568 nm) → bR _{V101C/M163ox} (460 nm, forma vermella) → bO _{V101C/M163ox} (375 nm, retinal lliure).
bR _{T157C/K172Cred} (564 nm) → bR _{T157C/K172Cred} (461 nm, forma vermella) + bO _{T157C/K172Cred} (373 nm, retinal lliure) → bO _{T157C/K172Cred} (373 nm, retinal lliure).
bR _{T157C/K172Cox} (566 nm) → bR _{T157C/K172Cox} (463 nm, forma vermella) + bO _{T157C/K172Cox} (373 nm, retinal lliure) → bO _{T157C/K172Cox} (373 nm, retinal lliure).
bR _{A160C/A168Cred} (568 nm) → bR _{A160C/A168Cred} (461 nm, forma vermella) + bO _{A160C/A168Cred} (380 nm, retinal lliure) → bO _{A160C/A168Cred} (361 nm, retinal lliure).
bR _{A160C/A168Cox} (569 nm) → bR _{A160C/A168Cox} (456 nm, forma vermella) + bO _{A160C/A168Cox} (380 nm, retinal lliure) → bO _{A160C/A168Cox} (380 nm, retinal lliure).

Les diferents formes que apareixen durant la desnaturalització de la bR WT són primer la forma vermella i la blava que es formen a partir de la púrpura i aquestes dos després desapareixen per a formar la bO amb retinal lliure. Els mutants T157C/K172Cred, T157C/K172Cox A160C/A168Cred i A160C/A168Cox no segueixen el mateix camí que WT. En aquests la forma púrpura desapareix per a formar la forma vermella i després el retinal lliure, coexistent aquests dos. Finalment la forma vermella passa a bO i retinal lliure. V101C/M163Cred i V101C/M163Cox són com WT però els falta la forma vermella i la blava respectivament.

Les variacions en els valors dels màxims d'absorció es deuen a pertorbacions de l'entorn del retinal, però les variacions observades són petites, així que en general la pertorbació causada per les mutacions és petita.

La restricció del moviment relatiu de les hèlixs E i F (mutants T157C/K172C i A160C/A168C) provoca canvis contraris en l'estabilitat tèrmica del RBP però no en les transicions provocades per la temperatura. La mutació de V101 i M163 fa que no hi hagi forma vermella (veure Fig. 64.a) i la restricció del moviment relatiu de l'hèlix C i el bucle EF (V101C/M163Cox) recupera la forma vermella però perd la blava.

Aquests resultats indiquen que les modificacions en l'hèlix C i bucle EF tenen un efecte major sobre el RBP i sobre la depleció de ions que és la que causa la forma blava.

d. Estabilitat química de la bR.

El retinal està unit al grup amino ϵ de la Lys216 mitjançant una base de Schiff. Al contrari que en les rodopsines animals, l'enllaç C=N no és hidrolitzat per la llum durant el fotocicle, sols es trenca sota condicions desnaturalitzants. Algunes d'aquestes condicions desnaturalitzants són la presència de detergents, altes temperatures (com a l'apartat anterior) o agents químics que hidrolitzen de forma irreversible l'enllaç C=N. La hidroxilamina i el borohidrur de sodi són exemples de compostos químics que poden hidrolitzar la BS, sobretot sota il·luminació [102], encara que també en la foscor però molt més lentament [85]. Quan la hidroxilamina (HA) penetra dins la proteïna, reacciona amb la BS hidrolitzant-la i forma bacterioopsina per una banda i retinal-oxima, retinal unit covalentment amb HA, per una altra.

La reacció de la HA amb la BS en la foscor i l'augment de la velocitat de reacció sota il·luminació és important perquè dona informació de l'estructura del retinal, el RBP i sobre els canvis conformacionals que tenen lloc durant el fotocicle. Els primers treballs sobre la hidròlisi amb hidroxilamina proposaven que la reacció ocorria durant l'intermediari M [25]. Posteriors treballs amb mutants [85] i amb anàlegs del retinal [270] proposaven que la reacció tenia lloc durant l'intermediari L. A més, es proposava que la hidroxilamina reaccionava en la foscor amb el retinal *13-cis* [270]. Aleshores, quan la bR està adaptada a la foscor, la HA reacciona molt lentament i amb l'adaptació a la llum s'inicia el fotocicle que produirà una sèrie de canvis conformacionals que obrirà l'entrada a la HA accelerant la reacció.

Un altre tema és per on entra la HA a l'interior de la proteïna. Pensant que la part extracel·lular era més hidrofílica i menys compacta que la citoplasmàtica es va proposar que la hidroxilamina entraria per aquí [85]. Però estudis amb AFM van mostrar que la HA podia entrar per ambdós costats de la membrana [271] i que la hidròlisi de la BS trencava l'ordenament de la MP, atribuint importància al retinal en la compactació de les hèlixs i en l'ordenament de la MP.

Tractant la bR amb HA es pot obtenir informació sobre l'accessibilitat del RBP al dissolvent, i per tant a la HA, estudiant el canvis en l'absorció causats per la hidròlisi del retinal, que es desplaça dels 560 nm quan està unit a la bR a 380 nm quan és lliure al dissolvent formant retinal oxima. A l'apartat 5.d. de Materials i Mètodes s'explica com es calcula el temps mitjà de reacció.

Resultats i Discussió: Part 1

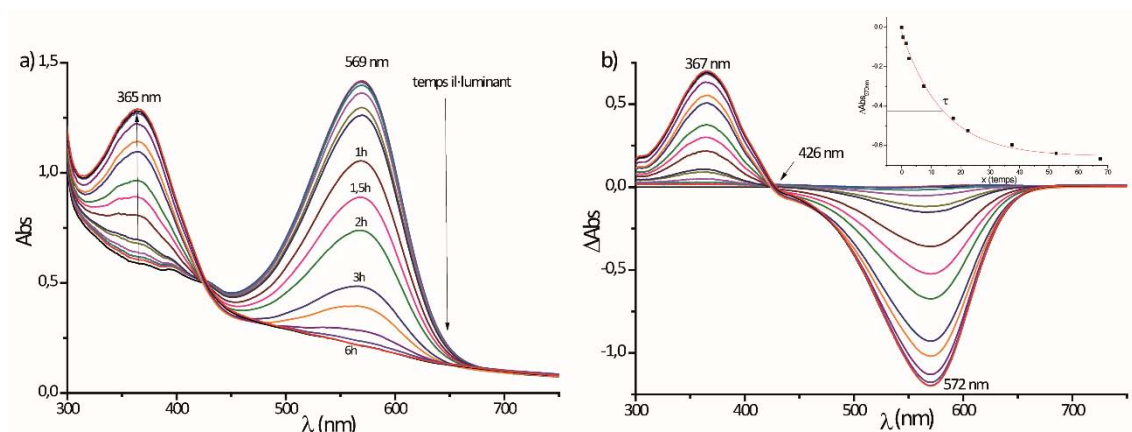


Fig. 65. a) Espectres d'absorbància de la proteïna WT en tampó fosfat pH 7, KCl 150 mM, hidroxilamina 1 M a temps intermitents d'il·luminació contínua amb llum blanca a 90000 lux. El pic a 569 nm desapareix i es forma un a 365 nm. **b)** Espectres de diferència de la reacció amb HA. S'obtenen restant a cada espectre l'espectre inicial sense il·luminar. Dalt en petit, representació de la variació d'absorbància a 570 nm amb el temps per a calcular la velocitat de reacció ($t_{1/2}$). La hidròlisi segueix una cinètica exponencial i l'ajust de les dades permet calcular τ , i $t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2$.

Mostra	$t_{1/2}$ (min)
WT	71,1±7,1
V101C/M163Cred	34,2±5,3
V101C/M163Cox	39,7±5,7
T157C/K172Cred	33,9±2,2
T157C/K172Cox	42,5±5,4
A160C/A168Cred	69,9±0,4
A160C/A168Cox	59,4±6,0

Taula 7. Valors de la velocitat de reacció ($t_{1/2}$) de la HA per a WT i els mutants. Mesures indicades en minuts.

Tal com es veu a la Fig. 65.a quant més temps s'il·lumina la proteïna amb HA, el pic del retinal unit a la bR va disminuint i apareix el del retinal oxima (365 nm). A l'espectre de diferència hi ha un sol pic positiu i un negatiu i un punt isobèstic molt clar entre ambdós indicant que hi ha una transició entre dos estats, que el retinal unit s'hidrolitza per a formar retinal oxima.

Tots els mutants citoplasmàtics, tant oxidats com reduïts segueixen el mateix model, hidròlisi de la BS per a formar retinal oxima seguint una cinètica exponencial, pel que es pot dir que el mecanisme general d'hidròlisi no es veu afectat per les mutacions ni per la restricció del moviment de les hèlixs. El que sí que canvia és la velocitat de reacció. Tant en V101C/M163C com T157C/K172C la reacció és més ràpida que en WT i a més la reacció és més ràpida en les mostres reduïdes, fet que suggereix que la restricció del

moviment de les hèlixs contraresta parcialment l'augment d'accessibilitat del RBP introduïda per les mutacions. El mutant A160C/A168C en canvi, presenta una velocitat de reacció més lenta que els altres mutants però mentre en la proteïna reduïda el valor és similar a WT, l'oxidada és lleugerament més ràpida.

En el doble mutant V101C/M163C es substitueixen dos residus hidrofòbics (Val i Met) per dos cisteïnes i en el mutant T157C/K172C un residu polar no carregat (Thr) i un hidrofílic (Lys) per altres dos cisteïnes. En ambdós dobles mutants la velocitat de reacció és més ràpida que en WT pel que l'augment en la velocitat no es deuria a la restricció o no del moviment relatiu de les hèlixs. Els nous residus tenen una cadena lateral amb certa capacitat d'interacció polar. En V101C/M163C la variació en l'accessibilitat pot ser deguda a canvis de tipus estèric, ja que tant la valina com la metionina són residus més voluminosos que la cisteïna i per tant podrien dificultar parcialment l'entrada de HA a l'interior. En T157C/K172C s'ha substituït un residu polar i un altra carregat positivament. Teòricament, la Thr al ser polar podria inclús facilitar l'entrada de la HA perquè també és polar, però al veure que la seva substitució per uns residus que també poden interaccionar mitjançant ponts d'hidrogen amb la HA ha causat un increment en l'accessibilitat, és més possible que passi com en V101C/M163C i el component estèric sigui més important. Encara que l'efecte més gran sigui causat per les mutacions, es veu que la restricció del moviment relatiu de l'hèlix C respecte al bucle EF i de l'hèlix E respecte a l'hèlix F dificulta l'entrada de la HA al RBP, el que s'esperaria si l'obertura de les hèlixs facilités l'entrada de HA durant el fotocicle. Els moviments d'aquestes hèlixs s'han descrit a la segona meitat del fotocicle, pel que la HA no entraria sols durant l'intermediari L, tal com s'havia proposat, sinó també durant altres intermediaris posteriors.

En A160C/A168C es substitueixen dos residus hidrofòbics per altres dos hidrofòbics, però a diferència de amb els altres mutants, els nous residus són més voluminosos que els originals, la proteïna reduïda es comporta com la nativa i la restricció del moviment de les hèlixs si que afecta lleugerament. Al contrari del que es podria esperar vist el resultat en T157C/K172C, la restricció del moviment augmenta la velocitat de reacció, com si la seva fixació facilités l'accés de la HA a l'interior de la proteïna.

En resum, sembla que els impediments estèrics són més importants que la mobilitat de les hèlixs per a l'accés de la HA pel costat citoplasmàtic; que l'efecte de la fixació de les hèlixs, visible en A160C/A168C, quedaria emmascarat per l'efecte estèric en V101C/M163C i T157C/K172C.

2. Estudi funcional dels dobles mutants citoplasmàtics.

A més de les característiques estructurals de la bR es pot estudiar el seu funcionament, o sigui, el bombeig de protons i el fotocicle.

a. Fotòlisi de llampec.

Per a facilitar la comprensió de la tècnica i els resultats obtinguts, tornem a representar la figura 12 de la Introducció:

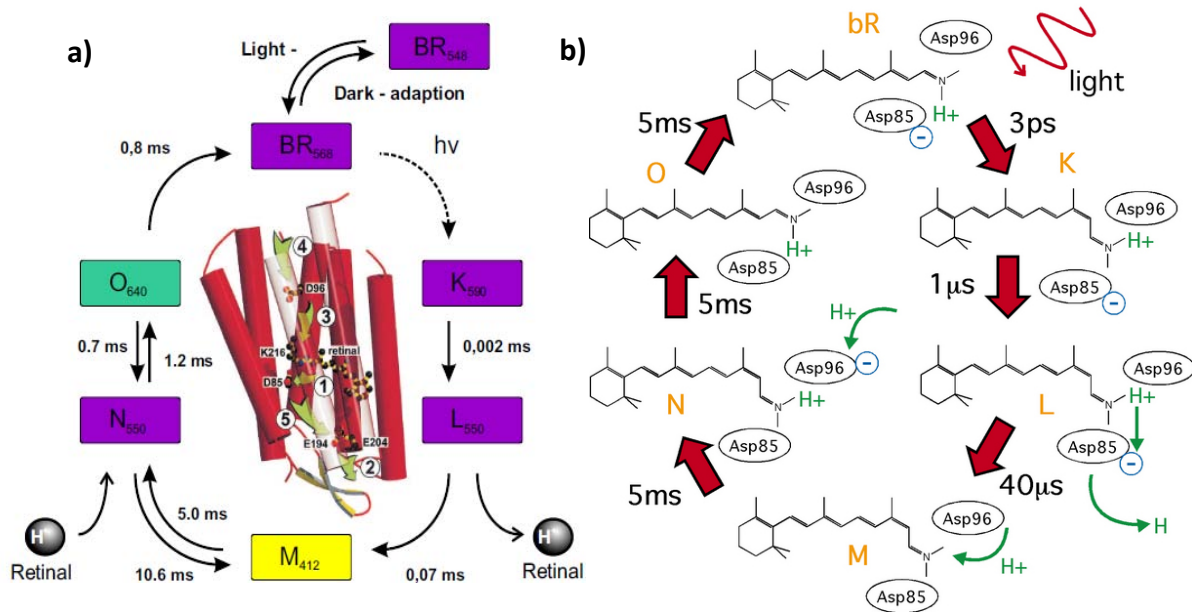


Fig. 66. Veure Fig. 12 de la Introducció.

Per a realitzar el transport de protons, el retinal unit covalentment a la Lys216 de l'hèlix G de la bR ha de captar un fotó. La captació del fotó aporta l'energia necessària per a que es produeixi la isomerització del retinal de conformació *tot-trans* a *13-cis, 15-anti* (diferent de la *13-cis, 15-syn* de la forma adaptada a la foscor). Aquesta absorció de fotó i isomerització del retinal inicia la sèrie de processos que acaba amb la reconstitució de la bR en estat basal i amb un transport net d'un protó contra gradient a l'exterior cel·lular. Els diferents intermediaris pels que passa la bR tenen uns màxims d'absorció característics que depenen de l'estructura del retinal i el seu ambient més pròxim.

La tècnica de fotòlisi de llampec utilitza un làser de 532 nm de longitud d'ona per a excitar la bR en estat basal (BR₅₆₈) i seguir l'absorbància a una longitud d'ona concreta en escales de temps molt curts, que poden anar des de nanosegons a mil·lisegons. A la figura 60.a estan indicats els màxims d'absorció de cada intermediari. Els intermediaris BR, K, L i N tenen màxims d'absorció molt semblants o iguals, mentre que el M està fortament desplaçat al blau (412 nm) i el O desplaçat cap al vermell (640 nm). Que l'intermediari M tingui un màxim tan diferenciat de la resta el fa un candidat idoni per a estudiar-lo sense interferències d'altres intermediaris. A més, és un intermediari important perquè la seva formació es deu a la desprotonació de la BS i protonació del Asp85 i és quan el grup alliberador del protó (PRG) allibera un protó al medi extern, i la desaparició de M es deu a la reprotonació de la BS per part del Asp96. Per últim, durant M ocorre el mecanisme de "switch", fa com d'interruptor canviant l'accessibilitat del RBP del costat extracel·lular al citoplasmàtic mitjançant canvis conformacionals.

D'aquesta manera, l'estudi de l'absorció a 410 nm ens mostrarà la formació i desaparició de l'intermediari M i podrem obtenir informació sobre els fets associats a aquests. La comparació dels resultats en mutants respecte a WT permetrà esbrinar si les mutacions i/o restricció de moviment de les hèlix afecta als processos relacionats amb l'intermediari M.

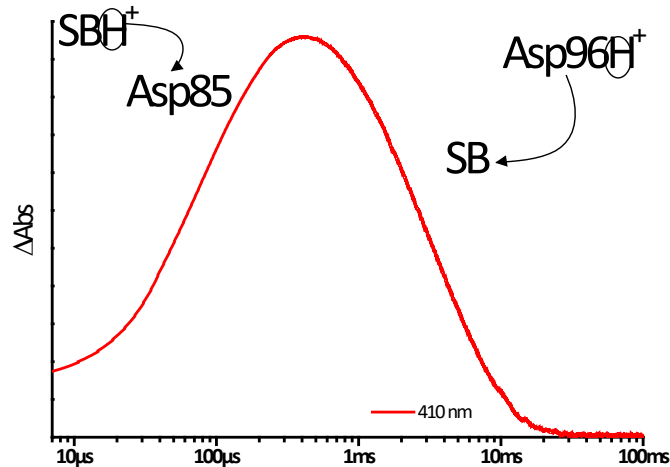


Fig. 67. Evolució temporal obtinguda per fotòlisi de llampec de l'absorbància a 410 nm corresponent a l'intermediari M, amb indicació dels esdeveniments moleculars que originen el canvi d'absorbància. Amb la formació de M seguim la protonació del Asp85 per part de la Base de Schiff i durant la desaparició de M es segueix la reprotonació de la SB per part del Asp96.

Seguint l'absorció a 660 nm permetrà estudiar l'intermediari O. El O té el màxim d'absorció en 640 nm però es mesura a 660 nm per que en aquesta longitud d'ona l'absorció està menys solapada amb la de l'intermediari K. A més, encara que l'absorció de K i O es solapen parcialment, temporalment la seva aparició és molt diferent, tant pel moment d'aparició com per la durada. L'absorció a 570 nm pot aportar informació sobre la desaparició de l'estat basal i també més cap al final sobre N, ja que a 570 nm l'absorció d'ambdós intermediaris es solapa.

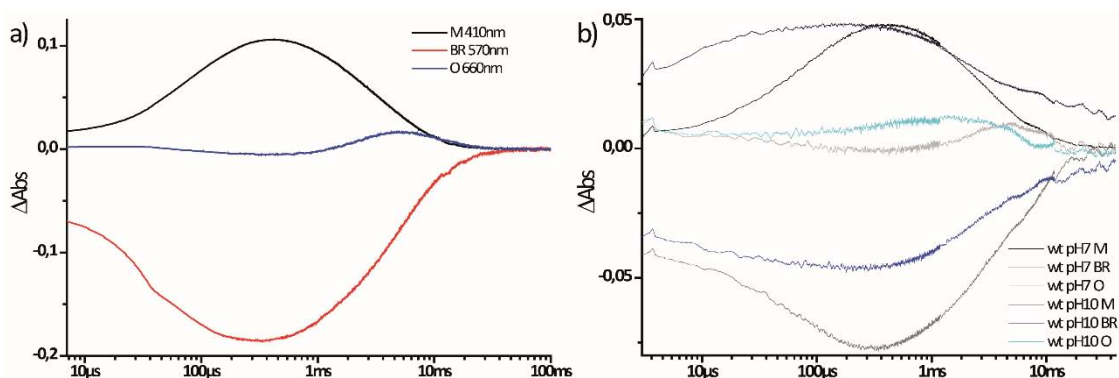


Fig. 68. a) Evolució temporal de l'absorbància obtinguda per fotòlisi de llampec de WT a pH 7 KCl 150 mM a 410 nm (en negre, correspon a l'intermediari M), a 570 nm (en vermell, correspon a la bR en estat basal i a l'intermediari N) i a 660 nm (en blau, correspon a l'intermediari O). L'absorbància s'obté restant l'absorció de la mostra sense excitar a la de la mostra excitada amb el làser. Ja que es treballa a diferents

Resultats i Discussió: Part 1

escales de temps, el temps es representa logarítmicament per poder seguir adequadament l'evolució de l'absorbància tant a μs com a ms . **b)** En negres i grisos està representada l'evolució temporal de l'absorbància en WT dels intermediaris M, BR i O a pH 7. Amb blaus estan representats els mateixos intermediaris però a pH 10. Com es pot veure, la cinètica dels intermediaris depèn del pH.

A la figura 62.b. es mostra l'evolució temporal de l'absorbància a pH 7 i a pH 10 en WT. L'efecte de l'augment del pH en WT és una acceleració en la desprotonació de la BS i una reprotonació que ajusta a una biexponencial en compte d'una monoexponencial. En l'estat basal el pK_a del Asp96, grup encarregat de reprotonar la BS, és d'11,0, mentre que el de la BS és 13. En el pas de M_1 a M_2 el pK_a de la BS disminuiria fins a 8,2 tornant favorable la cessió del protó del Asp96 a la BS. Quan es treballa a pH 10 s'afavoreix la desprotonació de la BS (formació de M) i es dificulta la seva reprotonació.

Per a l'estudi cinètic de l'intermediari M i per a poder calcular les velocitats de reacció fotoquímiques de formació i desaparició de l'intermediari M, s'ajusta la corba de formació i de desaparició de M a exponencials per a calcular la constant de formació i de caiguda (τ).

Mostra	Formació (μs)				Desaparició (ms)			
	pH 7		pH 10		pH 7		pH 10	
WT	6,2 (15%) 84,2 (85%)		2,2 (85%) 21,9 (15%)		3,2		2,7 (54%) 49,2 (46%)	
V101C/M163C red	36,5 (34%) 130,0 (66%)	x6 x1,5	4,7 (90%) 69,4 (10%)	x2 x3,1	3,5 (20%) 50,0 (80%)		3,0 (23%) 97,6 (77%)	x2
V101C/M163C ox	46,0 (38%) 124,0 (62%)	x7 x1,5	2,9 (87%) 66,2 (13%)	x1,3 x3	4,4 (23%) 50,6 (77%)		2,8 (20%) 100,0 (80%)	x2
T157C/K172C red	74,8 (64%) 270,8 (36%)	x12 x3,1	4,1 (81%) 67,6 (19%)	x1,9 x3	7,2 (49%) 48,8 (51%)	x2,2	4,5 (38%) 75,7 (62%)	x1,7 x1,5
T157C/K172C ox	47,6 (35%) 174,0 (65%)	x8 x2	2,7 (85%) 42,7 (15%)	x1,2 x1,9	7,6 (49%) 45,4 (51%)	x2,3	4,2 (41%) 72,3 (59%)	x1,6 x1,5
A160C/A168C red	49,5 (27%) 126,0 (73%)	x8 x1,5	3,9 (68%) 60,3 (32%)	x1,7 x2,7	5,0 (71%) 31,1 (29%)	x1,5	3,0 (51%) 70,6 (49%)	x1,4
A160C/A168C ox	50,9 (38%) 119,2 (62%)	x8 x1,4	1,8 (72%) 41,0 (28%)	x1,9	3,4 (75%) 19,5 (25%)		2,1 (56%) 69,7 (44%)	x1,4

Taula 8. Valors de τ de la cinètica d'aparició i desaparició de l'intermediari M en WT i els mutants citoplasmàtics a KCl 150 mM pH 7 i pH 10. Entre parèntesi es representen els percentatges que representen cada component respecte del total de la variació d'absorbància durant la formació i desaparició de M. A la columna de la dreta s'indica en quina proporció s'acceleren els esdeveniments respecte a WT.

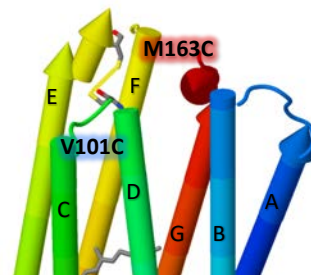
L'experiment s'ha fet a temperatura ambient, amb una concentració de proteïna de 15 μM KCl 150 mM, adaptada a la llum i a pH 7 i pH 10. A pH 7 en WT l'ajust de la formació de l'intermediari M és biexponencial, o sigui, que té dos components i per tant dos τ . Açò es deu a que en M es formen dos components, un primer ràpid que correspondria amb la formació de M_1 i un segon més lent que seria M_2 [39]. Amb l'ajusta a biexponencial també es pot calcular la proporció de cada component.

Tal com es veu a la Taula 8, en WT els components tenen diferent comportament depenent del pH. En el cas del component ràpid, el temps mitjà s'accelera una mica, passant de 6,2 a 2,2 μs i el component lent s'accelera més encara, de 84,2 μs a 21,9 μs . A més del temps mitjà les proporcions dels components també són dependents de pH, ja que mentre M_2 (component lent) és el majoritari a pH neutre amb un 85%, a pH 10 les proporcions s'inverteixen.

L'acceleració de la formació de M amb l'increment del pH podria ser degut a la protonació del PRG, ja que aquest en estat basal té un pK_a de 9,7 que el manté desprotonat a pH neutre però estaria parcialment protonat a pH 10. Que l'estat de protonació del PRG afecti al pK_a del Asp85 explicaria aquesta acceleració en la formació de M, marcada per la protonació d'Asp85 per part de la BS, que es desprotona. La proporció de cada component aporta informació sobre la seva acumulació, una major proporció indica que s'acumula més. L'acumulació ve determinada pel temps de vida mitja dels intermediaris directament anterior i posterior, el que en el cas de l'intermediari M_1 significa que la seva acumulació ve determinada per L i per M_2 , que l'augment de pH produiria un escurçament del temps de vida de L, una menor acumulació d'aquest i una acumulació major de M_1 [130].

En quant a la desaparició de M, el que es segueix es la desaparició de M_2 ja que M_1 desapareix per a formar M_2 , que té el mateix màxim d'absorció aproximadament, és un pas irreversible i formació i desaparició ocorren en una escala de temps molt diferent. Això implica que la desaparició de M_1 no comporta disminució en l'absorbància de M, ja que forma M_2 .

V101C/M163C.



Començarem la descripció dels resultats comparant les gràfiques de fotòlisi de llampec amb les vides mitjanes obtingudes per ajust a exponencials descrivint el doble mutant V101C/M163C.

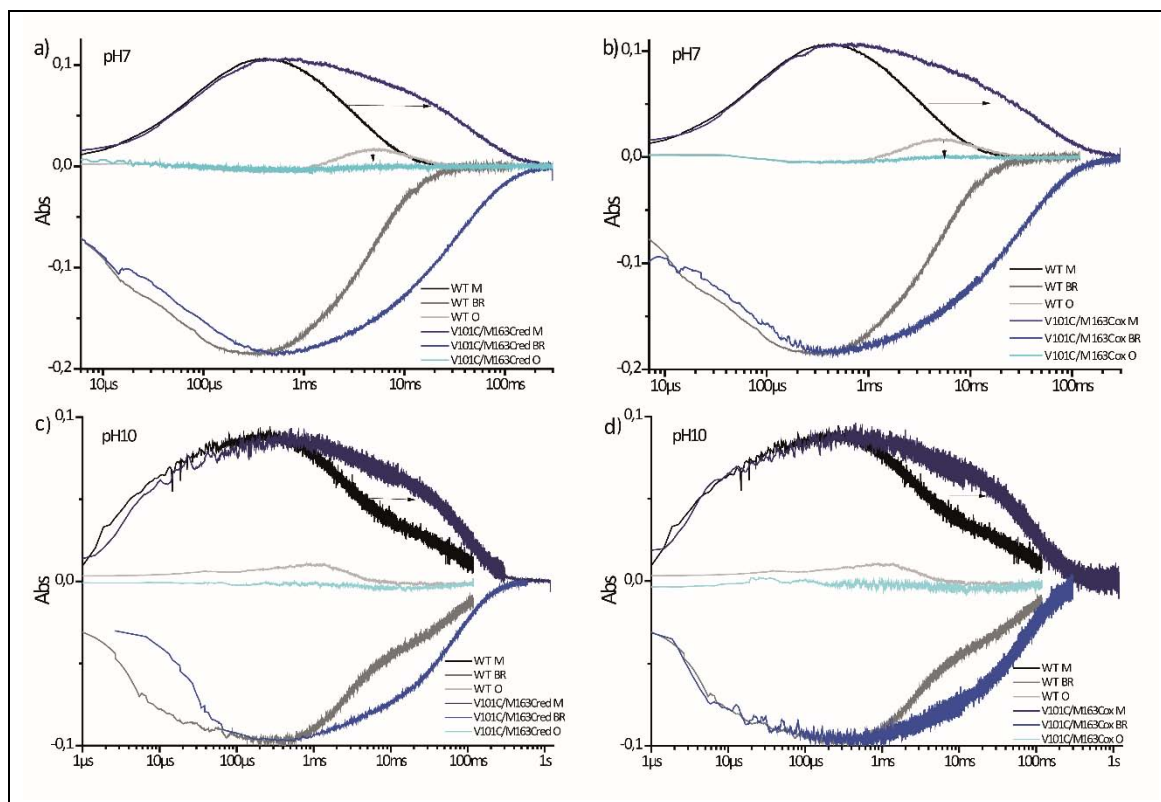


Fig. 69. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** V101C/M163Cred pH 7, **b)** V101C/M163Cox pH 7, **c)** V101C/M163Cred pH 10 i **d)** V101C/M163Cox pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa de mode logarímic.

La desaparició de M_2 és dependent de pH, ja que a pHs àcids i neutres ajusta a una exponencial i a pHs bàsics es torna biexponencial. Aquesta biexponencialitat té la seva explicació en la presència de dos components, un de ràpid (M^f) i un de lent (M^s), que comença detectar-se a partir de pH 8 [151] i es fa més lent conforme el pH del medi augmenta [272, 273]. L'origen del component lent és el retorn de N a M ja que a pHs bàsics la reacció de N a O està fortament dificultada (és més difícil reprotonar el Asp96 degut a la baixa concentració de protons al medi), N desapareix més lentament i s'acumula [274] i augmenta el retorn a M_2 . Aleshores tant el component ràpid com el lent són el mateix intermediari, però el primer prové de M_1 i el segon prové del retorn de N a M [275]. Mateix intermediari, diferent origen.

Amb la Fig. 69 podem comparar visualment la cinètica de l'intermediari M dels mutants respecte a WT i comparar-les amb els valors de la Taula 8. Primer compararem els resultats de cada mutant, tant reduïts com oxidats, respecte a WT i després compararem la forma reduïda amb l'oxidada.

En la formació de M en els mutants V101C/M163Cred i V101C/M163Cox es veu que s'arriba més tard al màxim d'absorció, el que concorda amb que el segon component d'ambdós sigui un 50% més lent, passant de 84,2 μ s en WT a uns 130 μ s en els mutants

a pH 7 i de 21,9 μ s a uns 70 μ s a pH 10. El component ràpid en la formació de M contribueix el doble en el mutant, oxidat i reduït, però és 6 i 2 vegades més lent a pH 7 i pH 10 respectivament en comparació amb WT. No es veu diferència en quant al primer component (M_1) en fotòlisi de llampec però el valor de temps de vida mitjà sí que ho és (excepte en el c, on el temps de vida mitjà és molt semblant i a la gràfica sembla més lent). Aquí pot haver hagut un problema amb l'ajust a les dades, que potser degut a una falta de punts a temps curts o a un "sobrearrodoniment" (*oversmooth*). A pesar del dubte en quant a M_1 , està clar que les mutacions han causat que la formació de M_2 s'alenteixi i quedi disminuïda la seva acumulació, tal volta per que queda dificultada la reorientació de la BS de la meitat extracel·lular a la citoplasmàtica que es produeix en la transició de M_1 a M_2 .

La desaparició de l'intermediari M és clarament més lenta als mutants V101C/M163C que en WT, tant a pH 7 com a pH 10. Els valors dels temps de vida mitjana ho recolzen ja que a pesar de mostrar un component amb un valor de l'ordre de WT (sobre 3 ms), apareix un segon component un ordre de magnitud més lent. És a dir, a pH 7 la contribució del component ràpid en el decaïment de M en els mutants és aproximadament del 20% mentre que en WT és del 100%, el que significa que el component lent, amb un 77% domina per sobre del component ràpid. A pH 10 el component ràpid ocupa també un 20%, en comparació amb el 54% de WT, el lent ocupa el doble que en WT i és més d'1,5 vegades més lent, de nou comparat amb WT. En aquests mutants la desaparició de M és biexponencial, com a WT a pH 10. Com s'ha comentat abans, el component lent prové del retorn de N a M, així que encara que en aquests mutants la desaparició de M és normal, també hi ha retorn de N a M el que produeix l'aparició del component lent. Les mutacions segurament han dificultat el pas de N a O, interferint en la reprotonació del Asp96, el que provoca una acumulació de M suficientment gran per a fer que el component lent es vegi a pH 7 i a més sigui el principal, el que més s'acumula. Que no es vegi absorció a 660 nm en els mutants recolzaria la idea de que la formació de l'intermediari O està obstaculitzada. A pesar de que s'esperava que el mutant reduït es comportés com WT, sembla que la mutació dels residus ha dificultat l'entrada d'aigües que s'ha proposat que ocorre amb el moviment de l'hèlix F. Posteriorment compararem els resultats del mutant reduït i oxidat i es podrà discutir si ha afectat més la modificació dels residus o la restricció del moviment de les hèlix. A pH 10 la desaparició de M mostra un comportament com WT però amb el segon component el doble de lent i en una proporció major (45-55% en WT i sobre 20-80% als mutants). L'explicació del component lent als mutants a pH 7 seria la mateixa que per a WT a pH 10 i en els mutants a pH 10 l'efecte es veuria augmentat.

Resultats i Discussió: Part 1

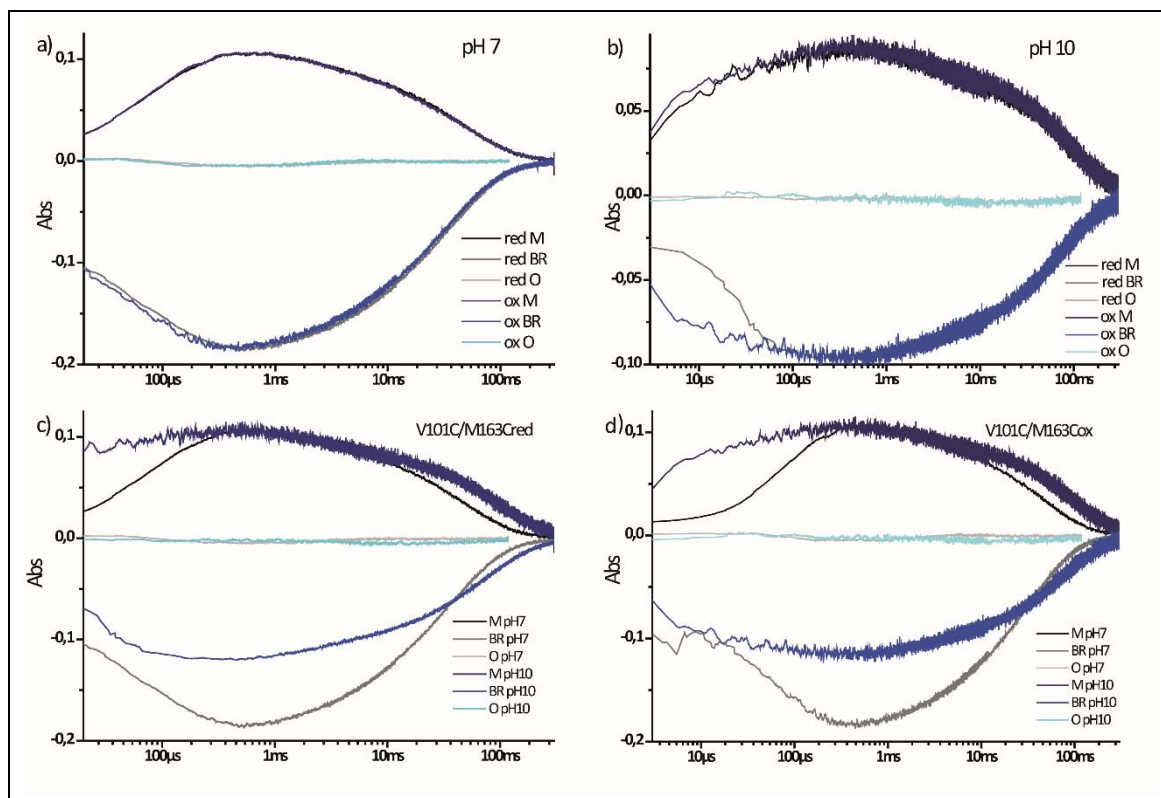


Fig. 70. Comparació de V101C/M163Cred i V101C/M163Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b) i comparació de la mostra reduïda (c) i oxidada (d) a pH 7 i pH 10.

La comparació visual de les gràfiques de la Fig. 70 no deixa veure grans diferències en la cinètica dels diferents intermediaris del doble mutant depenent de l'estat d'oxidació de les cisteïnes. A pH 7 açò estaria en concordança amb les dades de la Taula 8, ja que els valors de temps de vida mitjans són molt semblants i les proporcions dels diferents components també. A pH 10 tant a la gràfica com a la taula es veu que la formació de M en la proteïna reduïda és una mica més lenta, però no hi ha un alt grau de certesa degut als problemes amb les dades mencionat abans. Seria millor parlar de tendències més que de valors absoluts en aquest cas.

pK _a	BR	M ₁	M ₂	N	O
Asp96	11,0 [276]				7,5 [277]
Base de Schiff	13,0 [164, 278]		8,2 [279]		
Asp85	2,6	7,5 [165]			
PRG	9,5 [280]	5,8 [166]			4,5 [281]

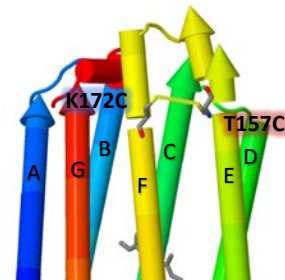
Taula 9. Esquema dels pK_a dels diferents grups que participen en el transport de protons durant els diferents intermediaris. Les fletxes indiquen les transferències de protons entre diferents grups.

Recordem la Fig. 68.b. on es mostra l'evolució temporal de l'absorció a pH 7 i a pH 10 en WT. L'augment del pH en WT accelerava la desprotonació de la BS i la reprotonació que ajustava a una biexponencial en compte d'una monoexponencial. En aquests mutants el mecanisme a pH 10 qualitativament és el mateix que en WT, una acceleració

de la desprotonació de la BS i la reprotonació més lenta i en dos components, amb la diferència que a pH 7 la reprotonació ja ajusta a una biexponencial. Que la desaparició de M en aquests mutants mostri dos components no sols a pH 10 sinó també a pH 7 pot indicar que el pK_a d'alguns dels grups que participen en la formació de l'intermediari N s'ha vist alterat. En principi podríem pensar en el Asp96, responsable de reprotonar la BS, o en la pròpia Base de Schiff. Si fos el pK_a de la BS el que s'hagués vist disminuït per les mutacions en l'estat basal, esperaríem també veure una acceleració en la formació de M cosa que no passa, de fet és inclús més lenta. Si el pK_a de la BS en M ha disminuït per davall del pH del medi (pH 7) l'efecte seria el mateix que treballar a pH 10 però de menor intensitat al veure's augmentada la diferència de pK_a entre grup donador i grup acceptor. Que el pK_a del Asp96 estigui afectat és plausible degut a que M163 està situat per sobre d'ell, separant l'exterior de l'interior de la proteïna.

El que sí que es veu clar és que les diferències més grans es veuen entre els mutants, tant en la versió reduïda com l'oxidada, i WT més que entre el doble mutant reduït i l'oxidat. Açò ens indicaria que la cinètica de l'intermediari M s'ha vist més afectada per la mutació dels residus. Es podria dir que la mutació de residus apolars als extrems citoplasmàtics de l'hèlix C i al bucle EF té un efecte major sobre el fotocicle que la restricció del moviment relatiu entre aquests dos. Faltaria discutir si açò és degut a que el moviment de les hèlix no és tan important o que l'estructura és suficientment "tova" com per a permetre l'entrada de molècules d'aigua inclús fixant l'hèlix C al bucle EF.

T157C/K172C.



La formació de M a pH 7 es produeix més tard en el mutant (tant oxidat com reduït) que en WT. En T157C/K172C el component M_1 és 12 i 8 vegades més lent mentre que el component M_2 és aproximadament 3 i 2,1 vegades més lent, en el reduït i oxidat respectivament, respecte a WT. A més, en ambdós mutants la població del component ràpid augmenta respecte al 15% el WT fins a 64% i 35% en el mutant reduït i oxidat respectivament. En el decaïment de M a pH 7 passa com en V101C/M163C, ajusta a una biexponencial amb un component ràpid que és el doble de lent que WT i un segon component lent un ordre de magnitud més lent. La diferència amb l'anterior mutant és la proporció entre ambdós components, ja que mentre en V101C/M163C el segon component és el predominant, en T157C/K172C els dos components es troben en la mateixa proporció. La diferència del mutant oxidat respecte al reduït és que el primer component és el doble de ràpid i el component lent ho és 1,6 vegades. A més, en T157C/K172Cox el component predominant és el lent (35-65%).

Resultats i Discussió: Part 1

Si comparem els temps a pH 10 respecte a WT, en T157C/K172C la formació de M també ajusta a una biexponencial i els dos components es troben en una proporció semblant a en WT. El primer component és una mica més lent en el mutant i el segon component dura el triple en el mutant reduït i el doble en l'oxidat. La desaparició de M a pH 10 és aproximadament un 50% més lenta que en WT i la població del component lent als mutants és sobre el 60% mentre que en WT és el 45%.

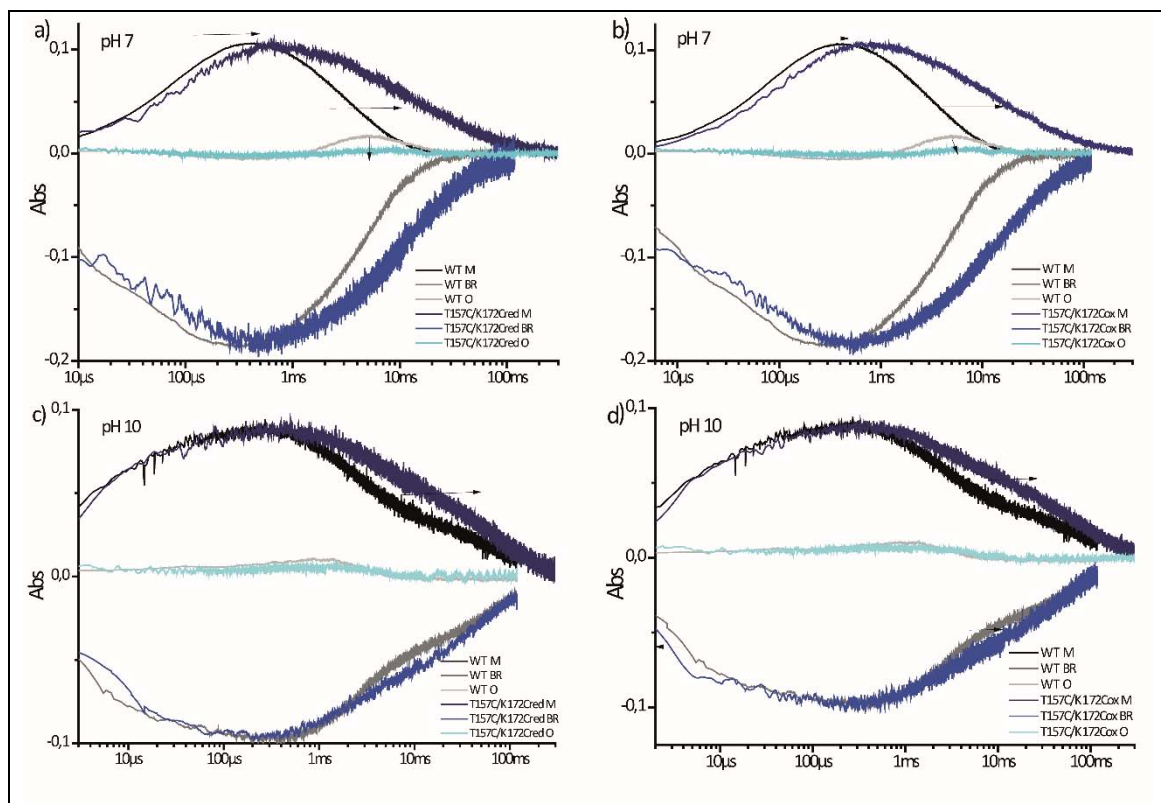


Fig. 71. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** T157C/K172Cred pH 7, **b)** T157C/K172Cox pH 7, **c)** T157C/K172Cred pH 10, **d)** T157C/K172Cox pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa de mode logarímic.

L'alentiment de la formació de M a pH 7 es veu clarament a les gràfiques de fotòlisi de llampec (figura 65 a i b) i també com M decau amb dos components sent el segon predominant i un ordre de magnitud més lent. A pH 10 les diferències en l'aparició de M són més subtils, però quan M decau es veu que el segon component és més lent i predominant.

Com s'ha dit abans, l'aparició del component lent de M s'ha relacionat amb el retorn de N a M, indicant que en aquests mutants s'acumula N. La desaparició del pic corresponent a l'intermediari O indica que aquesta acumulació de N seria deguda a un bloqueig parcial de la formació d'O. Les diferències respecte a WT són degudes sobretot a les mutacions puntuals, ja que a la Fig. 72, on comparem T157C/K172Cred i T157C/K172Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b), les diferències visibles són mínimes.

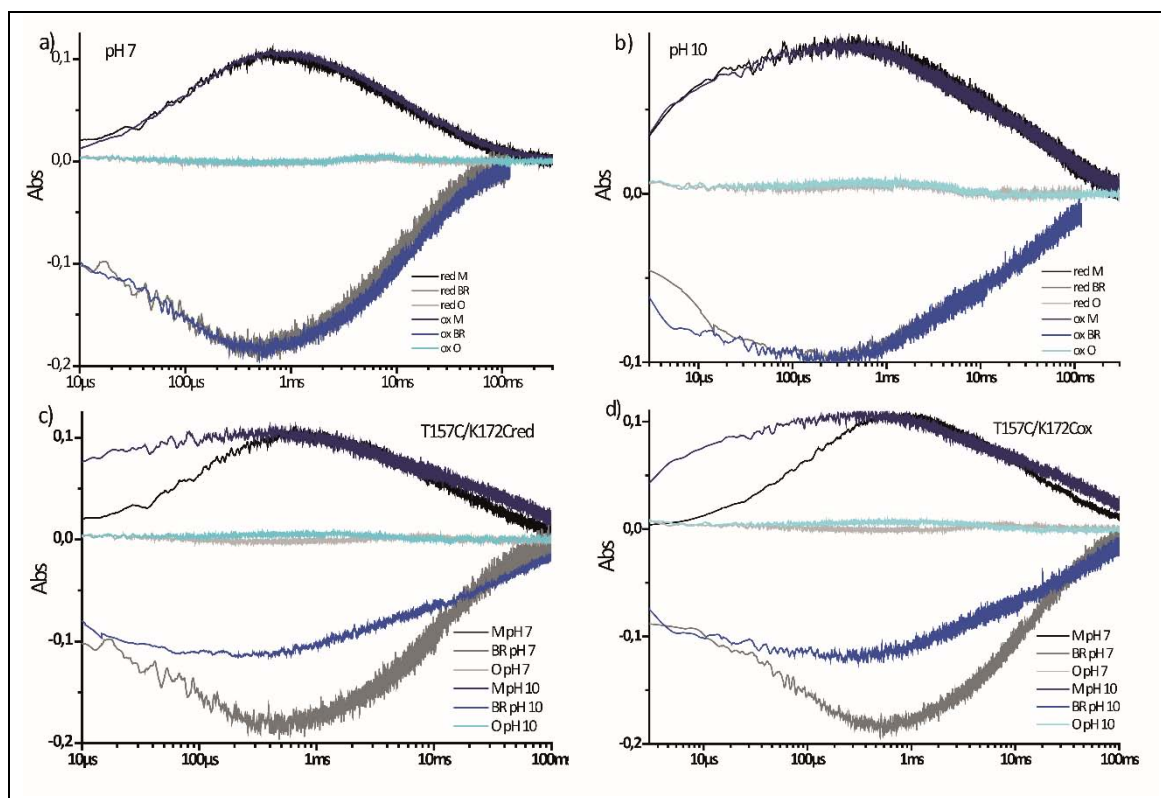
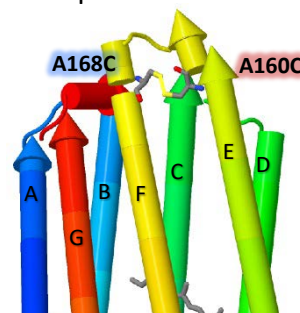


Fig. 72. Comparació de T157C/K172Cred i T157C/K172Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b) i comparació de la mostra reduïda (c) i oxidada (d) a pH 7 i pH 10.

En aquests mutants la reprotonació de la BS (desaparició de M) a pH 7 es sembla molt a la de pH 10, sols que a pH 7 el segon component és una mica més ràpid. L'efecte sobre el pK_a dels grups acceptors i donadors de protons discutits respecte als mutants V101C/M163C també és aplicable en aquest cas.

A160C/A168C.



La formació de M a pH 7 en aquest mutant s'assembla a V101C/M163C, dos components, un primer unes 8 vegades més lent i un segon component és un 50% més lent que el corresponent en WT. Els temps són molt semblants en el mutant reduït i l'oxidat i hi ha una proporció major del segon component. En la desaparició de M hi ha diferències respecte als altres mutants i respecte a WT. Es veuen dos components com en els altres mutants però en aquest cas la població del primer component augmenta del 54% en WT al 70%. En l'oxidat el primer component és com WT i en el reduït és un 50% més lent. Que el segon component tingui una vida mitjana d'uns 20 μs en l'oxidat i

Resultats i Discussió: Part 1

30 μs en el reduït fan que siguin fins el doble de ràpids que els dels altres mutants i per tant els més semblants a WT.

A pH 10 la formació del component ràpid de M en l'oxidat és com WT i en el reduït és un 70% més lent, mentre que la de M₂ és dos i tres vegades més lent en l'oxidat i reduït, respectivament. Així, la cinètica de formació de M és més ràpida en el mutant oxidat que en el reduït. Respecte a WT, els mutants tenen un decaïment del component lent un 40% retardat.

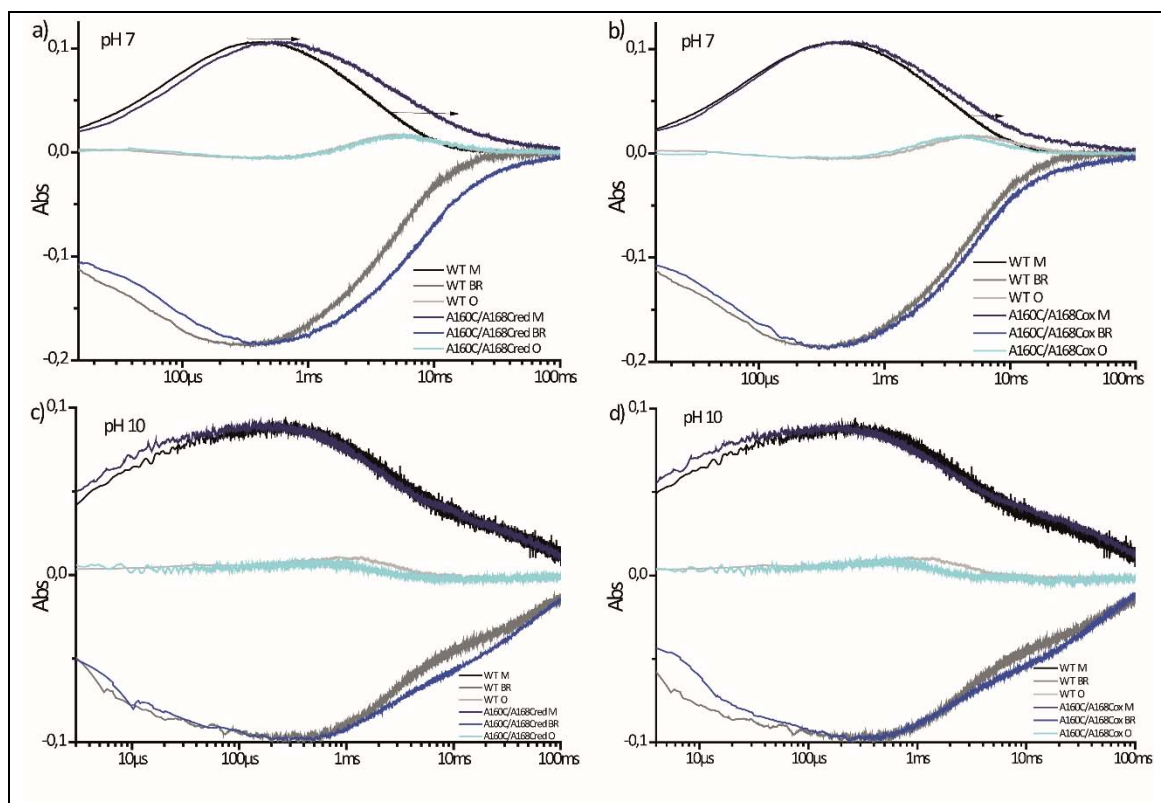


Fig. 73. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** A160C/A168Cred pH 7, **b)** A160C/A168Cox pH 7, **c)** A160C/A168Cred pH 10, **d)** A160C/A168Cox pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa de mode logarímic.

Les diferències en els temps de vida mitjana entre els mutants i WT també es veuen a les cinètiques de la Fig. 73. En aquests mutants la cinètica de desaparició de M a pH 7 ajusta a una biexponencial però el segon component és minoritari, al contrari que en els mutants descrits anteriorment, fet que suggereix que el retorn de N a M es produeix però molt menys que en V101C/M163C i T157C/K172C. En aquest cas si que es veu l'acumulació de l'intermediari O, mostrant un comportament molt semblant al de WT o lleugerament accelerat en el mutant oxidat.

Als anteriors mutants s'ha suggerit que l'aparició del component lent a pH 7 durant la desaparició de M es deuria a una acumulació de N causada per què el pas de N a O és

bloquejat. Aquesta idea estaria recolzada per la cinètica a pH 7 de A160C/A168C, ja que és el mutant amb un comportament més semblant a WT, amb el component lent minoritari i amb acumulació d'intermediari O. A pH 10 la cinètica de M en els mutants s'assembla molt a la de WT.

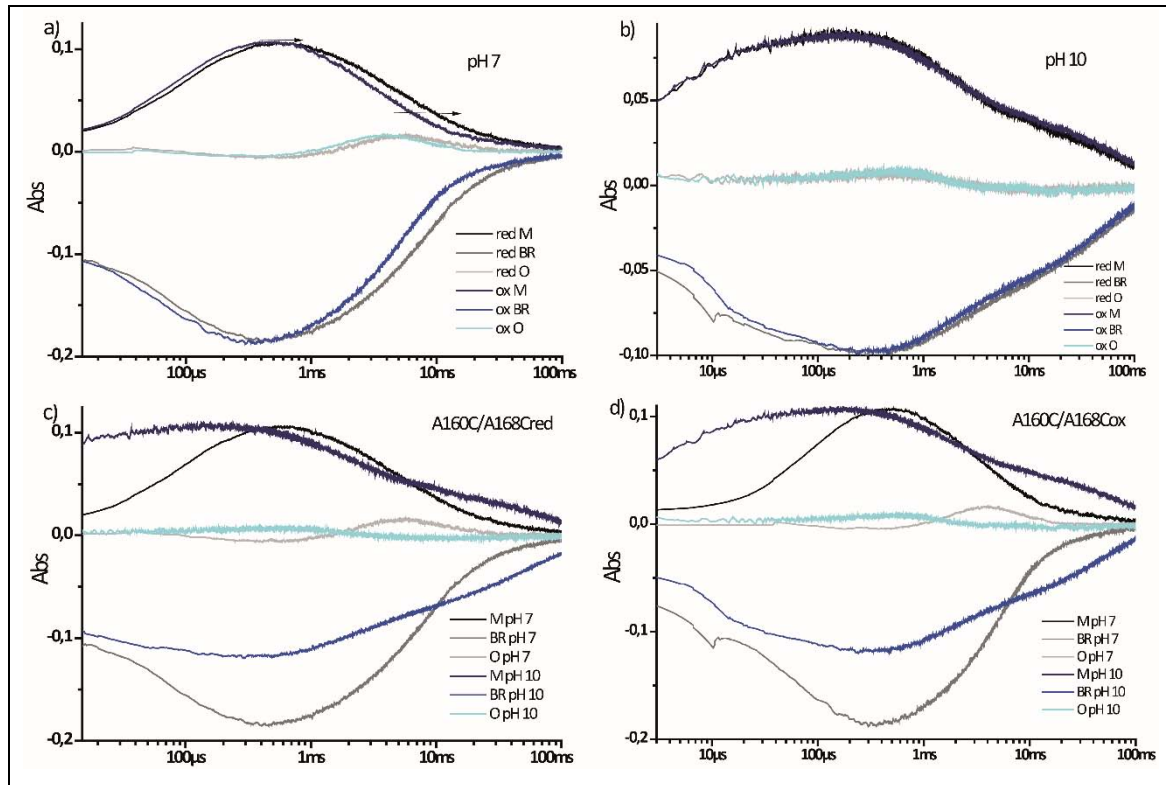


Fig. 74. Comparació de A160C/A168Cred i A160C/A168Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b) i comparació de la mostra reduïda (c) i oxidada (d) a pH 7 i pH 10.

A pH 10 els mutants A160C/A168Cred i A160C/A168Cox tenen la mateixa cinètica. A pH 7 si que hi ha diferències, el mutant oxidat té la cinètica dels diferent intermediaris accelerada. Les mutacions per si mateixes causen canvis que es veuen en el mutant reduït i consisteixen en una formació de M més lenta, sobretot el primer component (M_1) que mentre en WT té una τ de 3,2 μ s en aquests mutants és d'aproximadament 50 μ s. La reprotonació a pH 7 en aquests mutants també ocorre ajustant a una biexponencial el segon component dels quals és més lent quan en la forma reduïda.

A diferència dels altres dos mutants dobles, el comportament d'aquest a pH 7 és molt semblant a WT i el decaïment de M no és com el de pH 10. Sembla que aquestes mutacions no afectarien als pK_a , ja sigui perquè els residus mutats no són importants o perquè es troben més a l'extrem de l'hèlix E i el bucle EF, pel qual en cas de dificultar el moviment de les hèlix la part fixada seria menor.

Per tractar de dilucidar a quina mutació es deuen els canvis respecte a WT que es veu als mutants reduïts, podem comparar els nostres resultats amb alguns experiments que s'han fet amb mutants d'alguns dels residus que mutem.

Comparació amb treballs previs realitzats amb algunes de les mutacions.

S'han fet experiments de fotòlisi de llapec amb mutants simples V101C i A160C que mostraven una formació de M igual a WT però el decaïment resultava pertorbat [201, 282]. En concret, el decaïment de M en el mutant A160C era més lent que en WT que, junt a un decaïment lleugerament retardat en A168C [283], podria explicar les diferències en el decaïment de M respecte a WT que s'observen en A160C/A168C en la figura 67.

A la figura 63 veiem que als mutants V101C/M163C tant reduïts com oxidats no es veia l'absorció a 660 nm deguda a l'intermediari O. Açò podria ser degut parcialment a la mutació M163C ja que el doble mutant L103C/M163C marcat per a EPR (ressonància electrònica paramagnètica) tampoc acumulava l'intermediari O [143]. A més, mostrava una cinètica de M quasi no pertorbada, el que junt a més mesures del decaïment de M en V101C, que mostraven que és 4 vegades més lent que en WT [210], atribuirien els canvis que observem en V101C/M163C a la mutació de V101C o a la unió d'ambdós mutacions, explicant parcialment els canvis observats (figura 63).

Del mutant T157C sols es troba una referència [283] i el decaïment de M és molt semblant a WT, pel que en un principi les diferències observades en T157C/K172C serien atribuïbles a la mutació de K172.

b. Proteïna incorporada en liposomes.

Per a estudiar el bombeig de protons per part de la bR se la pot incorporar en liposomes.

Al seu medi natural, la bR formant membrana púrpura bombeja protons cap a l'exterior, acidificant el medi i creant un gradient de protons la dissipació del qual s'utilitza per a la síntesi d'ATP mitjançant la ATP sintasa. Una vegada es té la membrana púrpura purificada, es pot reconstituir en vesícules lipídiques per a formar proteoliposomes, membrana púrpura incorporada en liposomes.

La bR, tant purificada amb detergents o en fulles de membrana púrpura, té la capacitat d'incorporar-se espontàniament a vesícules lipídiques, tan sols mesclant-la amb lípids. S'han desenvolupat diverses tècniques, com la sonicació, la premsa francesa o la reconstitució mitjançant detergents [284, 285]. El transport de protons en liposomes depèn de molts factors com la composició lipídica i la mida dels liposomes o el pH de la mostra, ja que afecten a la orientació en que es col·loquen les fulles en la bicapa dels liposomes [286, 287]. Amb el mètode que utilitzem, homogeneïtzació per alta pressió [261], la orientació predominant de les fulles és una orientació invertida, la bR bombeja cap a l'interior de les vesícules. A l'apartat 6.a. dels Materials i Mètodes s'explica com es

preparen els proteoliposomes. El transport es mesura com a canvi de pH amb un pH-metre.

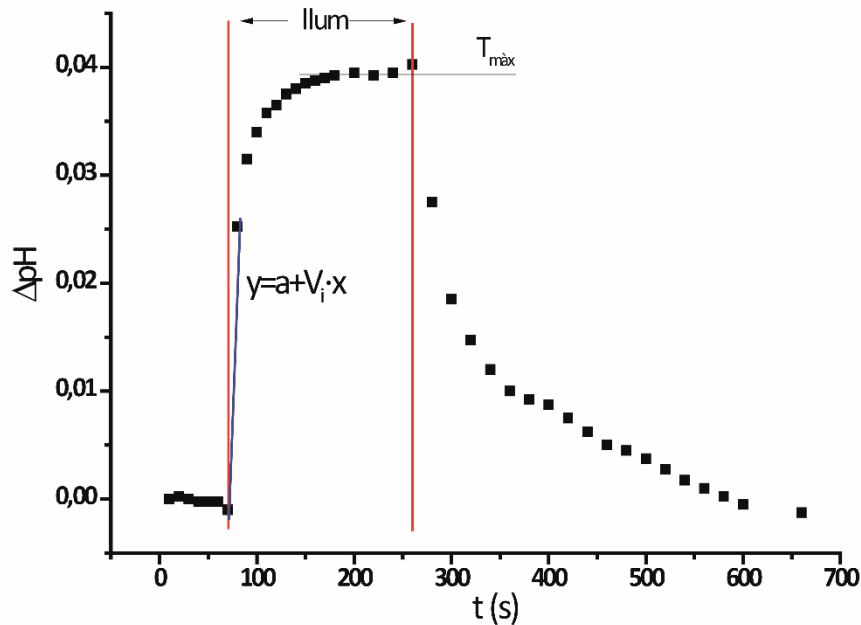


Fig. 75. Gràfica de la representació de la variació de pH amb el temps per a WT. S'indica com es calculen els paràmetres usats per obtenir informació. $T_{m\grave{a}x}$ és el valor de transport màxim i V_i és la velocitat inicial de transport.

	$V_i (x10^3)$	$V_i/V_{i,WT}$	$T_{m\grave{a}x}$	$(T/T_{WT} \cdot 100) \%$
WT	2,62	1	0,108	100
V101C/M163Cred	3,07	1,17	0,053	49
V101C/M163Cox	0,77	0,29	0,015	14
T157C/K172Cred	7,65	2,92	0,106	100
T157C/K172Cox	6,16	2,35	0,101	98
A160C/A168Cred	5,45	2,08	0,095	88
A160C/A168Cox	4,05	1,55	0,082	76

Taula 10. Valors obtinguts dels experiments de transport amb liposomes i comparació dels valors respecte a WT. La velocitat inicial de transport (V_i) està expressada en unitats de pH per segon ($\Delta\text{pH/s}$). $V_i/V_{i,WT}$ és la V_i comparada amb la V_i de WT i V és la comparació entre la $T_{m\grave{a}x}$ i $T_{m\grave{a}x}$ de WT expressat en percentatge.

Durant el primer minut s'enregistra el pH de la mostra sense il·luminar. A l'il·luminar amb llum groga es veu un ràpid increment del pH degut a que la proteïna comença a bombejar protons cap a l'interior dels liposomes. La velocitat d'aquest bombeig va disminuint fins que s'arriba a un equilibri entre la sortida de protons per difusió i

Resultats i Discussió: Part 1

l'entrada per acció de la bR, arribant a la $T_{m\grave{a}x}$ o quantitat de bombeig total. Aquest paràmetre, junt a la velocitat inicial (V_i) ens permet comparar els diferents mutants i veure com està afectada la funció respecte a la bR nativa.

Encara que cap mutant presenta un bombeig total de protons major que WT, tots excepte V101C/M163Cox tenen una velocitat inicial més gran, com per exemple la de T157C/K172Cred que és quasi el triple que la de WT. Els mutants més deficients en el transport de protons són V101C/M163Cred i V101C/M163Cox, on la proteïna reduïda encara que té una velocitat inicial de bombeig un 17% superior a WT, el transport màxim és sols la meitat i l'oxidada té una velocitat inicial de un terç que WT i $T_{m\grave{a}x}$ de sols un 14%. Aquest mutant també és el que presenta major diferència entre la proteïna reduïda i l'oxidada, suggerint que encara que les mutacions afecten al transport, la restricció del moviment del bucle EF té un efecte encara major.

La mutació dels residus T157C/K172C no té efecte sobre $T_{m\grave{a}x}$ però sí sobre V_i ja que és major tant en la proteïna reduïda com en l'oxidada. Però també es veu que l'oxidació produeix una disminució en la velocitat inicial. En el mutant A160C/A168Cred, la $T_{m\grave{a}x}$ és semblant a WT però la V_i és el doble. En aquest cas, però, l'oxidació causa una reducció del 15% en el transport total i del 25% en la velocitat inicial de transport.

Els canvis més importants en el transport de protons mesurat en liposomes són deguts a modificacions en l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix C i el bucle EF (mutant V101C/M163C). La simple mutació ja causa efectes, com la reducció del bombeig total, però és el doble mutant on l'oxidació afecta més. Ambdós aspectes indicarien que els residus de la zona citoplasmàtica de l'hèlix C i el bucle EF són importants en el transport però que, sobretot, el moviment relatiu del bucle EF tindria un paper destacat durant el transport, ja que, si s'impedeix l'obertura de la zona, el transport es veu disminuït en un 70%.

c. Transport de protons en presència de piranina.

El mètode desenvolupat per a mesurar el transport en liposomes explicat a l'apartat anterior forma proteoliposomes amb la bR orientada per a bombejar protons cap a l'interior. Però com no es pot excloure la presència d'una fracció de proteïna orientada cap a l'exterior [288] també s'han utilitzat altres tècniques complementàries. Una d'elles és utilitzar colorants indicadors de pH per a detectar l'alliberament i captació de protons induïts per l'excitació amb flash en mostres en suspensió de membrana púrpura. Alguns dels colorants que es poden utilitzar són el 7-hidroxycoumarina [289], el vermell fenol [290] o la piranina (pyr) [291, 292]. Aquesta última és la que utilitzem en aquest treball i es pot usar tant per a detectar el transport en proteoliposomes [293] com en membrana púrpura en suspensió.

La piranina s'utilitza degut a que la seva absorptió canvia depenent de l'estat de protonació i a que té un pK_a de 7,2 [263], que és el pH idoni per al creixement d'*H. salinarum* i per al funcionament de la bR. Quan la bR allibera un protó, aquest és captat per la piranina i mitjançant espectrofotometria de flash resolta amb el temps es mesura el canvi d'absorció associat a la seva protonació i desprotonació. Així, es pot estudiar la cinètica de l'expulsió del protó i l'efectivitat del procés.

S'ha mesurat el transport de protons amb les dues tècniques perquè és convenient utilitzar-les complementàriament degut a les limitacions pròpies de cadascuna. El problema de mesurar el transport amb piranina és que al treballar amb suspensions de membrana púrpura no es pot saber per quin costat és expulsat i captat el protó, ja que en teoria totes les possibilitats donarien el mateix efecte, sense implicar transport net de protons a través de la membrana [292].

Estudis amb colorants dependents de pH han demostrat que la bR WT transporta un protó per cicle i que en les mesures pot semblar que a vegades el transport és major degut a protonacions transitòries, els anomenats protons Bohr [290, 292].

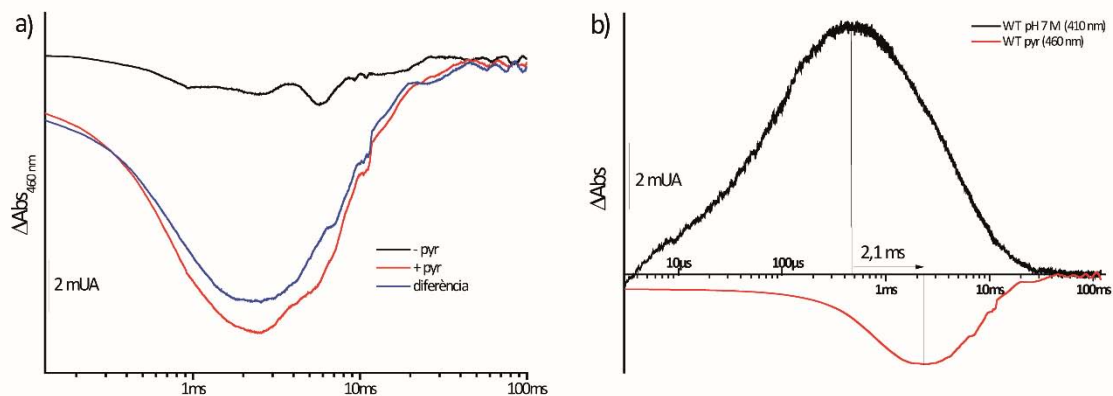


Fig. 76. Per a mesurar el transport de manera indirecta es fa incidir un feix de làser i es mesura l'absorbància a 460 nm amb el temps. **a)** En color negre (- pyr) es representa l'evolució de l'absorbància de la mostra a 15 μ M, KCl 150 mM pH 7,2 i sense piranina respecte a la línia base. En vermell (+ pyr), la que s'obté a l'afegir piranina a una concentració final de 50 μ M, també respecte a la línia base. Finalment, en blau es mostra l'evolució de l'absorbància que s'utilitza per a seguir la cinètica, resultat de restar el negre al vermell per a descartar absorció deguda a intermediaris de la bR i no a la piranina. **b)** Evolució de l'absorbància mesurada per fotòlisi de llampec de l'intermediari M de WT a pH 7 junt a l'espectre de la mesura de transport de protons amb piranina.

A pesar de les limitacions, la tècnica permet l'estudi cinètic del transport de protons durant el fotocicle per fotòlisi de llampec. Amb el mateix aparell que l'utilitzat per als experiments de fotòlisi de llampec de l'apartat 2.a. d'aquesta primera part de resultats, es mesura la diferència d'absorció de la bR amb piranina i sense. Primer es resta la línia base a l'absorció a 460 nm amb i sense piranina i després es resta l'absorbància de la mostra sense piranina al que sí en té. Es fa així per a discriminar l'absorbància causada

Resultats i Discussió: Part 1

per la piranina de la deguda als diferents intermediaris com per exemple el M, que té el màxim d'absorció a 412 nm, solapant-se parcialment amb el de la piranina.

Com es veu a la Fig. 76.b. quan la bR allibera el protó en el pas de L a M, causa la protonació de la piranina i aquesta en la forma protonada absorbeix menys, cosa que es veu a la gràfica amb una disminució de l'absorció. Quan la bR capta un nou protó en el pas de N a O, la piranina perd el protó i augmenta la seva absorbència. Així, amb la piranina es pot seguir l'alliberament i captació de protons per part de la bR. Amb el sistema de la piranina, s'ha descrit que la captació del protó per part de la piranina amb la conseqüent disminució en l'absorbència es produeix en retard amb el moment teòric d'alliberament [292], que es produeix quasi al moment de desprotonació de la BS. Aquest retard seria degut a que el protó ha de difondre fins a les molècules de piranina.

Per deixar clars els esdeveniments, durant la formació de M la BS es desprotona i el PRG allibera el protó al medi. Aquí amb fotòlisi de llampec es veu aparèixer l'intermediari M i més tard l'absorbència de la piranina disminueix. En el pas de M a N la BS és reprotonada pel Asp96 i l'absorbència de M va disminuint. En el pas de N a O es capta un nou protó per a reprotonar Asp96 i és quan la piranina deuria recuperar l'absorbència.

El retard entre el màxim d'absorció de M i el mínim de la piranina també es pot usar per a veure si els mutants presenten variacions.

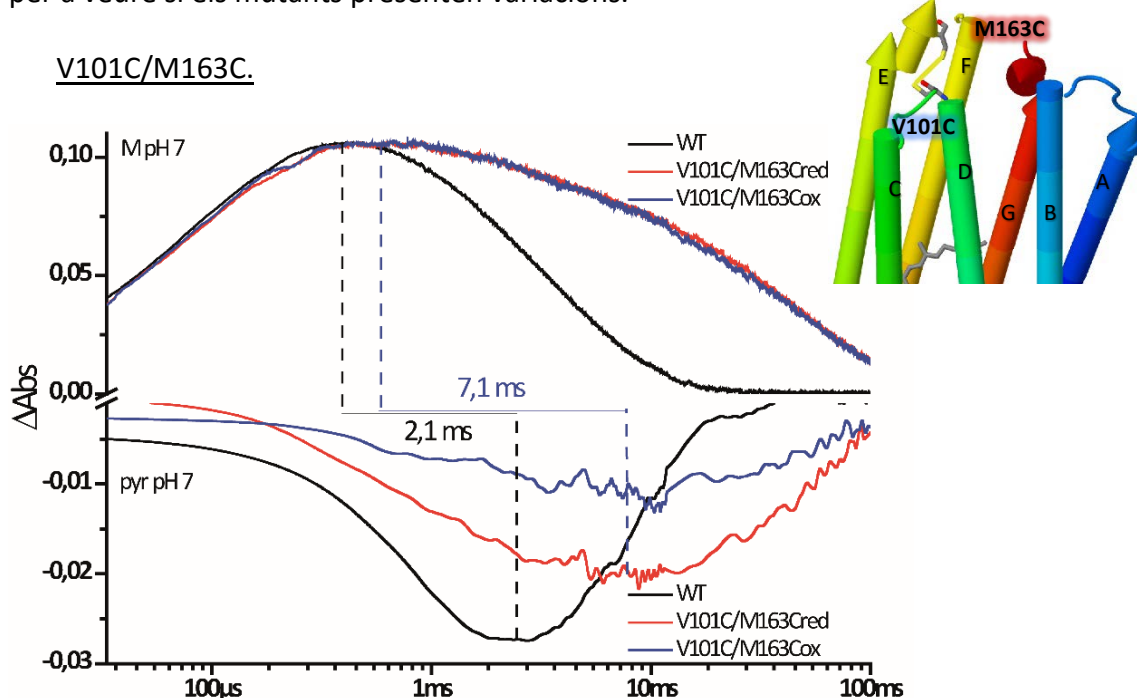


Fig. 77. En aquesta figura es representa la cinètica de M per a WT, V101C/M163Cred i V101C/M163Cox i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

Com ja s'ha comentat abans, la cinètica de la formació de M en els mutants és una mica més lenta que en WT, sent el temps de vida mitjà per a M_2 aproximadament un 50% més lent en els mutants. Però aquest endarreriment en l'alliberació del protó és molt més pronunciat quan es mesura amb piranina, ja que passa de 2,1 ms en WT a 7,1 ms en els mutants. Es sol considerar instantani l'alliberament del protó per part del PRG una vegada la BS es desprotona (instantani en quant a que la formació de M_1 i M_2 ocorre en l'ordre dels microsegons i l'evolució en l'absorció de la piranina a 460 nm té lloc en l'escala dels mil·lisegons), però en aquest cas el desfasament entre els temps de desprotonació de la BS i l'alliberament del protó podria indicar que als mutants no ocorre instantàniament. D'alguna manera les mutacions desfasen els dos esdeveniments moleculars.

Els temps d'alliberació del protó en el mutant V101C/M163C tant reduït com oxidat són molt semblants, però entre ambdós el rendiment és diferent. El mutant reduït té un rendiment de transport de protons aproximadament un 30% menor que WT, però el rendiment de l'oxidat és quasi un 60%. Els temps dels esdeveniments semblen estar afectats sobretot per les mutacions, però el rendiment a més d'estar disminuït per les mutacions ho està per la restricció del moviment de les hèlix. La mutació simple V101C per si sola ja produeix cert alentiment de l'alliberament del protó [201] però no explica tot el canvi observat.

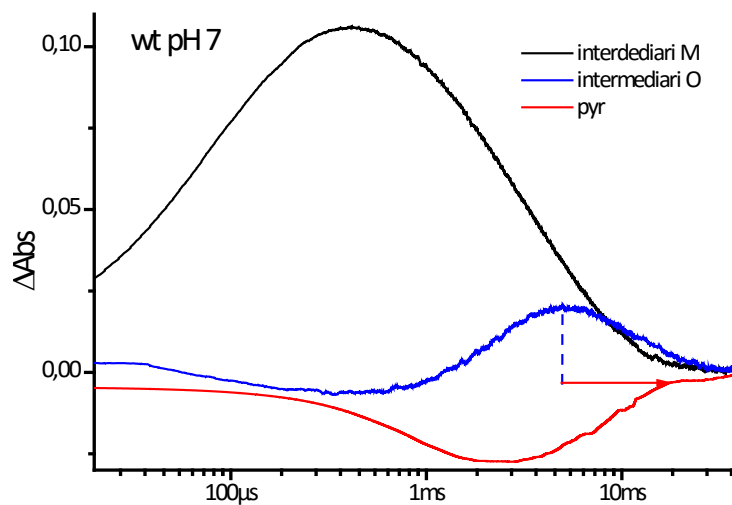


Fig. 78. Cinètica de l'intermediari M, del O i del protó en WT pH 7. El final de la captació del protó sembla coincidir amb la desaparició total de M, però en realitat la captació d'un nou protó per part de la bR es produeix durant la formació de l'intermediari O i el màxim de O és quan ja s'ha completat la captació del nou protó provinent del citoplasma. Al igual que l'alliberament del protó, la captació del nou mesurat amb la piranina també es produeix amb un retard, segurament perquè el protó captat per la bR no és el de la piranina protonada, sinó un del medi i al treballar a un pH igual al pK_a de la piranina s'indueix a aquesta a desprotonar-se.

La captació de nou del protó també està endarrerida respecte a WT, coincidint amb el decaïment més lent de M en els mutants i el conseqüent endarreriment temporal dels

Resultats i Discussió: Part 1

següents intermediaris. A la Fig. 77.b. es veu que encara que l'alliberament del protó es veu retardat seguint el canvi d'absorbància de la piranina, el final de la captació i la total desaparició de M pràcticament coincideixen temporalment, de manera similar a WT. El lleuger retard de la cinètica de captació del protó respecte a la desaparició de M es deu a que realment durant la formació de l'intermediari O (veure Fig. 78).

Abans havíem suggerit que el segon component del decaïment de M en els mutants seria l'anomenat component lent de M (M_s) que prové del retorn de N a M, i que aquest retorn seria degut a una acumulació de N causada per un bloqueig parcial del pas de N a O. Ara, a més de l'absència de O en la figura 63a i b tenim les dades de la cinètica de captació del protó, que com s'ha dit és un esdeveniment que ocorre durant la formació de l'intermediari O.

Aleshores, la substitució dels residus apolars de l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix C i del bucle EF per cisteïnes causa els efectes ja descrits en fotòlisi de llampec però, a més, la restricció del moviment relatiu de l'hèlix C i el bucle EF disminueix el rendiment del transport de protons. Degut a la posició de les mutacions aquesta reducció del rendiment addicional a la causada per les mutacions puntuals seria deguda a que la reprotonació del Asp96 estaria afavorida pel moviment de les hèlix pel costat citoplasmàtic i a l'impedir-ho queden molècules sense reprotonar que no poden participar en el següent fotocicle. Igualment, sembla que el caràcter apolar dels residus d'aquesta zona és important també en aquest procés.

T157C/K172C

Per aquest doble mutant, el que observem és:

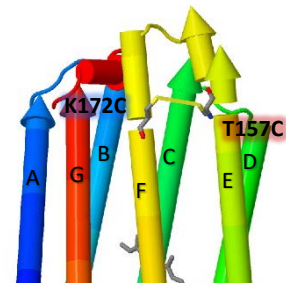
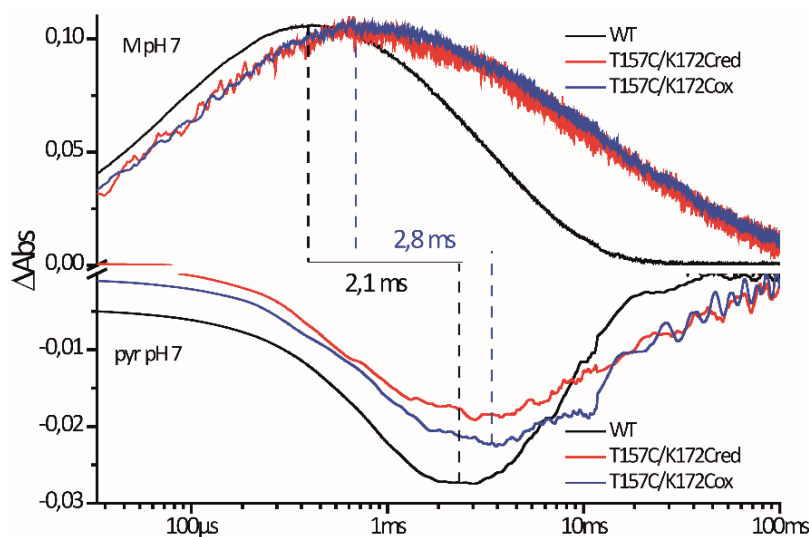


Fig. 79. Cinètica de M per a WT, T157C/K172Cred i T157C/K172Cox i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

En aquest cas, la captació del protó està endarrerida respecte a WT però molt menys que en els mutants V101C/M163C (0,70 ms de retard front a 5,1 ms). Tenint en compte l'endarreriment en un ordre de magnitud de la detecció dels protons amb piranina respecte a la mesura de M per fotòlisi de llampec, l'endarreriment en la detecció del protó als mutants respecte a WT és semblant al de la cinètica de M.

La mesura de la captació d'un nou protó també mostra que es produeix més lentament, fet que és coherent amb el decaïment biexponencial de M que retarda la segona part del fotocicle i per tant la captació del protó des del citosol en el pas de N a O. La no acumulació de l'intermediari O (figura 65a i b), la possible formació de M^s degut a l'acumulació de N i la captació del protó retardada i més lenta (menor pendent que en WT) suggereixen que en aquests mutants la formació de l'intermediari O, de manera similar al que ocorre en V101C/M163C, es veu dificultada.

La mutació dels residus ha causat un endarreriment en la formació de M i consegüentment un endarreriment en l'alliberament del protó i a més han afectat a la formació de l'intermediari O. En quant a la restricció del moviment de les hèlix, ambdós mutants tenen un rendiment menor de transport de protons, un 30% menys el mutant reduït respecte a WT i un 20% menys en el cas del mutant oxidat. La restricció del desplaçament relatiu entre el bucle EF i l'hèlix F sembla que fa recuperar una mica el rendiment en el transport de protons.



Fig. 80. Representació de l'estructura d'un trímer de bR vist des del costat citoplasmàtic. Els cercles vermells senyalen els residus T157 i K172 tan com s'han resolt a l'estructura 1BRR del PDB, proteïna WT. Representació feta amb PyMol.

A la Fig. 80 es veu que a la proteïna WT els residus T157 i K172 són polars i que en concret K172 està orientat cap a l'exterior i podria interaccionar ja sigui amb el solvent o amb altres trímers. Aquesta possible interacció li podria conferir certa rigidesa a l'hèlix,

Resultats i Discussió: Part 1

la qual es perdria al mutar el residu per una cisteïna. si açò fos així, al formar el pont disulfur adquiriria de nou certa rigidesa de moviment el que explicaria una recuperació parcial del rendiment en el transport de protons. Quan es dissenyen els mutants s'intenta usar residus dels quals no s'hagi descrit cap efecte o que siguin mínims, però és inevitable trobar-se amb certs efectes no esperats quan es treballa amb mutants.

A160C/A168C

A l'apartat de la fotòlisi de llampec s'ha comentat que aquest doble mutant era dels tres dobles mutants citoplasmàtics construïts el que tenia una cinètica de M més semblant a WT. Ara veurem què passa amb la cinètica d'alliberament i captació dels protons.

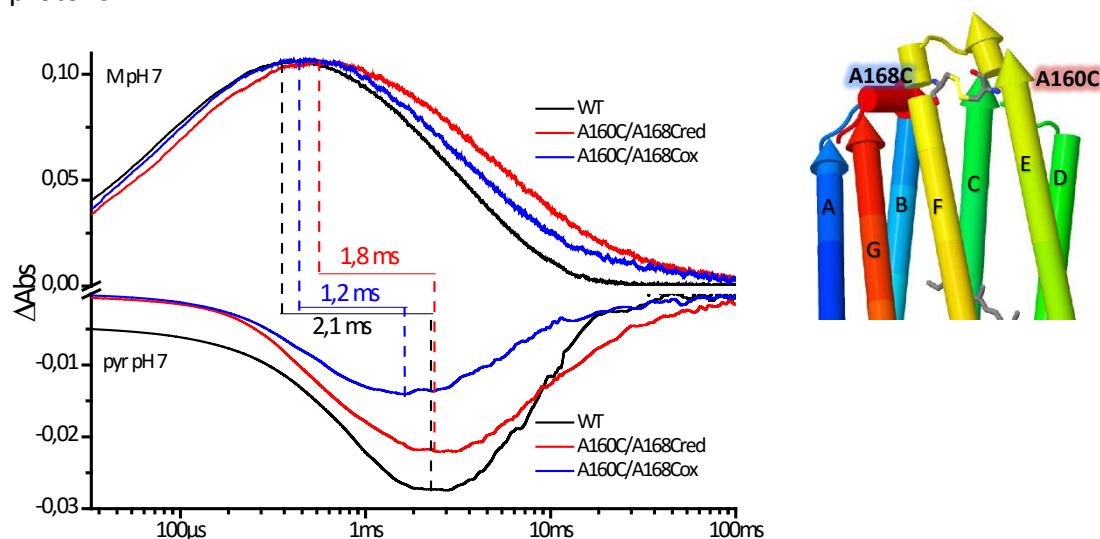


Fig. 81. Cinètica de M per a WT, A160C/A168Cred i A160C/A168Cox i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

Si ens fixem en el mutant A160C/A168Cred, presenta un temps de retard molt similar a WT (1,79 ms), degut sobretot a la formació més tardana de M, ja que el mínim d'absorció amb piranina pràcticament coincideixen en el temps, coincidint amb el que ja s'havia vist per al mutant A160C [201]. La captació del nou protó és més lenta que en WT, coincidint amb el decaïment de M més lent en el mutant, però respecte als altres mutants es produeix abans i amb una pendent major. Així, la mutació de les alanines, residus amb cadena lateral petita i hidrofòbica, per cisteïnes afecta al rendiment (un 20% menor) i endarrereix lleugerament la formació de l'intermediari O.

La fixació del moviment de les hèlix (A160C/A168Cox) té un fort efecte en la cinètica de transport de protons. Primerament, accelera l'alliberament del protó, el que ve indicat pel retard, que és quasi la meitat que en WT (o també és pot veure com a que l'alliberament és el doble de ràpid). La captació del nou protó al costat citoplasmàtic també és més ràpida que WT, a pesar de que l'intermediari M decau més lent.

L'eficiència del transport està disminuïda un 50%, el que podria estar relacionat amb el desfasament entre la desaparició de M i la captació del nou protó. El fet de fixar el bucle EF i l'hèlix F en un punt més extern que en el mutant T157C/K172C ha fet que la cinètica del protó es vegi accelerada, tant l'alliberament com la captació. Contradictòriament a aquest fet, la cinètica de l'intermediari M del mutant oxidat és més lenta que en WT. Aquest aspecte aparentment contradictori podria suggerir que el moviment d'obertura del bucle EF estaria involucrat en la regulació temporal dels esdeveniments (el que en anglès s'anomena *timing*) i que com no es pot produir el moviment, hi ha un desajust temporal entre l'estructura del RBP i la via de captació de protons. Aquest desajust explicaria el baix rendiment del transport de protons. També es podria explicar si al formar el pont disulfur l'hèlix F arrastra a l'hèlix E quan es desplaça obrint més l'espai i permetent que entrin més molècules d'aigua i el protó arribi abans a la BS.

d. Espectres d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR).

Aquesta tècnica ens permet obtenir tant informació estructural com funcional. Nosaltres hem obtingut espectres d'infraroig en estat estacionari, atrapant la bR en un intermediari determinat. A la figura 76 hi ha exemples d'espectres que obtenim:

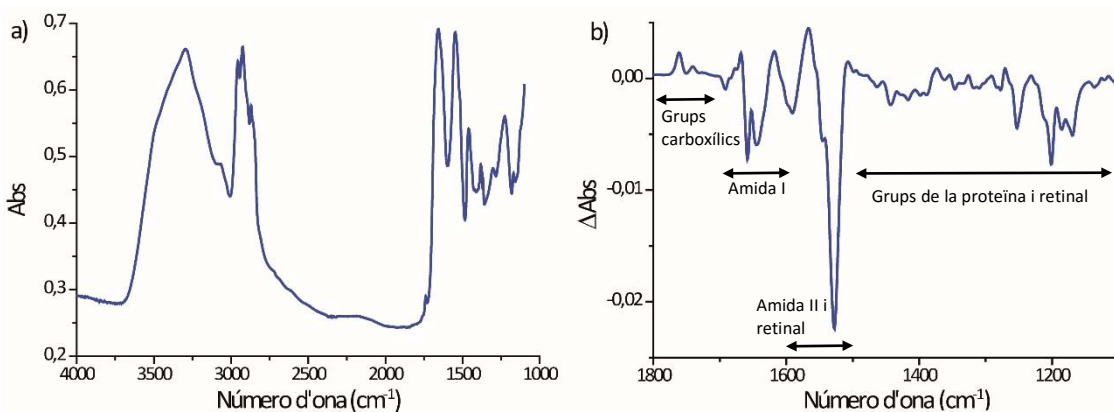


Fig. 82. a) Espectre d'absorció. A l'espectre de FTIR obtingut de la proteïna se li resta un espectre de vapor, obtingut sense posar cap mostra, per a eliminar la contribució del vapor d'aigua present a l'aparell. Aquest, però, sols ens permet obtenir informació molt general, com el grau d'humitat de la mostra i saber que hi ha amida I i II, lípids i aigua. Quan es pot obtenir més informació és amb el gràfic b. **b) Espectre de diferència** de FTIR. En l'estudi de la bR es treballen en condicions que permeten atrapar determinats intermediaris. Aleshores il·luminant la mostra s'obté l'espectre d'absorció de l'intermediari atrapat i se li resta l'espectre d'absorció de la proteïna a la foscor, en estat basal. Així obtenim espectres de diferència, on un pic positiu o negatiu indica canvis en els grups de la proteïna.

Els espectres de diferència mostren els canvis que es produeixen. Si tenim els films preparats a una temperatura, humitat i pH determinats i il·luminem podem allargar la vida mitjana de determinats intermediaris fent que en aquelles condicions, dins de les mesclures que es solen obtenir, siguin els que més contribueixen en l'absorció. Així restant espectres, podem determinar els canvis que s'han produït respecte a la mostra sense

Resultats i Discussió: Part 1

il·luminar, la de la proteïna en estat basal, BR_{570nm}. A les condicions que nosaltres treballem, s'atrapen els intermediaris M i N principalment.

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

Taula 11. Taula amb algunes de les bandes més característiques dels espectres de diferència dels intermediaris M i N indicant si són positives (+) o negatives (-) [114, 117].

Com que la radiació d'infraroig té la capacitat d'excitar diferents tipus d'enllaç depenent de la freqüència (recordem Materials i Mètodes), depenent de en quina regió de l'espectre trobem els pics podem determinar a quin tipus d'enllaç correspon. En la

regió que va de 1.800 cm^{-1} a 1.700 cm^{-1} s'exciten els enllaços C=O dels grups carboxílics, que es troben per exemple en Asp i Glu. En la regió de 1.700 a 1.600 cm^{-1} s'excita l'amida I dels enllaços peptídics, el que dóna informació sobre canvis en girs reversos i en les hèlixs. Entre 1.600 i 1.500 cm^{-1} s'excita l'amida II de l'enllaç peptídic i l'enllaç C=C del retinal. Entre 1.500 i 1100 cm^{-1} s'afecta al retinal i alguns residus de la bR [294, 295].

Per assignar més concretament les bandes dels espectres de diferència, s'han d'utilitzar tècniques complementàries. Per exemple en la regió entre 1.800 i 1.700 cm^{-1} les bandes positives es deuen a protonacions de grups carboxílics i les negatives a desprotonacions. Aquestes bandes es veuen perquè en estat basal es troben en l'estat de protonació contrari, quan veiem bandes negatives en estat basal estaven protonats i viceversa. Per a assignar individualment les bandes a residus específics s'ha treballat amb mutants, com per exemple, el mutant D85N ha permès assignar la banda positiva de 1.762 cm^{-1} , en condicions d'atrapar l'intermediari M, a la protonació del Asp85 [117].

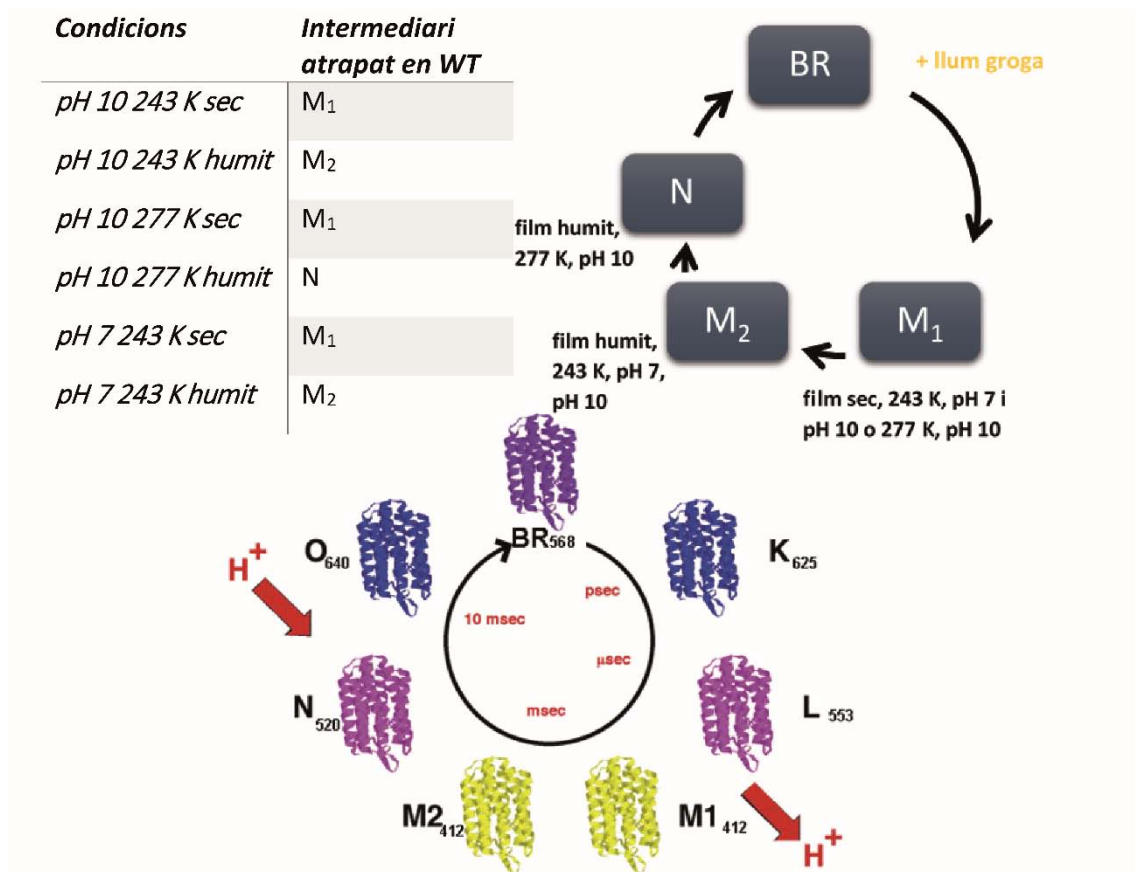


Fig. 83. Treballant amb films de bR, hi ha determinades condicions del film als quals podem atrapar diferents intermediaris del fotocicle. A l'esquerra, taula amb les condicions i l'intermediari que atrapen en WT. A la dreta, esquema dels intermediaris que utilitzem en FTIR i les condicions per a atrapar cada intermediari.

Depenent de les condicions amb la que es prepari la mostra, s'atrapen majoritàriament diferents intermediaris, pel que modificant les condicions de pH, temperatura i humitat del film podem obtenir espectres de diferència de diferents

intermediaris. Nosaltres treballarem amb les condicions que en WT serveixen per a que quedin atrapats majoritàriament els intermediaris M_1 , M_2 i N. Aquestes condicions són les representades a la Fig. 83.

Si recordem l'apartat 10 de la Introducció, hi havia controvèrsia sobre si hi ha diferències estructurals detectables entre els dos subintermediaris de M i el paper d'aquests canvis en el mecanisme de *molecular switching* (interruptor molecular, veure figura 78), mecanisme que asseguraria la direccionalitat del transport impedit que els protons es transportessin en la direcció inversa. Estudis amb el mutant D96N, en el qual la formació de l'intermediari N està bloquejada degut a que no està el Asp96 per reprotonar la Base de Schiff, proposen que hi ha petites diferències entre un estadi primerenc de M i un tardà (*early M* i *late M* en anglès), que temporalment correspondrien a M_1 i M_2 respectivament i proposaven que el *switching* es donaria durant la formació d'un subintermediari intermediari entre M i N, que anomenaven MN [217, 296]. Segons aquests treballs els canvis en M seguirien aquesta cronologia: $M_1 \rightarrow M_2 \rightarrow MN$.

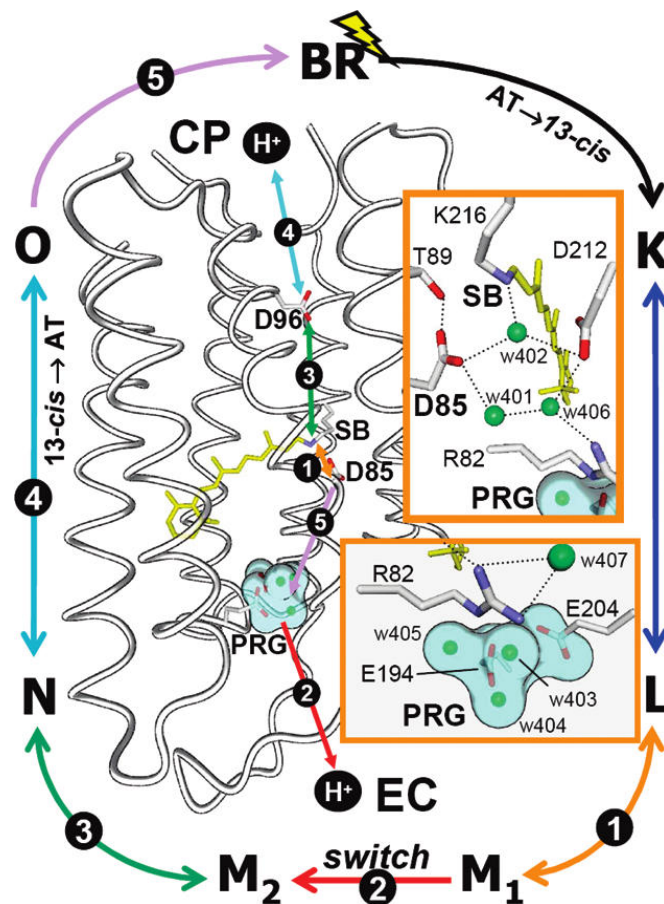


Fig. 84. Esquema del fotocicle on s'indiquen els diferents canvis que es produeixen: les fletxes de color indiquen la direccionalitat i diferencien els intermediaris, s'indiquen els moviments de protons que es produeixen, els canvis conformacionals del retinal i en moment en el que es produeix el *switch*. Imatge obtinguda de [297].

Treballs posteriors han negat l'existència d'aquests canvis conformacionals [297] entre M_1 i M_2 i atribueixen els canvis observats i l'intermediari MN als canvis normals de M a N en el mutant D96N, mutant que no pot formar l'intermediari N pròpiament dit al no haver un Asp96 que reprotoni la BS.

En aquest apartat estudiarem els mutants en les diferents condicions, veurem els espectres de diferència en comparació amb els de WT i els comentarem. Com s'ha dit abans, aquestes condicions són òptimes per a atrapar intermediaris concrets, pel qual obtindrem espectres de diferència per a M_1 i M_2 i podrem comparar-los, amb la idea de poder aportar més proves que suportin o rebutgin l'existència de canvis conformacionals entre ambdós subintermediaris, tant en WT com en els diferents mutants.

Diferències entre M_1 i M_2 .

En el debat sobre el mecanisme de *switching* que impedia en transport de protons en sentit invers, hi havia dades contradictòries sobre el paper dels canvis conformacionals. Nosaltres podem aportar els experiments de FTIR i comparar els espectres en condicions d'atrapar M_1 i M_2 i veure si aporten proves a favor d'un model o altre.

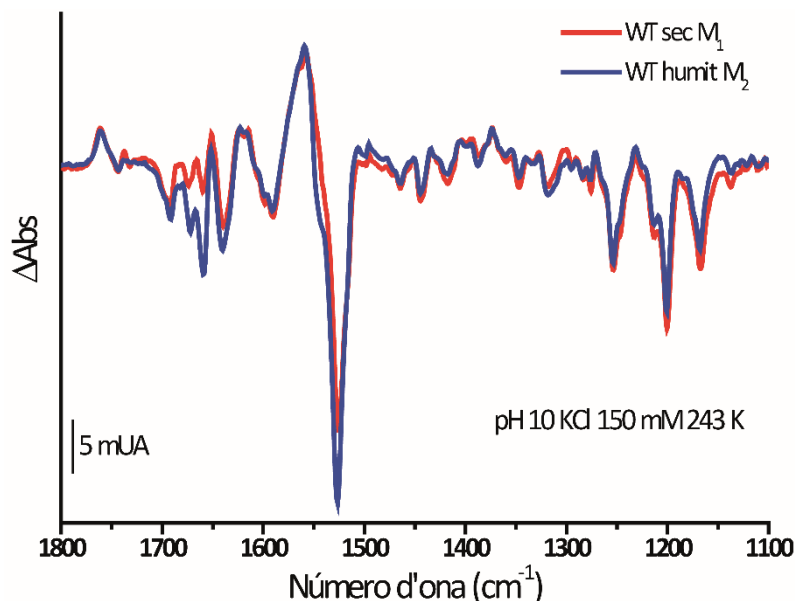


Fig. 85. Espectres de diferència de WT a pH 10 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 respectivament.

A la figura anterior es comparen espectres de dos de les condicions que atrapen M_1 i M_2 en WT. Les úniques diferències que es veuen són atribuïbles a variacions en la línia base i per la resta les bandes tenen la mateixa forma i intensitat i estan situats en el mateix número d'ona. Sabent que són dos subintermediaris diferents amb FTIR no es veuen diferències estructurals.

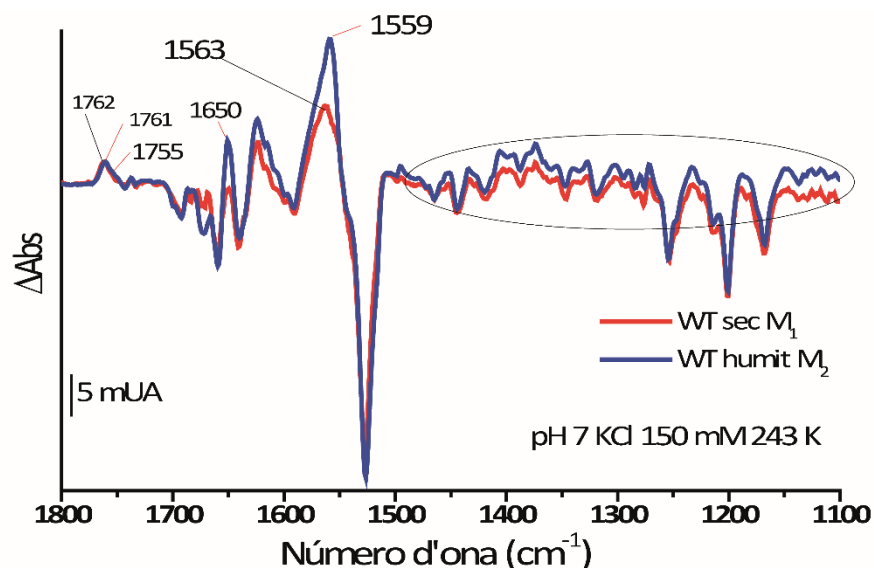


Fig. 86. Espectres de diferència de WT a pH 7 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 respectivament.

En canvi, en condicions per atrapar també M_1 i M_2 però a pH 7 si que es veuen diferències. Deixant d'una banda la zona marcada amb un cercle, diferències degudes a una variació en la línia base, hi ha algunes diferències estructurals entre l'intermediari M_1 i el M_2 . En M_2 la banda d'absorció del Asp85 protonat mostra un colze en 1.755 cm^{-1} que s'assigna a Asp85 protonat en entorn N, indicant que l'entorn del Asp85 ja sofreix canvis en el pas entre els dos subintermediaris de M. La banda de M_2 positiva situada en 1.650 cm^{-1} és més intensa que en M_1 però si no va acompanyada d'una intensa banda negativa en 1.670 cm^{-1} no indica canvi d'intermediari a N. La banda de l'Amida II en M_1 està situada en 1.563 cm^{-1} i en M_2 està en 1.559 cm^{-1} i és més intensa, el que suggereix que en el primer cas els canvis deguts a la vibració C=C del retinal són més importants i en el segon cas prenen importància canvis en l'N-H de la proteïna.

De moment aquests resultats suggeririen que els resultats variarien amb el mètode i les condicions utilitzades.

Estudi dels espectres de diferència del doble mutant V101C/M163C:

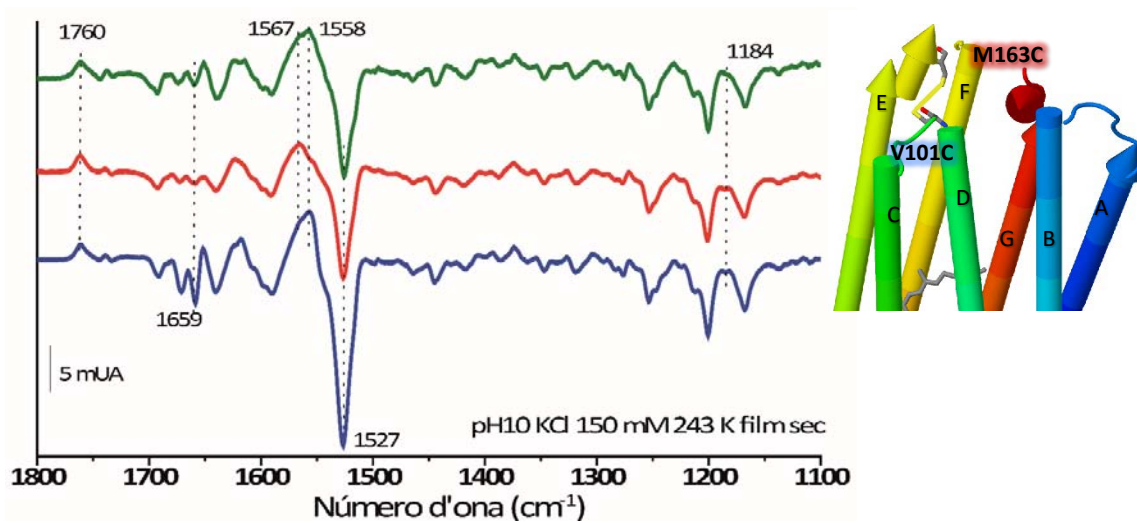


Fig. 87. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K (-30° C) de WT (verd), V101C/M163Cred (vermell) i V101C/M163Cox (blau). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 . L'asterisc vermell marca les principals diferències. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

A la Fig. 87. veiem els espectres de diferència de FTIR del mutant V101C/M163Cred, el V101C/M163Cox i WT. En aquestes condicions, pH 10, 243 K i film sec, en WT s'atrapa l'intermediari M_1 , tal com es pot veure si ens fixem en les bandes més característiques de l'espectre: hi ha una banda positiva a 1.760 cm^{-1} deguda a la vibració del grup C=O del Asp85 protonat en entorn de M. A 1659 cm^{-1} hi ha una banda negativa associada a canvis en les hèlix, el pic positiu de 1.567 cm^{-1} degut a la vibració de C=C de retinal i la forma del pic a 1184 cm^{-1} .

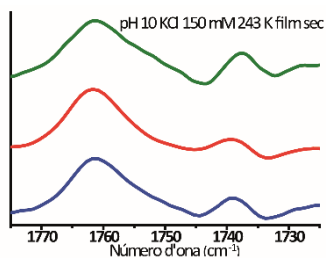


Fig. 88. Ja que la banda de 1184 cm^{-1} està al límit de la línia base, podríem dubtar de si està en forma M o N. Si estigués en N hi hauria una banda negativa en 1.742 cm^{-1} corresponent al Asp96 desprotonat. Com es veu a la figura, la banda als mutants està com en WT, el Asp96 encara està protonat i l'intermediari atrapat és el M.

En els mutants veiem alguns canvis. En la forma reduïda (vermell), en la zona d'Amida I les bandes són molt petites, el que indicaria que els canvis estructurals en les hèlixs durant el fotocicle són més petits en el mutant reduït. La banda corresponent a la vibració C=C del retinal apareix amb un colze més pronunciat que en WT a 1.567 cm^{-1} . La banda situada en 1.558 cm^{-1} no és "pura" sembla la combinació de canvis en l'absorció tant en 1.558 com en 1.567 cm^{-1} , que d'acord amb la Taula 11 corresponen a l'Amida II de la proteïna i a la vibració C=C del retinal respectivament. Al mutar ens residus la predominança de les bandes s'inverteix.

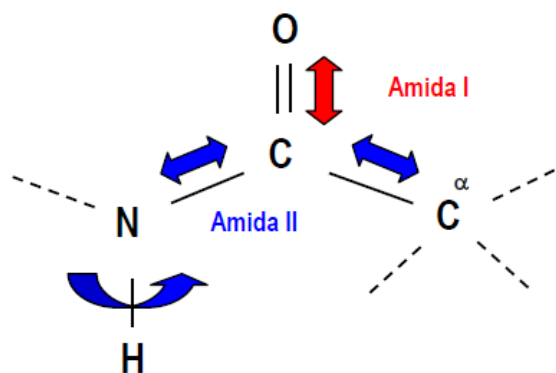


Fig. 89. Representació dels diferents enllaços del grup peptídic la vibració dels quals participa en l'absorció de l'Amida I i de l'Amida II [298].

En la forma oxidada del mutant la regió d'Amida I presenta bandes més intenses que en WT, degudes a canvis accentuats en les hèlixs. A més la banda situada en 1.558 cm^{-1} és una mica més pronunciada que en WT. La resta de bandes són molt similars tant al mutant reduït com a WT.

Les diferències que s'observen en l'espectre de V101C/M163Cred ens diuen que les mutacions puntuals introduïdes tenen petits efectes en el fotocicle. Aquests efectes serien una disminució en els canvis en hèlixs i menors canvis en l'Amida II. Al reduir el moviment relatiu entre l'hèlix C i el bucle EF (mutant oxidat) l'intermediari que s'atrapa és com WT. Açò està en consonància amb les dades de fotòlisi de llampec, que mostren un intermediari M_2 (segon component en la formació de M) més lent que en WT, pel que s'espera que en els mutants estigui encara més afavorit atrapar M_1 . De moment, sembla que en l'intermediari M_1 la restricció del moviment relatiu entre l'hèlix C i el bucle EF no ha afectat al fotocicle ni a l'estructura del subintermediari i a més aquesta restricció ha contrarestat l'efecte de substituir la Val101 i la Met163 per cisteïnes.

A continuació estudiem el doble mutant en films humits a pH 10 i 243 K, el que deuria atrapar l'intermediari M_2 que ens mostrarà els canvis produïts entre aquest intermediari i l'estat basal.

A la Fig. 90 i en color verd veiem l'espectre de WT en les condicions abans mencionades, adequades per a atrapar l'intermediari M_2 . Si comencem comparant la zona dels grups carboxils de les cadenes laterals ($1.800\text{-}1.700\text{ cm}^{-1}$), veiem que la banda que corresponia al Asp85 protonat la trobem a 1.760 cm^{-1} , el que ens indica que es troba en un entorn d'intermediari M. Si ens fixem en la banda de WT i V101C/M163Cred veiem que hi ha una banda en 1.756 cm^{-1} que solapa parcialment formant un colze, indicant que part de les molècules tenen el Asp85 protonat en un entorn atribuïble a N. Com ho trobem també a WT ho interpretarem com una característica de M_2 i aleshores el fet remarcable és la seva absència en el doble mutant oxidat.

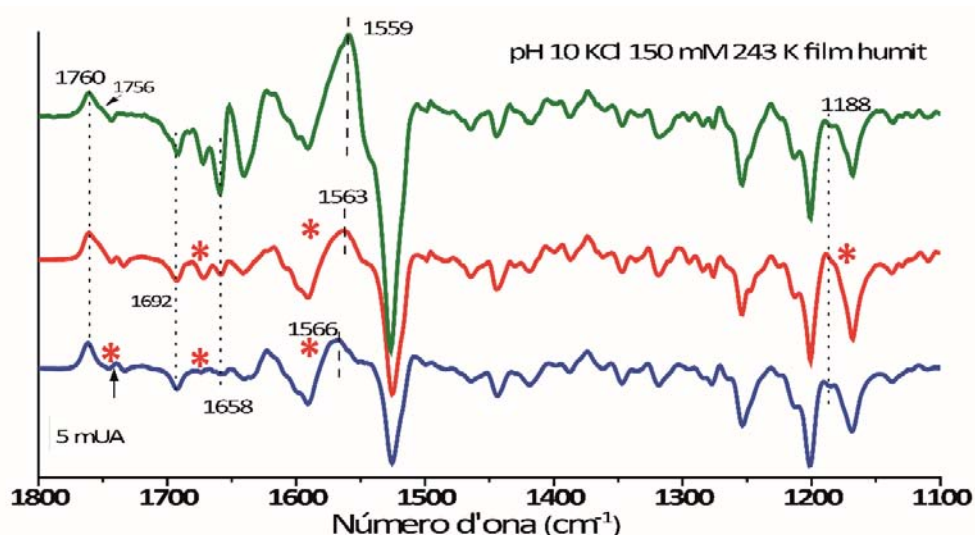


Fig. 90. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K (-30° C) de WT (verd), V101C/M163Cred (vermell) i V101C/M163Cox (blau). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₂. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

A números d'ona una mica menors trobem en les tres mostres la petita banda negativa a 1.742 cm⁻¹ que correspon al Asp96 pertorbat en M o desprotonat en N, una petita banda positiva en 1.738 cm⁻¹ assignable a Asp115 pertorbat tant en M com en N i en WT ja no podem distingir més bandes. En canvi, en els mutants es veu clarament la petita banda negativa en 1732 cm⁻¹ corresponent a la pertorbació del Asp115 en M i en N.

En la regió de l'Amida I (1.700-1.600 cm⁻¹) en WT veiem les bandes característiques de M, que són la banda negativa de 1658 cm⁻¹ i l'absència d'una gran banda negativa en 1.670 cm⁻¹. També està la banda negativa de 1692 cm⁻¹ corresponent a girs reversos característics de M i N. Aquesta última banda es veu clarament en les tres mostres mentre que les altres estan fortament disminuïdes en la mostra reduïda i són pràcticament inexistentes en l'oxidada. En les bandes corresponents a l'Amida II i C=C del retinal trobem en les tres mostres la banda negativa principal en 1.527 cm⁻¹ característica de M i N. En WT veiem una banda positiva en 1.559 cm⁻¹, que atribuirem a M₂ i estaria entre la típica de 1.564 cm⁻¹ deguda a la vibració C=C del cromòfor en M₁ i la de 1.555 cm⁻¹ deguda a C=C del cromòfor i N-H de la proteïna en N. En V101C/M163Cox la banda està en 1566 cm⁻¹ com en M i en el mutant reduït es troba lleugerament desplaçada, en 1.563 cm⁻¹.

L'espectre de FTIR indica que en WT el retinal està en conformació *13-cis* i la Base de Schiff està encara desprotonada, ja que la banda de 1188 cm⁻¹ no supera la línia base. En el mutant oxidat passa igual però en el reduït aquesta banda és una mica més pronunciada, indicant que part de les molècules tenen la BS protonada i el que es veu és una mescla d'ambdues situacions.

Resultats i Discussió: Part 1

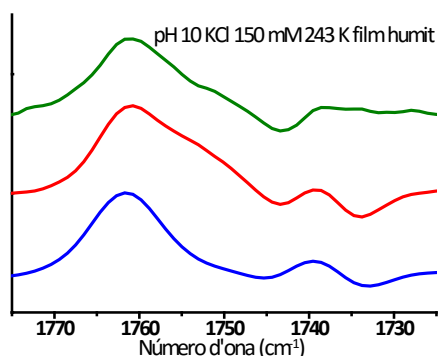


Fig. 91. El colze de la banda situada en 1.762 cm^{-1} és molt més gran en V101C/M163Cred que en WT i la banda negativa en 1.742 cm^{-1} és més pronunciada en el mutant reduït que en l'oxidat, recolzant la proposta de que en el doble mutant en condicions reductores part de les molècules queden atrapades en N.

Comparant amb WT com a exemple de M_2 , hem vist que la fixació de les hèlix ha afectat a l'entorn del Asp85, mantenint-lo com en M_1 . Les mutacions de Val101 i Met163 per si soles han causat alguns canvis, com l'accentuació de la pertorbació del Asp115 o que canvis entre els d'hèlixs α_I i α_{II} es veuen disminuïts. Els canvis en les hèlixs són encara menors, per no dir inexistents, quan es fixen les hèlixs, el que indica que encara que Val101 i Met163 són importants en els canvis d'estructura de les hèlixs durant el fotocicle, la restricció del moviment d'aquestes ja ho impedeix del tot. Per contra, hem vist que els girs reversos no es veuen afectats per les mutacions ni per la restricció del moviment de les hèlixs.

En M_2 es van produir canvis en l'Amida II, en l'enllaç N-H de la proteïna i aquests canvis no es veuen en els mutants a causa de les mutacions. El mutant reduït mostra un petit desplaçament respecte a l'oxidat de la banda positiva en 1566 cm^{-1} , suggerint que en el mutant reduït sí que es comencen a produir els canvis i que aquests són completament anul·lats per la restricció de les hèlixs. Aquesta banda també està parcialment influït per la vibració dels C=C del retinal. Degut al solapament de les bandes, ens podem fixar en la banda negativa de 1.527 cm^{-1} , també deguda a l'enllaç C=C, però de la seva desaparició respecte a BR. El que veiem és que la banda és menor, sobretot en l'oxidat. Com els espectres estan normalitzats per la banda de 1.201 cm^{-1} per a igualar la senyal al mateix nombre de molècules, es pot assegurar que aquesta disminució de la intensitat no es deu a que entrin menys molècules en el fotocicle.

En aquestes condicions hem vist que el comportament del retinal en els mutants és molt semblant a WT. La mutació dels residus ha afectat als canvis en l'Amida I reduint-los, ja sigui perquè no tenen lloc o perquè són permanents i per tant no es veuen canvis. En la regió dels grups carboxílics veiem que les bandes són bastant semblants i el petit colze en 1.756 cm^{-1} que veiem en el mutant reduït recolza la idea que hem extret de la forma de la banda situada en 1188 cm^{-1} , que era que part de les molècules serien atrapades en la forma N, concretament la part afectada seria l'entorn del retinal (BS i Asp85).

A continuació veurem els espectres quan canviem de temperatura. Treballant amb films secs, a pH 10 i 277 K obtenim els espectres de diferència entre l'estat basal i l'intermediari M_1 .

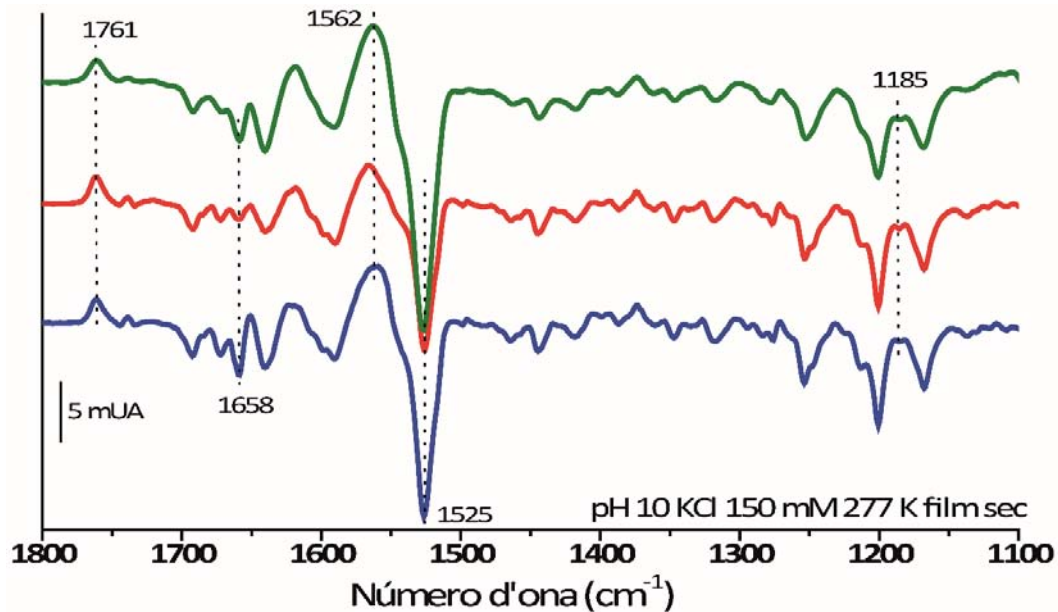


Fig. 92. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K (4^o C) de V101C/M163Cred (**vermell**), V101C/M163Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Tal com veiem a la figura, en aquestes condicions els espectres dels mutants són molt semblants al de WT. Es veuen petites diferències com per exemple la petita banda positiva en 1.738 cm^{-1} es veu més marcada en els mutants que en WT, indicant una major pertorbació del Asp115; la banda positiva que en WT està en 1.562 cm^{-1} en el mutant reduït està desplaçada 3 cm^{-1} cap a números d'ona majors, indicant una petita pertorbació en l'enllaç C=C del retinal, i la banda de 1185 cm^{-1} del retinal 13-*cis* i BS desprotonada en el mutant oxidat la banda és major, aproximant-se a com seria en M_2 . Com es veu en aquestes condicions les diferències causades per les mutacions i per la fixació de les hèlix és quasi nul·la.

De les diferents condicions amb les que treballem en FTIR, l'única que atrapa l'intermediari N en WT es pot veure a la figura 87. Estan indicades les diferents bandes que són característiques de l'intermediari N:

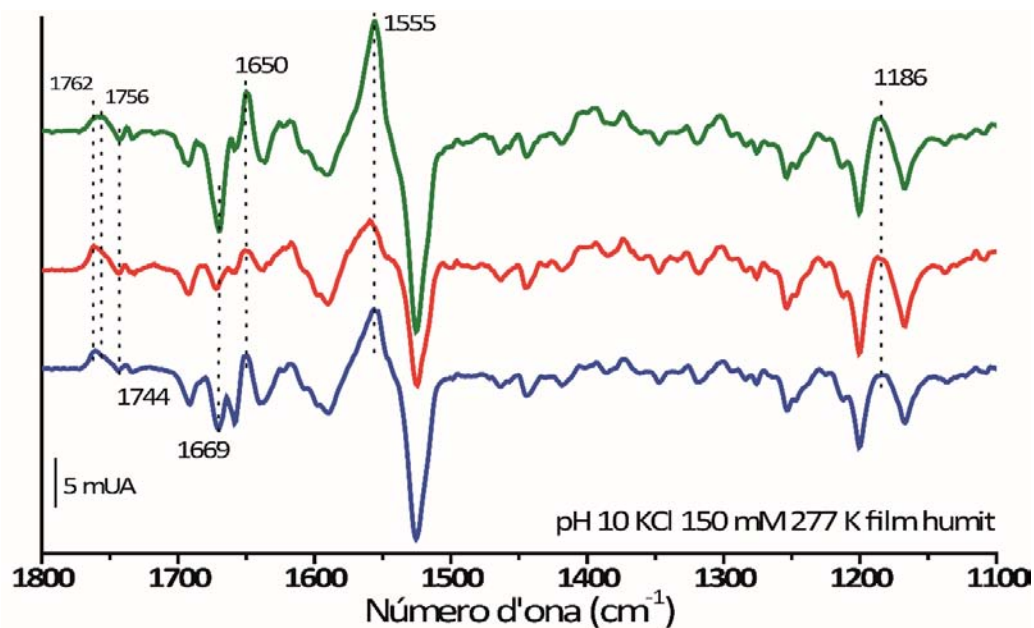


Fig. 93. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K de V101C/M163Cred (vermell), V101C/M163Cox (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari N. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Als espectres dels mutants trobem les mateixes bandes però amb algunes diferències. La banda negativa situada en 1669 cm^{-1} i la positiva de 1.650 cm^{-1} , causades per canvis en les hèlix durant l'intermediari N, està a les tres mostres però són significativament menys intenses als mutants, sobretot en el cas del mutant reduït que presenta la banda de 1.650 cm^{-1} més petita que el mutant oxidat. La banda positiva en 1.555 cm^{-1} en N és estreta i pronunciada en WT, mentre que en els mutants encara que també està situada a 1.555 cm^{-1} la forma varia lleugerament sent, sobretot en el reduït, semblant a la forma en M.

Una altra banda molt característica de N la trobem en 1.186 cm^{-1} és positiva i supera la línia basen indicant que el retinal està en la conformació *13-cis* i que la BS està protonada. En els mutants la banda està present però no queda clar si supera la línia base, indicant que la BS podria estar encara desprotonada.

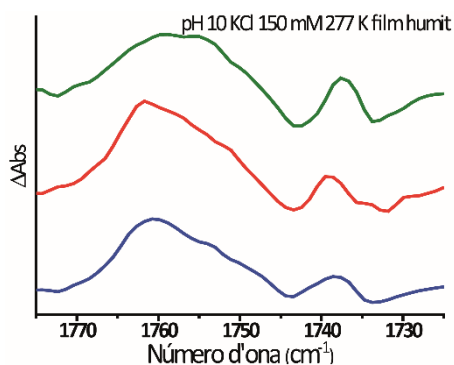


Fig. 94. De nou anem a observar l'espectre en la zona del les cadenes laterals dels grups carboxílics per a intentar definir l'intermediari atrapat en els mutants. La banda positiva de 1.186 cm^{-1} feia dubtar de si els mutants estaven atrapats en l'intermediari M o N ja que la banda quedava molt propera a la línia base. La banda en 1.756 cm^{-1} en els mutants és una mica menys pronunciada i la banda negativa de 1.742 cm^{-1} en el reduït és quasi com en WT però en l'oxidat és menys pronunciada.

Comparant els espectres de FTIR de WT i els mutants es veu que l'espectre dels mutants presenta característiques atenuades de N i algunes de M. A la zona de l'Amida I dels mutants veiem bandes de N però d'intensitat menor que en WT, indicant que els canvis estructurals en N estan disminuïts per les mutacions.

En quant a bandes relacionades amb la butxaca d'unió del retinal, no veiem diferències entre el mutant reduït i l'oxidat, però si que en veiem en l'Amida I. Sembla que la mutació puntual dels residus afecta als canvis en les hèlix i que la formació del pont disulfur restaura lleugerament els moviments típics de N. D'acord amb totes aquestes observacions, el mutant reduït sembla que queda atrapat en una mescla de poblacions. Les bandes corresponents a canvis estructurals indiquen intermediari M però les de la BS i el Asp96 indiquen que hi ha una mescla de M i N. Aquestes dos característiques, estructura en M i retinal en mescla M i N suggeriria que s'atrapa en la forma N_M . L'oxidat, al contrari que el reduït, presenta un entorn del retinal atrapat majoritàriament en la forma M i canvis en les hèlixs que tendeixen a la forma N, quedant atrapat una espècie d'intermediari M_N . La mutació dels residus V101 i M163 ha afectat al pas de l'intermediari M al N descoordinant temporalment els canvis en l'entorn del retinal amb els estructurals. Al fixar les hèlixs, els canvis estructurals no es produïen del tot fent que la BS i el Asp96 romanguessin com en M.

A més de a pH 10, també s'han fet els experiments amb films a pH 7, tant en condicions d'elevada humitat com baixa. Amb baixa humitat atrapem l'intermediari M_1 .

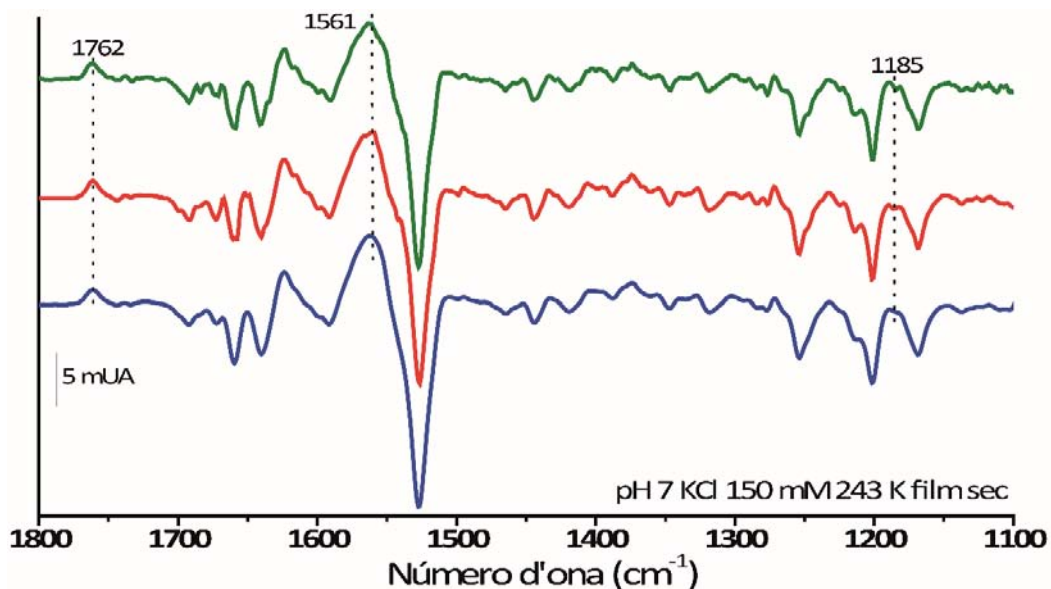


Fig. 95. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i a 243 K de V101C/M163Cred (**vermell**), V101C/M163Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Com s'indicava a la taula de la figura 77, a pH 7 i 243 K en WT l'intermediari atrapat és el M_1 . En aquest cas trobem poques diferències entre WT i els mutants, com a molt

petites variacions en la forma d'alguna banda, pel que es pot dir que ni les mutacions ni la restricció del moviment de les hèlix afecta a l'estructura de la bR ni al fotocicle en aquestes condicions de treball.

L'última de les condicions amb les que treballem és a pH 7, 277 K i film humit.

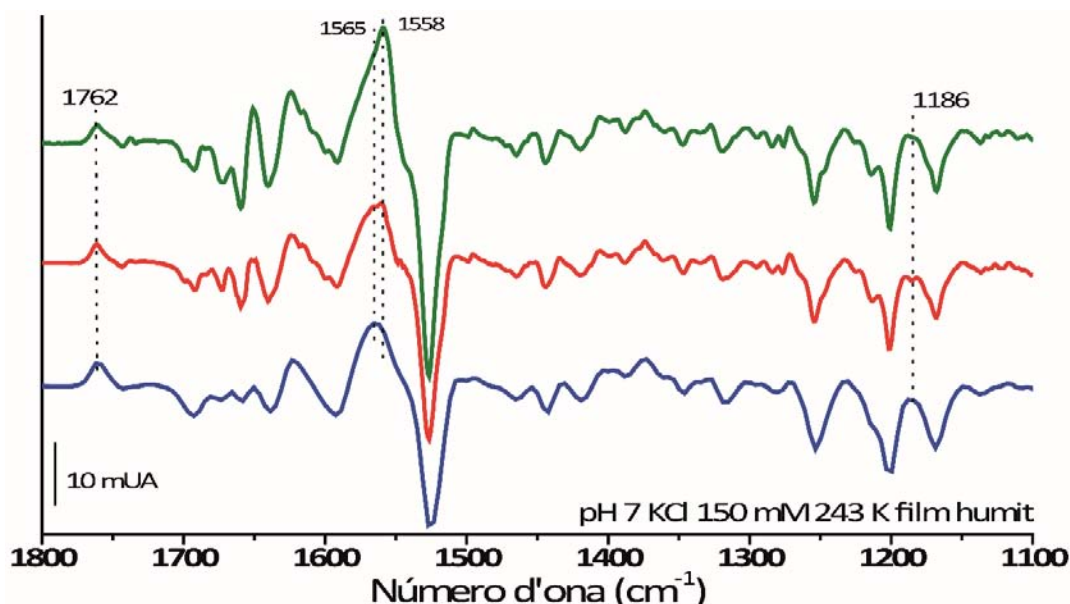


Fig. 96. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i 243 K de V101C/M160Cred (vermell), V101C/M163Cox (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_2 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En aquestes condicions WT queda atrapat en l'intermediari M_2 . Els espectres dels mutants són molt semblants a WT, excepte en la banda positiva que en WT està situada en 1.558 cm^{-1} , la qual en els mutants està lleugerament desplaçada. La banda del mutant oxidat està formada per un pic pronunciat i situada en 1.564 cm^{-1} , número d'ona que correspon amb la vibració C=C del cromòfor en M. En el mutant en condicions reduïdes el pic és més ample, abastant des de 1.564 fins a 1.558 cm^{-1} . La banda de 1.186 cm^{-1} és una mica menys pronunciada en el mutant reduït.

Canvis entre M_1 i M_2 en el doble mutant V101C/M163C.

En WT comparàvem els espectres en aquestes condicions i eren pràcticament iguals. En aquest doble mutant i en condicions reductores es veuen algunes diferències com el petit colze de la banda del Asp85 protonat (asterisc), el canvi d'intensitat i el lleuger desplaçament cap a números d'ona menors en la banda de 1.564 cm^{-1} i la banda situada en 1.187 cm^{-1} que en condicions d'atrapar M_2 està en el límit de BS protonada i desprotonada, suggerint que hi ha una mescla d'ambdues.

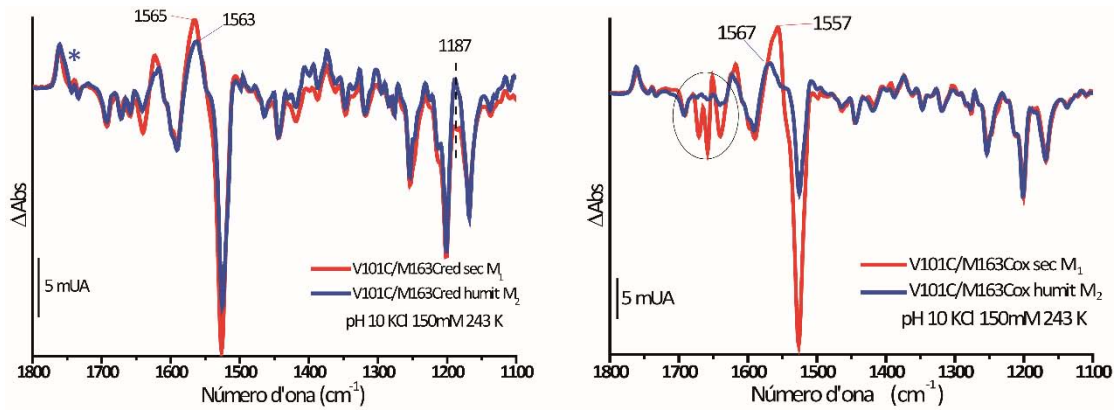


Fig. 97. Espectres de diferència de V101C/M163Cred (esquerra) i V101C/M163Cox (dreta) a pH 10 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M₁ i M₂ en WT.

Quan es restringeix el moviment de les hèlixs es veuen diferències en els canvis en les hèlixs (cercle) i en l'Amida II. Les bandes del retinal i el Asp85 són exactament iguals, no mostren canvis en el centre actiu entre els dos subintermediaris.

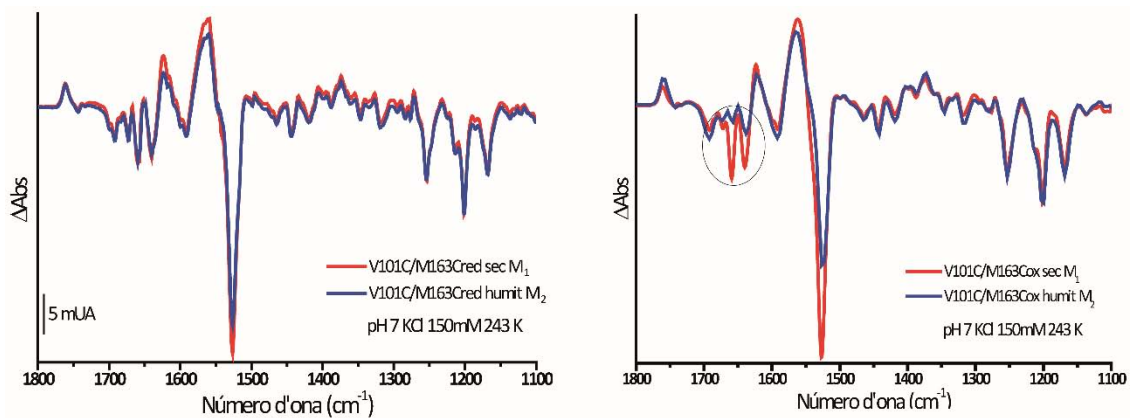


Fig. 98. Espectres de diferència de V101C/M163Cred (esquerra) i V101C/M163Cox (dreta) a pH 7 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M₁ i M₂ en WT.

En aquestes condicions l'espectre de M₁ i de M₂ mostraven algunes diferències però en el cas del doble mutant reduït no es veuen, no hi ha canvis estructurals entre els dos subintermediaris. En el cas del mutant oxidat, les diferències són les mateixes que a pH 10, variacions en les hèlixs que en M₂ no es veuen.

La mutació dels residus ha causat canvis entre els espectre de diferència de M₁ i M₂ a pH 10 i els ha anul·lat a pH 7. La formació del pont disulfur ha reduït els canvis en les hèlix que es veien a l'intermediari M₂ tant a pH 10 com a pH 7. Sembla que el moviment relatiu de l'hèlix C i el bucle EF és important per al manteniment de l'estructura normal en M₂.

T157C/K172C

El segon mutant doble citoplasmàtic estudiat és el T157C/K172C i comencem pels espectres de diferència de FTIR amb mostra preparada a pH 10 i films secs a 243 K.

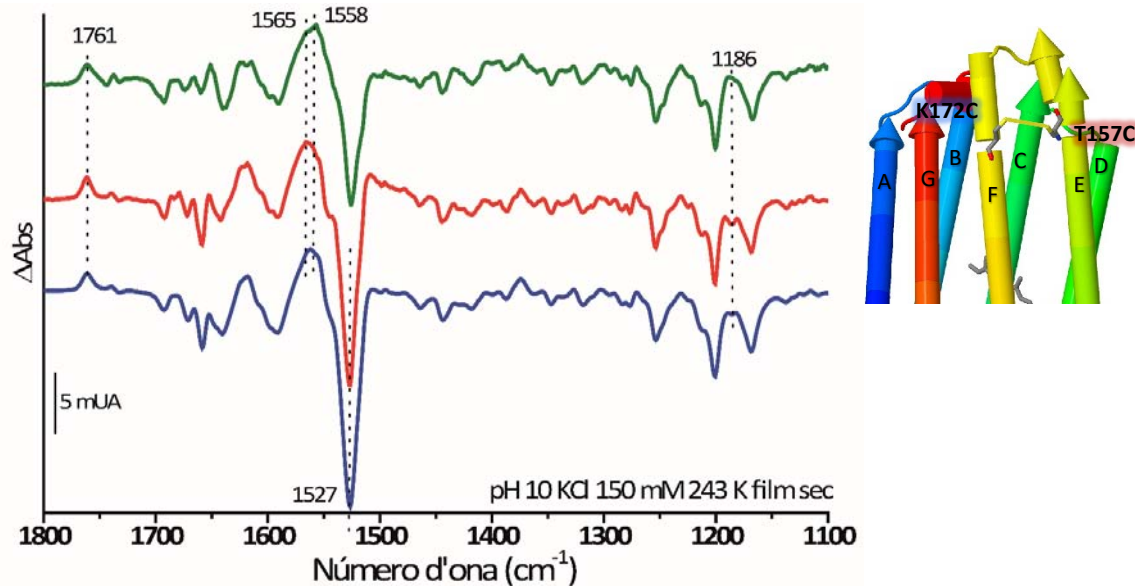


Fig. 99. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K de T157C/K172Cred (**vermell**), T157C/K172Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₁. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

En tots tres casos la mostra queda atrapada al mateix intermediari, el M₁, tal com ho indiquen les bandes en 1.761 cm⁻¹, que mostra Asp85 protonat en entorn M; la banda en 1.564 cm⁻¹, corresponent al cromòfor en M, i la banda 1.186 cm⁻¹ que té la forma corresponent a M, amb BS desprotonada.

Encara que en general l'espectre dels mutants és semblant al de WT, hi trobem algunes diferències. La banda positiva situada en WT en 1.564 cm⁻¹ en el mutant T157C/K172Cox el màxim està desplaçat 4 cm⁻¹ cap a números d'ona menors, el que suggereix que la fixació de l'extrem de les hèlix afectaria a l'enllaç C=C del cromòfor o causaria petits efectes en l'enllaç N-H de la proteïna, com els que es produeixen en N.

La banda de 1.186 cm⁻¹ en M típicament es troba com la veiem en WT. En el mutant reduït la depressió típica que veiem dins de la banda és menys pronunciada i en l'oxidat és quasi nul·la, però mantenint-se per sota de la línia base. La forma d'aquesta banda en T157C/K172Cox junt al lleuger desplaçament de la banda situada en 1.564 cm⁻¹ podrien deure's a que encara que una part majoritària de les proteïnes són atrapades en M₁, part d'elles són atrapades en M₂ degut a una lleugera acceleració del fotocicle, en concret a una més ràpida reorientació del retinal, assumint que M₁ i M₂ es diferencien tal i com hem vist amb els espectres de WT a pH 7.

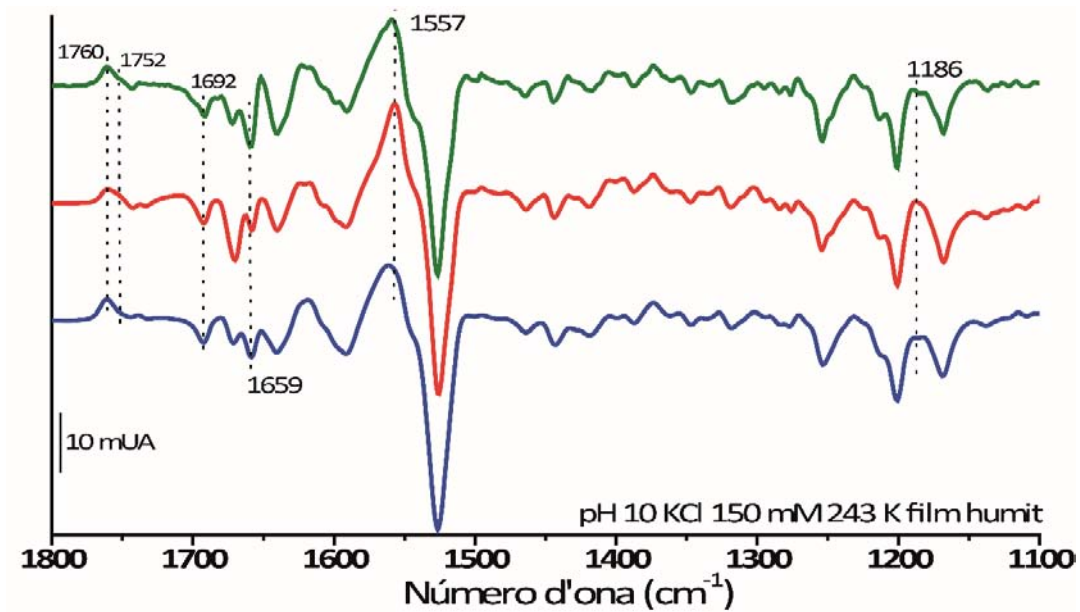


Fig. 100. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K de T157C/K172Cred (vermell), T157C/K172Cox (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s’afavoreix l’acumulació de l’intermediari M₂. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

L’espectre del mutant reduït és semblant als de l’intermediari N en la proporció de les bandes en 1.670 cm⁻¹ i 1.650 cm⁻¹, en la banda positiva situada en 1.555 cm⁻¹ i en la de 1.186 cm⁻¹ que no queda clar si supera o no la línia base. Tant WT com T157C/K172Cox s’han atrapat en M.

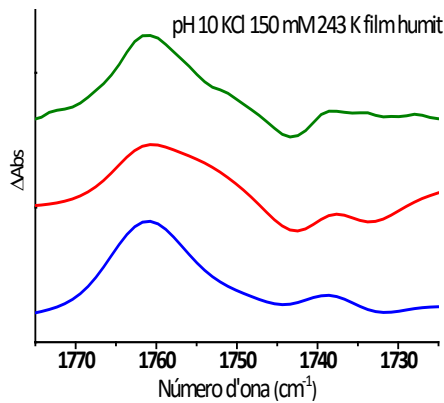


Fig. 101. Per a comprovar l’intermediari en que T157C/K172Cred queda atrapat, observem l’absorció de les cadenes laterals dels grups carboxílics. El reduït presenta un colze en 1.755 cm⁻¹ però molt menor a com és en N i la banda negativa en 1.742 cm⁻¹ on es veuria si el Asp96 està desprotonat és com WT en M, Asp96 protonat.

Les mutacions puntuals han causat una acceleració en els canvis estructurals però sense afectar l’estat de protonació dels grups implicats en el transport dels protons. La fixació de les hèlixs en aquestes condicions ha fet que el mutant recuperi el comportament de WT.

Resultats i Discussió: Part 1

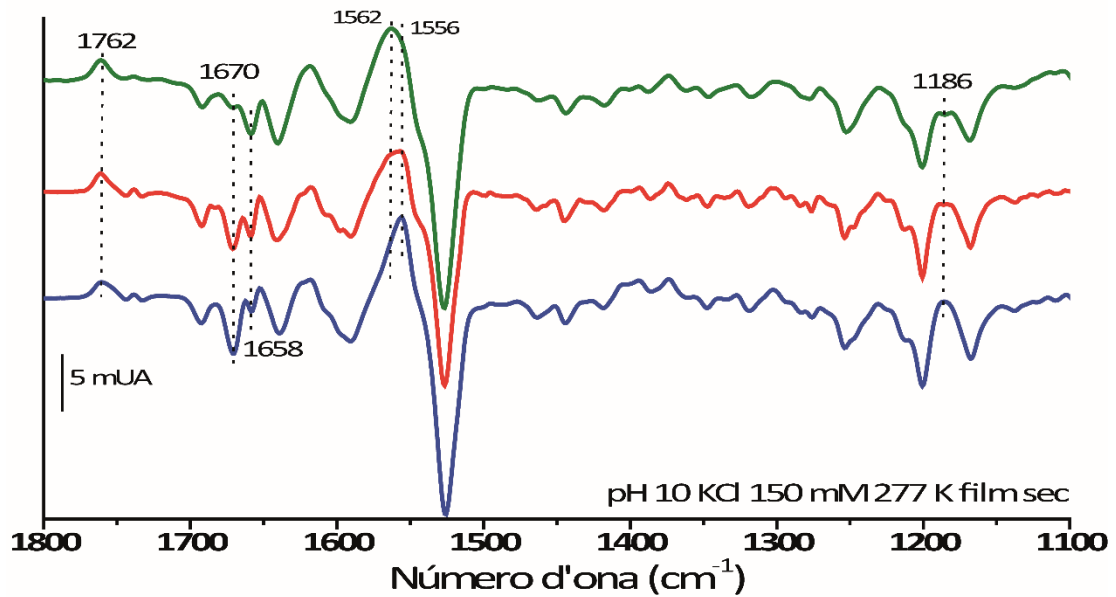


Fig. 102. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K de T157C/K172Cred (vermell), T157C/K172Cox (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Amb films secs, pH 10 i 277 K en WT s'atrapa M_1 . En aquestes condicions l'espectre de WT i el mutant reduït són molt semblants, exceptuant algunes bandes en Amida I com la banda negativa de 1.670 cm^{-1} , que és característica de canvis en les hèlixs en N; la banda en 1.562 cm^{-1} que abasta quasi fins a 1.557 cm^{-1} , indicant alguns canvis en Amida II típics de N, i la banda en 1.186 cm^{-1} que és una mica més pronunciada. En aquest cas, les mutacions puntuals han causat l'acceleració de canvis estructurals de les hèlix.

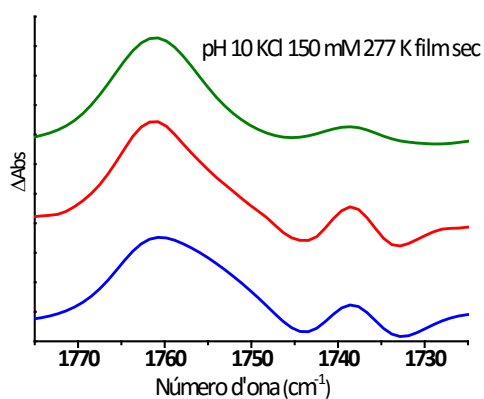


Fig. 103. La mostra oxidada presenta el colze en 1.755 cm^{-1} però no la banda negativa de 1.742 cm^{-1} que indicaria Asp96 desprotonat. Per tant considerarem que el mutant oxidat està atrapat en M però amb alguns canvis típics de N.

La restricció del moviment de les hèlix amb la formació del pont disulfur ha causat canvis considerables a més dels abans esmenats. L'espectre del mutant oxidat té bandes típiques de N en amida I més pronunciades. La restricció del moviment de les hèlix induïx una acceleració del mecanisme de "switch" (d'interruptor), que es produeix en el pas del M_1 al M_2 i garanteix la irreversibilitat i direccionalitat del procés de transport de protons.

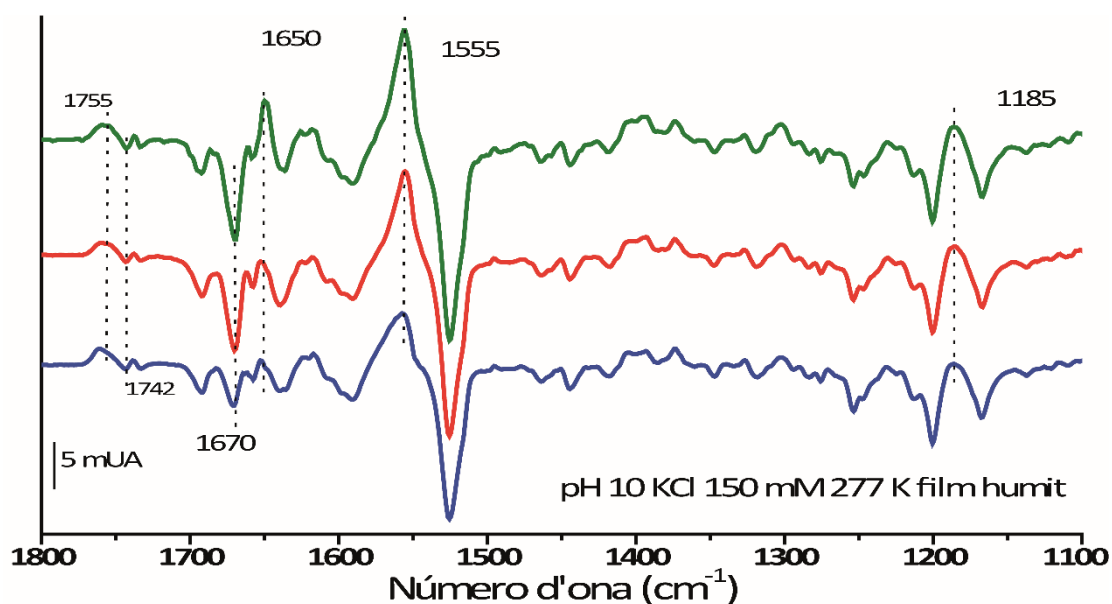


Fig. 104. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K de T157C/K172Cred (vermell), oxidat (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'ha afavorit l'acumulació de l'intermediari N. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Les condicions de treball esmentades a la figura 98 fan que WT quedi atrapat en N i així en l'espectre podem veure les bandes característiques en 1.755 , 1.670 , 1.555 i 1185 cm^{-1} . El mutant reduït, amb el moviment de les hèlixs sense constrènyer, queda atrapat també en N, encara que les mutacions han afectat a canvis en les hèlix que es veien per la banda positiva, ara de menor intensitat, situada en 1.650 cm^{-1} .

La fixació de les hèlix ha causat una alteració en el fotocicle, tal com es veu en la menor intensitat de la banda situada en 1185 cm^{-1} , que a penes supera la línia base; en que la banda positiva en 1.555 cm^{-1} és menys pronunciada; que el Asp85 es troba protonat sobretot en un entorn M i els canvis en les hèlixs són menors, tal i com es pot inferir per la poca intensitat de les bandes de la zona de l'Àmida I.

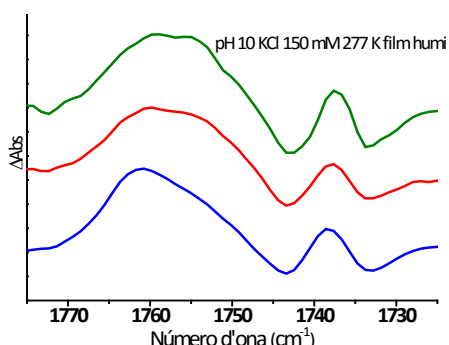


Fig. 105. En el mutant oxidat la banda de 1.755 cm^{-1} és menor, molt similar a com és la del Asp85 en entorn M, però la banda negativa de 1.742 cm^{-1} és almenys com la del mutant reduït i una mica menys pronunciada que la de WT, indicant que el Asp96 s'ha desprotonat. Aquest detall ens confirma que la banda situada en 1.186 cm^{-1} sí que supera la línia base en el mutant oxidat.

En aquestes condicions, la mutació puntual dels residus no ha sigut un obstacle per a la formació de l'intermediari N, mentre que la formació del pont disulfur ha constret els canvis estructurals en hèlixs disminuint a més les bandes degudes a la desprotonació del Asp96.

Resultats i Discussió: Part 1

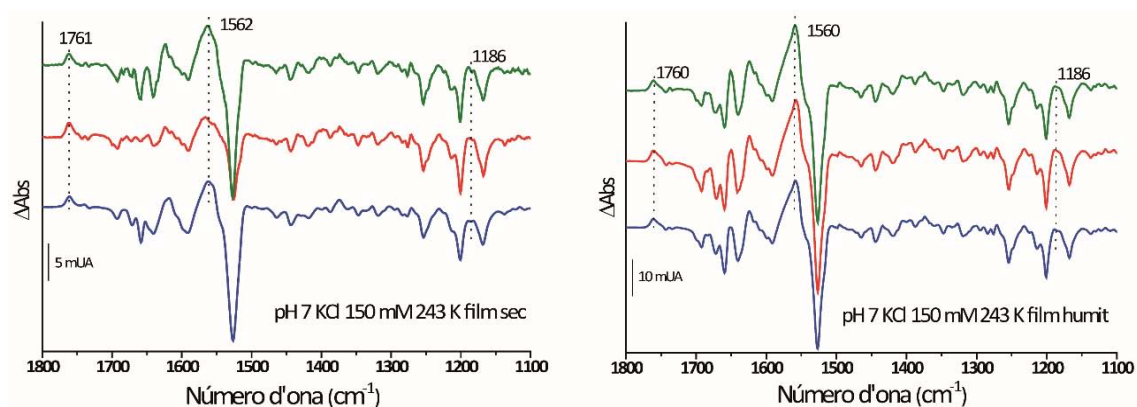


Fig. 106. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs (esquerra) i humits (dreta) en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i a 243 K de T157C/K172Cred (vermell), oxidat (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 i M_2 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Amb les condicions especificades en la figura 100 WT acumula M_1 , al igual que els mutants. En el mutant reduït, però, les bandes d'amida I i II són més petites o inexistentes en alguns casos.

Amb films humits, pH 7 i 243 K no es veuen grans diferències entre WT i els mutants, atrapats en M_2 i amb les bandes més característiques iguals. En aquestes condicions ni les mutacions ni la restricció del moviment de les hèlixs ha causat canvis, ni estructurals ni en el fotocicle.

Canvis entre M_1 i M_2 en el doble mutant T157C/K172C.

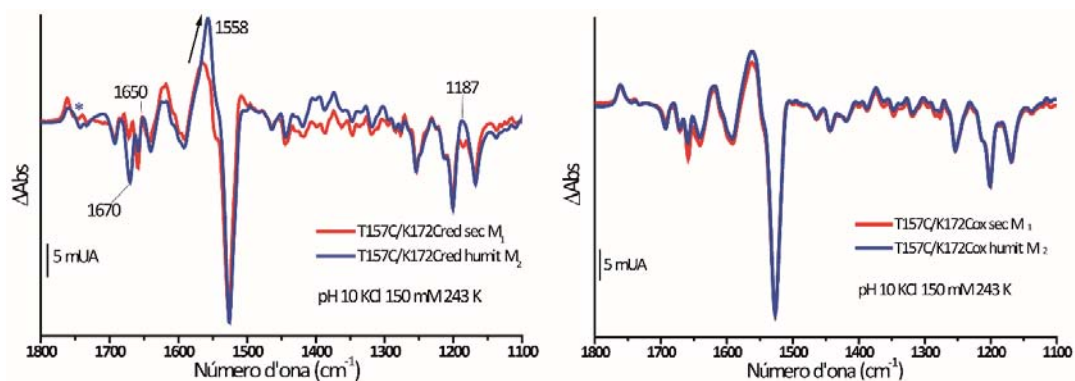


Fig. 107. Espectres de diferència de T157C/K172Cred (esquerra) i T157C/K172Cox (dreta) a pH 10 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 .

La mutació dels residus T157 i K172 per cisteïnes no ha alterat l'espectre en condicions per a atrapar M_1 , però en condicions per a atrapar M_2 i a diferència de WT sí que hi ha canvis. La proporció entre les bandes situades en 1.670 i 1.650 cm^{-1} és semblant a N, mentre que el desplaçament i agudització de la banda positiva de l'Amida II i que la banda situada en 1.187 cm^{-1} arriba fins a la línia base suggereixen que, o bé el fotocicle s'ha accelerat i s'atrapa una mescla de N i M o bé l'intermediari M_2 és

estructuralment diferent al M_1 . Per altra banda, la fixació de l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix E amb l'hèlix F impedeix aquests canvis mantenint idèntica l'estructura dels dos subintermediaris. Si la restricció del moviment manté l'estructura com en WT, la doble mutació afectaria en sentit contrari, augmentant la flexibilitat de les hèlix respecte a WT i, de moment, suggerint que no és necessari el moviment relatiu entre les hèlixs E i F per a que els canvis estructurals fins a M_2 es desenvolupin correctament.

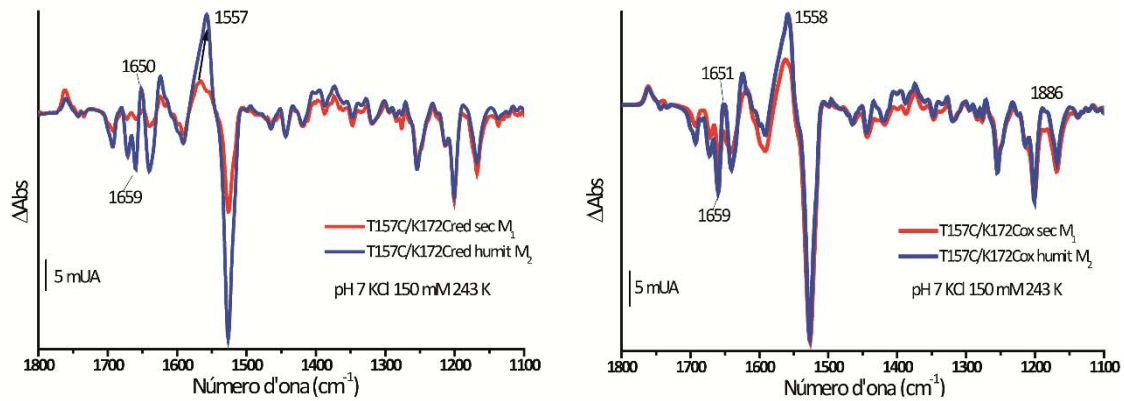
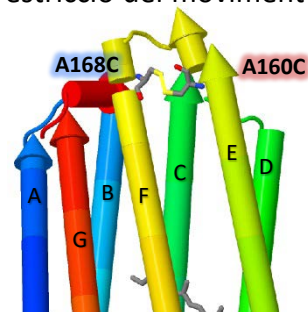


Fig. 108. Espectres de diferència de T157C/K172Cred (esquerra) i T157C/K172Cox (dreta) a pH 7 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 .

En el doble mutant T157C/K172C a pH 7 i sense formar el pont disulfur, els canvis entre M_1 i M_2 són menors que a pH 10. De nou hi ha diferències en la zona de l'Amida I mostrant que en M_1 els canvis en les hèlix són molt petits respecte a WT i en M_2 sí que es produeixen, i aquesta vegada la proporció de les diferents bandes si que correspon a l'intermediari M. Amb la formació del pont disulfur les diferències disminueixen respecte a la versió reduïda, però no respecte a l'oxidada a pH 10. A pH 7 en M_2 els canvis en les hèlixs tenen la forma típica de M però són majors i la banda corresponent a la BS desprotonada és més intensa però es manté per sota de la línia base.

L'estudi dels subintermediaris de M d'aquest mutant indiquen que hi ha diferències entre aquests sobretot en quant als canvis en les hèlixs. La restricció del moviment de les hèlixs disminueix aquests canvis.



A160C/A168C.

En les condicions indicades a la Fig. 109. de l'esquerra, en les tres mostres s'atrapa el mateix intermediari. Els espectres del mutant oxidat i WT no presenten diferències mentre que en el reduït hi ha principalment una: en la regió d'Amida I i II les bandes són menors o nul·les indicant que es produeixen canvis estructurals molt petits entre l'estat basal i l'intermediari atrapat.

Resultats i Discussió: Part 1

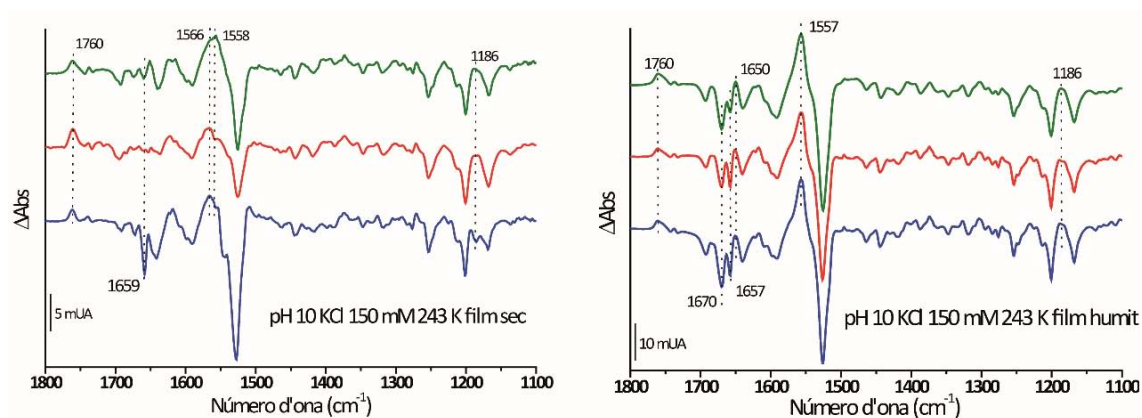


Fig. 109. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs (esquerra) i humits (dreta) en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K de A160C/A168Cred (**vermell**), oxidat (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₁ i M₂ respectivament. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

En les condicions de la dreta WT queda atrapat en l'intermediari M₂ tal i com es pot veure per la banda en 1.760 cm⁻¹. La banda en 1.557 cm⁻¹ està en una posició intermèdia a la típica de M₁ (1.564 cm⁻¹) i a la de N (en 1.555 cm⁻¹ i molt pronunciada), la banda situada en 1.186 cm⁻¹ continua per baix de la línia base indicant BS desprotonada, les bandes de la regió de l'Àmida I són semblants a N però de menor intensitat, els canvis en les hèlix estan encara produint-se, el Asp96 continua protonat i la BS desprotonada.

Els mutants en les dues condicions de treball en general corresponen a intermediari M₂ però amb diferències en la regió de l'Àmida I. A WT hi ha tres bandes que són característiques de M i de N: una banda negativa gran en 1.657 cm⁻¹ indica canvis en les hèlixs típiques de M i aquesta banda petita, una banda negativa en 1.670 cm⁻¹ i una positiva en 1.650 cm⁻¹ comparativament grans a la de 1.657 cm⁻¹ indiquen canvis en les hèlixs de l'intermediari N. En WT no està ni com en M₁ ni com en N, esperable de un intermediari situat entre ambdós. En els mutants la banda negativa 1.657 cm⁻¹ és bastant més gran que en WT, arribant a ser en A160C/A168Cred igual de gran que la banda 1.670 cm⁻¹. La mutació puntual dels residus ha provocat que els canvis en les hèlixs de M₁ perdurin més, solapant-se canvis de M₁ amb canvis que finalitzaran en N. La formació del pont disulfur redueix parcialment aquest efecte, suggerint que la substitució d'alanines per cisteïnes ha augmentat la flexibilitat de les hèlixs i que aquest efecte es contraresta parcialment amb la restricció del moviment pel pont disulfur.

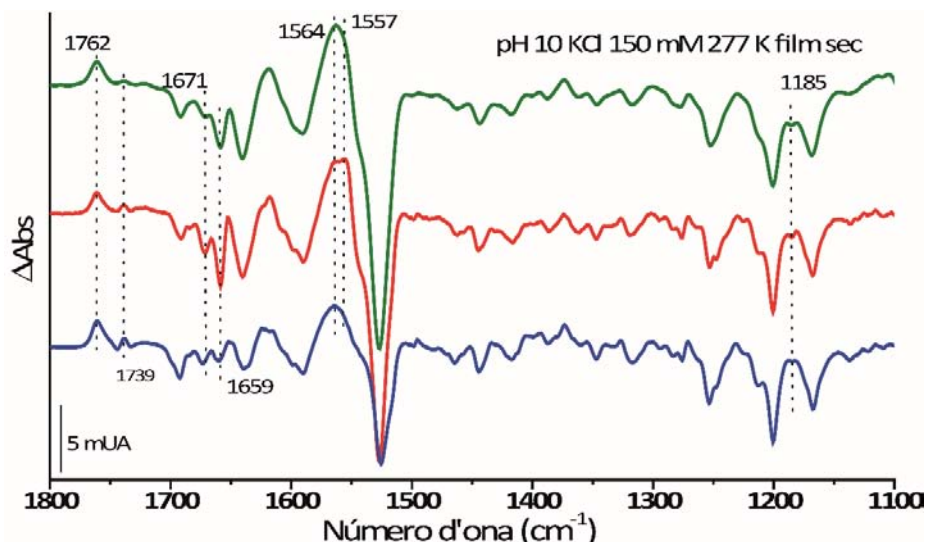


Fig. 110. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K de A160C/A168Cred (**vermell**), oxidat (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 . Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

Com ja hem vist anteriorment, en aquestes condicions WT queda atrapat en M_1 . A la figura 104 podem veure que el mutant A160C/A168Cox també està en aquest intermediari, encara que s'observen algunes diferències sobretot en quant a la intensitat d'algunes bandes. Aquestes bandes serien per exemple la de la vibració C=C del cromòfor en M situada en 1.564 cm^{-1} , que és menys intensa; i la banda negativa en 1659 cm^{-1} , corresponent a canvis en les hèlixs, que és menor.

Aquestes petites diferències que indiquen que la fixació d'aquestes hèlixs dificulten canvis en les hèlixs i disminueix lleugerament el canvi en C=C del cromòfor. Com el doble mutant reduït té un espectre com el de WT aquests canvis, sobretot en les bandes corresponents a canvis en hèlixs, s'han de deure a la fixació del moviment d'aquestes.

Resultats i Discussió: Part 1

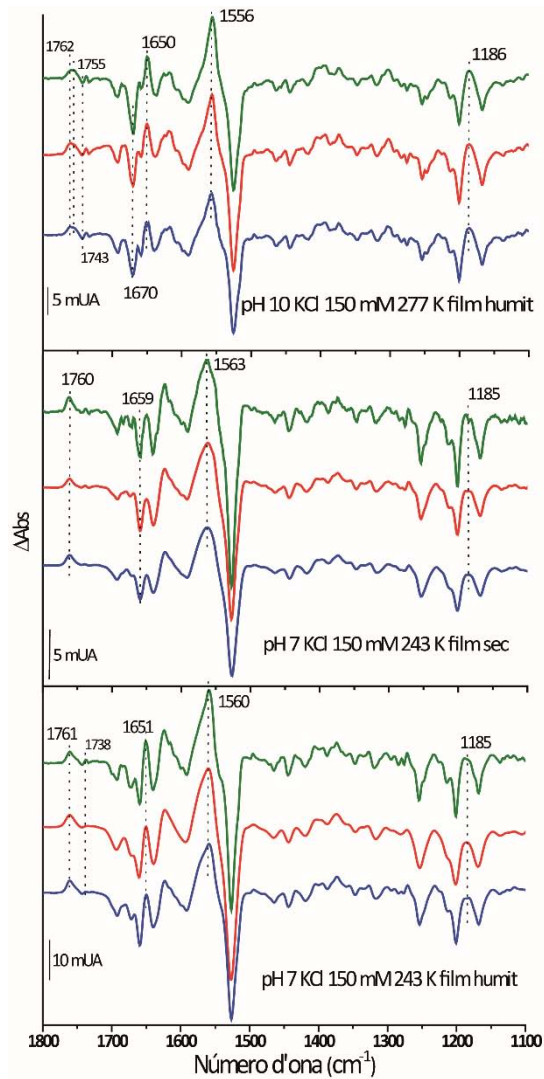


Fig. 111. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits (dalt) en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K i films secs (mig) i humits (baix) en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i a 243 K de A160C/A168Cred (**vermell**), A160C/A168Cox (**blau**) i WT (**verd**). S'afavoreix l'acumulació de l'intermediari N, M₁ i M₂ respectivament. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En totes tres condicions de treball WT i els mutants reduït i oxidat mostren intermediari que s'espera, tal com es pot veure per les bandes característiques senyalades. En aquestes condicions, ni les mutacions ni la restricció del moviment de les hèlix E i F afecta a l'estructura i fotocicle de la bR.

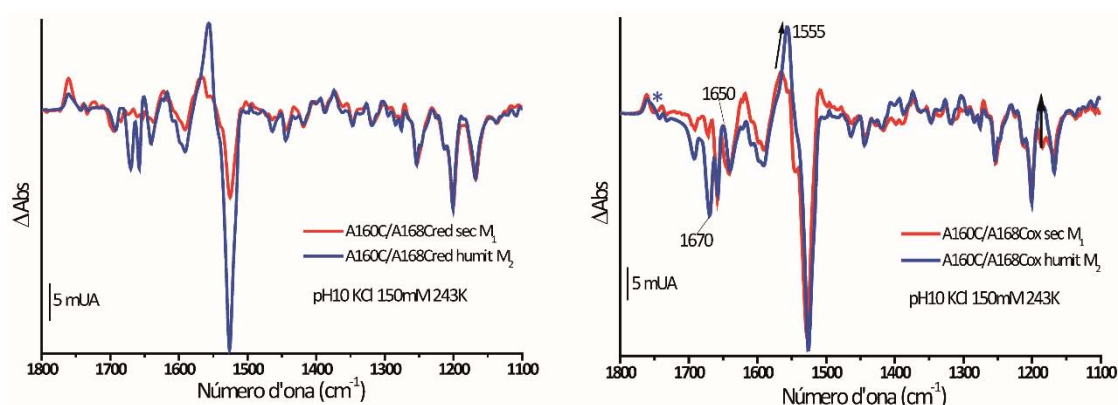
Canvis entre M_1 i M_2 en el doble mutant A160C/A168C.

Fig. 112. Espectres de diferència de A160C/A168Cred (esquerra) i A160C/A168Cox (dreta) a pH 10 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 en WT.

Els canvis entre el subintermediari M_1 i el M_2 són clars en aquest doble mutant. Quan el pont disulfur no està format el principal canvi són els canvis en les hèlixs, que en M_1 són quasi nuls i s'accentuen en M_2 . Quan es restringeix el moviment relatiu de les hèlixs E i F a pH 10 sí que es veuen els canvis en les hèlix en M_1 , però l'espectre que deuria correspondre a M_2 té característiques de N. Els canvis en les hèlixs indicats per la banda negativa en 1.670 cm⁻¹ i la positiva en 1.650 cm⁻¹ corresponen a N en WT, la banda positiva de la regió de l'Amida II és pronunciada i està situada en 1.555 cm⁻¹ i, per acabar, la banda en 1.186 cm⁻¹ està al nivell de la línia base indicant que la BS podria estar parcialment protonada.

Aquests canvis observats en A160C/A168Cox no mostrarien diferències entre els subintermediaris de M, sinó que el fotocicle es veu accelerat i s'atrapa N quan en WT s'atrapa M.

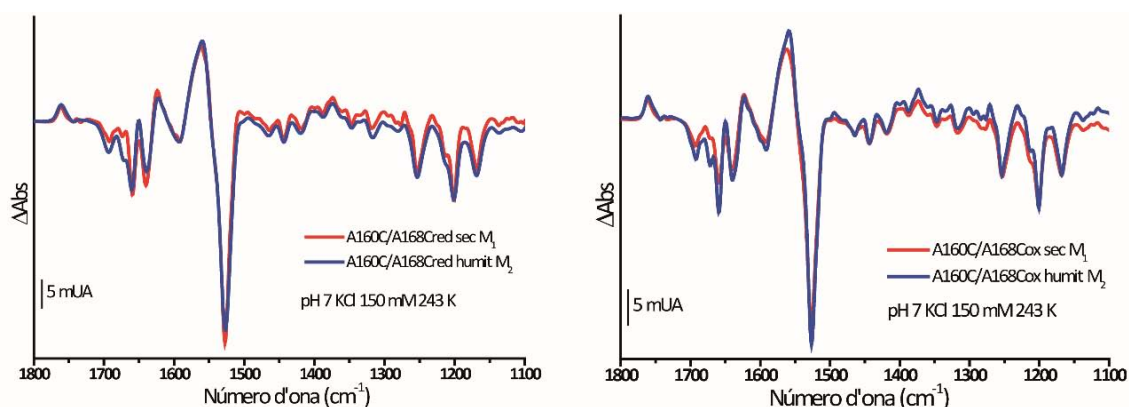


Fig. 113. Espectres de diferència de A160C/A168Cred (esquerra) i A160C/A168Cox (dreta) a pH 7 KCl 150 mM en un film sec (vermell) i humit (blau) que són les condicions per atrapar M_1 i M_2 .

Treballant a pH 7 els espectres són iguals en les dos condicions d'humitat tant per al doble mutant reduït com per a l'oxidat.

Resultats i discussió Part 2:
Restricció del moviment de
les hèlixs pel costat
extracel·lular

En aquesta segona part de la tesi veurem els resultats obtinguts a l'estudiar els mutants extracel·lulars construïts. Seguint el mateix mètode que amb els mutants citoplasmàtics, basant-se en estructures disponibles en el PDB es van buscar residus suficientment pròxims entre ells com per a formar ponts disulfur. Com ja s'ha comentat, s'intenta que no s'hagi descrit cap funció crucial per al residu que es mutarà.

Mutants simples	Localització	Mutants dobles	Hèlixs	Distància (Å)
L13C	A	L13C/L61C	A-B	2,0
L61C	B	F71C/K129C	bucle BC-DE	4,2
F71C	bucle BC			
K129C	bucle DE			

Taula 11. Taula on s'indica la posició dels residus mutats i la distància que separen els residus dels dobles mutants segons l'estructura tridimensional del PDB 1BRR.

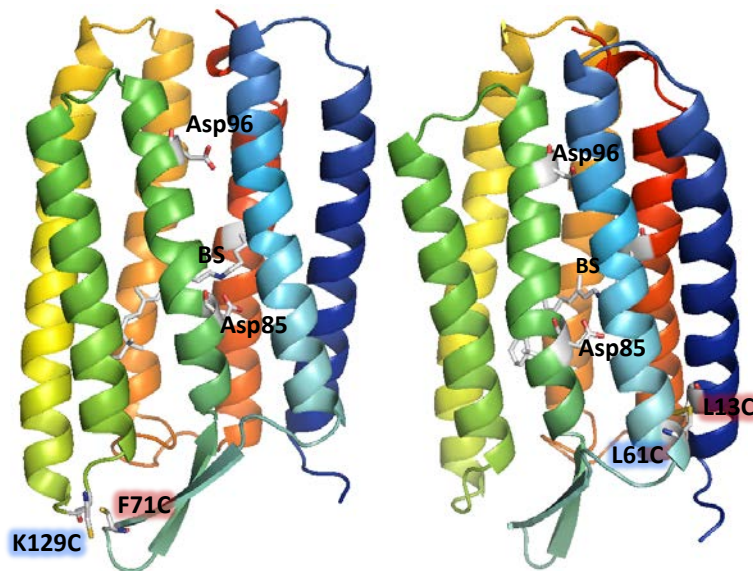


Fig. 114. A l'esquerra es representen les mutacions del doble mutant K129C/F71C i a la dreta el L13C/L61C. Les hèlixs estan acolorides per ordre cromàtic de la A a la G (A, B, C, D, E, F i G). La part superior de la figura correspon a la part citoplasmàtica i l'inferior correspon a l'extracel·lular.

Estudiarem els dobles mutants, tant oxidats com reduïts i utilitzarem el mutant simple disponible per a intentar explicar els possibles canvis deguts a les mutacions puntuals. Recordem que no ha sigut possible expressar els mutants simples L13C i F71C.

1. Estudi estructural dels dobles mutants extracel·lulars.

Mostra \ Propietat	WT	K129C/ F71C red	K129C/ F71C ox	K129C	L13C/ L61C red	L13C/ L61C ox	L61C
$\lambda_{\max}DA[LA]$ (nm)	558 [568]	550 [557]	549 [554]	556 [566]	553 [558]	547 [554]	550 [562]
$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)	10	7	5	10	5	7	12
$\Delta\epsilon$ (LA-DA)	10%	1,7%	1,2%	7,8%	0%	0,4%	2,7%
$t_{1/2}$ (min)	70,2± 6,5	12,7± 2,5	22,6 ± 1,0	52,8 ± 1,4	5,0 ± 0,2	4,35 ± 0,2	34 ± 7,0
T_m (°C)	87,6± 0,8	81,8± 1,3	84,0± 1,7	89,0± 1,7	89,0± 1,9	90,0 ± 1,0	91,0
pKa (KCl 150 mM)	2,54± 0,06	4,9± 0,3	5,1± 0,5	4,2± 0,1	5,3	4,9± 0,1	4,2± 0,6

Taula 12. Resum dels resultats de la caracterització estructural dels mutants de cisteïna extracel·lulars en comparació amb WT.

a. Adaptació llum-fosc.

Les característiques i el mecanisme de l'adaptació de la bR de la foscor a la llum ja s'han explicat en la Part 1. Tant els mutants simples com els dobles construïts presenten adaptació llum-fosc, però hi ha variacions en les longituds d'ona dels màxims d'absorció i en la magnitud dels canvis respecte a WT.

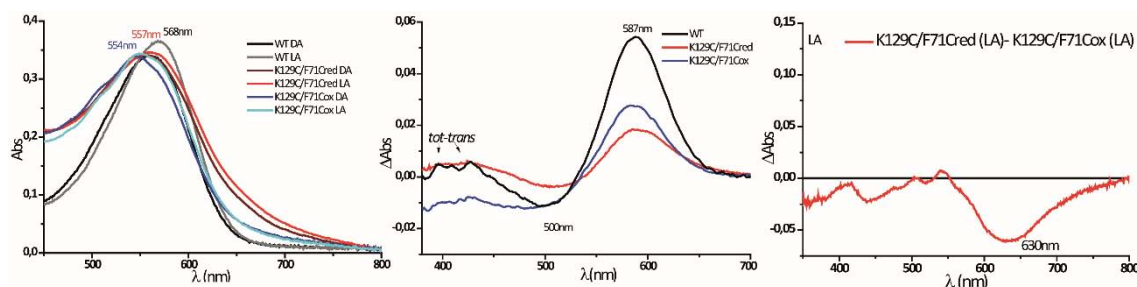


Fig. 115. A l'esquerra estan representats els espectres d'absorció en la zona on l'absorbància del retinal és màxima de WT, K129C/F71Cred i K129C/F71Cox tant en la forma DA com LA. Podem veure com en els mutants el màxim d'absorció està desplaçat i el petit canvi en el coeficient d'absorció degut a l'adaptació a la llum respecte a WT. Al mig està representat l'espectre de diferència de cada mostra que s'obté restant l'espectre DA al LA i que ens permet veure millor els canvis que es produeixen en el patró d'absorció. Gràcies a aquest espectre veiem que els mutants no presenten bandes β , que en WT són degudes a la isomerització del retinal durant el procés d'adaptació a la llum [260]. La falta d'aquestes bandes indiquen que les mutacions afecten a la butxaca d'unió del retinal, en concret afecten a la conformació *tot-trans* dificultant el canvi conformacional correcte per a la formació d'aquest. Finalment, a la dreta veiem l'espectre de diferència resultant al restar l'espectre del mutant K129C/F71Cox adaptat a la llum al K129C/F71Cred adaptat a la llum. El que podem veure és que en el mutant en la forma oxidada hi ha una espècie que absorbeix cap a 630 nm la qual no veiem en la forma reduïda.

Excepte el mutant simple K129C que té el màxim d'absorció en la foscor en 556 nm i la variació a l'adaptar-se a la llum és de 10 nm, la resta de mutants tenen el màxim d'absorció en la foscor desplaçat cap al blau. A més, l'augment del coeficient d'absorció (ϵ) que es produeix amb l'adaptació de la llum també està alterat, sent de nou el mutant K129C el que menys diferències presenta respecte a WT.

Els mutants dobles K129C/F71C tant reduït com oxidat tenen el màxim d'absorció desplaçat cap a longituds d'ona menors, en 550 i 549 nm respectivament. L'adaptació a la llum produeix el desplaçament cap al vermell del màxim d'absorció, passant a 557 nm (un canvi de 7 nm) en K129C/F71Cred i a 554 (canvi de 5 nm) en K129C/F71Cox. La mutació dels residus ha afectat a la longitud d'ona a la que el retinal absorbeix quan està DA (adaptat a la foscor) i ha reduït lleugerament l'adaptació a la llum. La fixació de les hèlixs disminueix en 2 nm l'adaptació a la llum. Aquest mutant en les dos condicions de fixació de les hèlix presenta poc canvi en el coeficient d'absorció molar, sent aquest augment d'un 1,5% front al 10% que hi ha en WT. Així, la mutació dels residus no sols ha afectat l'entorn del retinal, sinó també a la seva eficiència absorbint fotons (en referència al coeficient d'absorció). La fixació del moviment de les hèlixs augmenta aquestes pertorbacions.

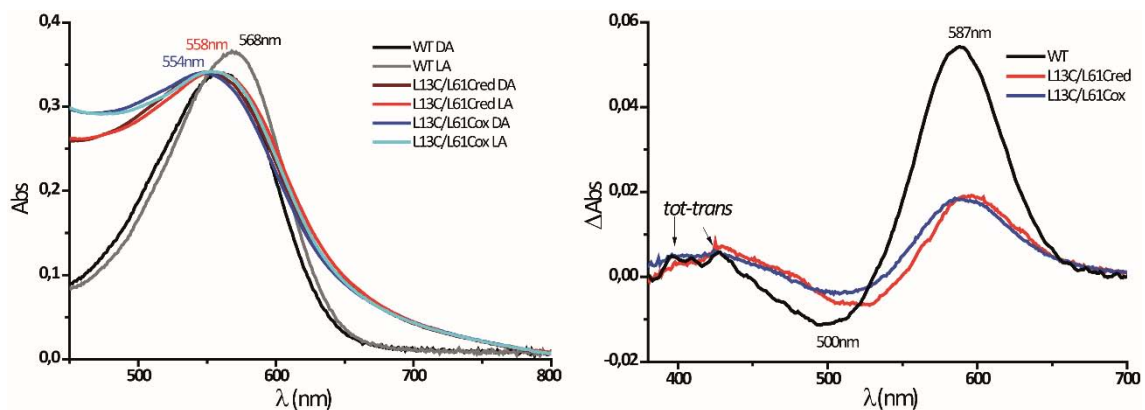


Fig. 116. Al gràfic de l'esquerra es veu clarament com en els mutants hi ha adaptació llum foscor però a longituds d'ona menors i que en coeficient d'absorció no augmenta amb l'adaptació de la bR a la llum. A la dreta està l'espectre de diferència on es veu que el comportament és similar (la forma de la gràfica és semblant), components que absorbeixen similar i molt poca diferència entre els màxims d'absorció a la llum i la foscor. A més, els mutants no presenten bandes β .

En els mutants L13C/L61C, on mutem residus de l'hèlix A i de la B, també hi ha adaptació llum-foscor però no com en WT. El mutant reduït té els màxims d'absorció desplaçats cap al blau respecte a WT, estant situats aquests en 553 nm DA i en 558 nm LA, variant sols 5 nm amb l'adaptació. En aquest cas la longitud d'ona del màxim d'absorció en la forma LA és la mateixa que en WT DA. El coeficient d'absorció no varia gens amb l'adaptació a la llum. La fixació de les hèlix desplaça la longitud d'ona del màxim d'absorció en la foscor fins a 547 nm i encara que en la forma DA la longitud d'ona del màxim d'absorció és 14 nm menor que en WT (554 front a 568 nm), la

Resultats i Discussió: Part 2

magnitud del canvi de longitud és de 7 nm, més semblant als 10 nm de WT (5 nm en el cas del mutant reduït). La variació del ϵ és també quasi nul·la.

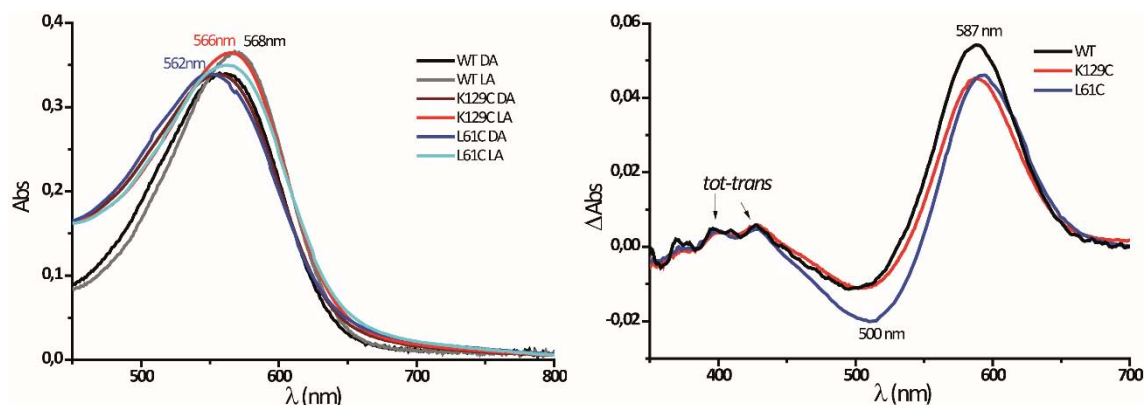


Fig. 117. A la gràfica de l'esquerra es veu clarament com K129C és dels mutants extracel·lulars que hem obtingut el que té una adaptació llum-foscior més semblant a WT. A l'espectre de diferència veiem que aquests mutants simples si que tenen bandes β .

Per últim, el mutant simple L61C presenta el màxim d'absorció en la foscior en 550 nm i en la forma LA en 562 nm. Les longituds d'ona estan desplaçades cap al blau respecte a WT però el canvi en la longitud d'absorció és inclús major que en WT (12 nm). La variació del ϵ és petita (+2,7%) però major que en els dobles mutants.

b. Mesura del pK_a del Asp85.

Com ja s'ha comentat en l'apartat dels mutants citoplasmàtics, el Asp85 pot modular fortament l'absorció del retinal, fet que utilitzem per a mesurar el pK_a aparent d'aquest, ja que en la proteïna en estat basal (tant adaptada a la llum com a la foscior) quan el Asp85 està desprotonat, la bR absorbeix a 558/568 nm (foscior/llum) i quan es protona el màxim d'absorció es desplaça cap al vermell, cap a 600 nm i la mostra passa a tenir color blau. En la figura 54 podíem veure com canvia l'absorció de la proteïna conforme el pH va disminuint i com representant la variació de l'absorbància en el punt on és màxima respecte al pH, el punt d'inflexió de la corba obtinguda és el pK_a . No comentarem de nou la titració àcida de WT i descriurem directament la dels mutants.

	WT	K129C/F71C red	K129C/F71C ox	K129C	L13C/L61C red	L13C/L61C ox	L61C	
pK_a	2,5 \pm 0,1	4,9 \pm 0,3	5,1 \pm 0,5	4,2 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,6	
	KCl 150 mM							
	H ₂ Od	3,0	6,4 \pm 0,4	5,5 \pm 0,4	5,4 \pm 0,3	6,2 \pm 0,3	5,5 \pm 0,6	4,9 \pm 0,0

Taula 13. Valors del pK_a aparent del Asp85 en WT i els mutants extracel·lulars en dos condicions de força iònica, KCl 150 mM i en aigua destil·lada (H₂Od).

A la Taula 13 veiem que el pK_a aparent del Asp85 calculat per als mutants extracel·lulars és molt més alt que en WT, almenys 1,5 unitats superior en el cas dels

mutants simples i fins a 2,5 unitats en el cas dels dobles. A més de calcular el pK_a en KCl 150 mM, com es va veure que la mostra estoc en aigua destil·lada era blava, es va pensar en repetir l'experiment però en condicions de molt baixa força iònica (en aigua destil·lada). El procediment experimental és el mateix però molt més delicat ja que el pH de la mostra en aigua destil·lada canvia molt més ràpidament.

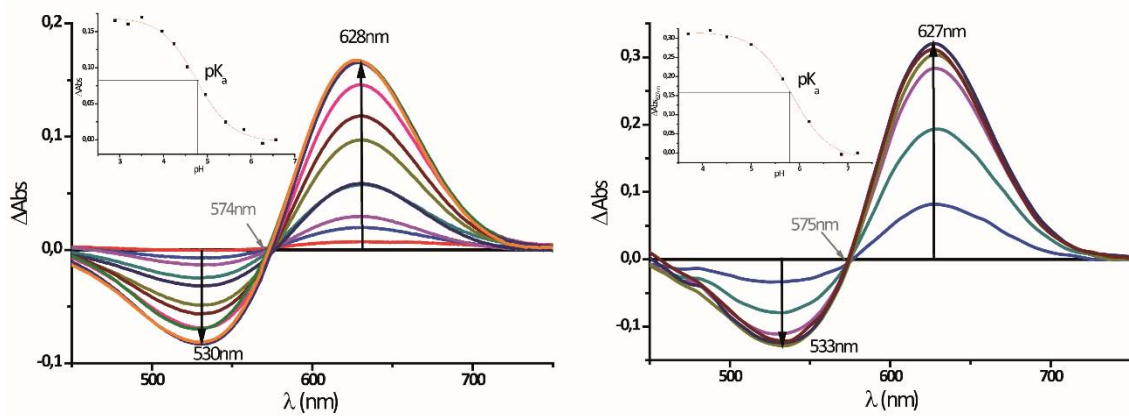


Fig. 118. Càlcul dels valors del pK_a aparent del Asp85 en els mutants extracel·lulars en dos condicions de força iònica, KCl 150 mM (esquerra) i en aigua destil·lada (dreta). El procediment en ambdós casos és el mateix. En les dues condicions de treball, els mutants presenten un sol punt isobèstic, el que indica que sols participen dues espècies en l'absorció, una que desapareix i l'altra que es forma. El pK_a és el punt d'inflexió de la corba sigmoïdal que s'obté al representar la variació d'absorbància en el punt on és màxim respecte del pH, i és quan la meitat dels Asp85 estan protonats.

En aigua destil·lada el pK_a del Asp85 en WT augmenta fins a 3,0, el que indica que el Asp85 es protona a un pH lleugerament superior en absència de sals en el medi.

El més cridaner del càlcul del pK_a en els mutants extracel·lulars és que és molt més alt que el de WT. En el doble mutant K129C/F71C, tant la forma reduïda com l'oxidada tenen un pK_a en KCl 150 mM de al voltant de 5, que és 2,5 unitats superior a WT. El pK_a en aigua destil·lada ja no és igual em ambdós formes del mutant, sent una unitat superior en la forma reduïda a l'oxidada. La mutació d'ambdós residus ha afectat al Asp85 facilitant la seva protonació i ja a pH 5 es troba protonat al 50%. Si recordem la figura 14 de la Introducció, en l'estat basal en el que treballem el Asp85 interacciona amb la Base de Schiff protonada i amb un clúster de molècules d'aigua ordenades. Junt al Asp212 formaven un pentàmer estabilitzat també en part per l'Arg82 i la Tyr57. Totes aquestes interaccions modulen la capacitat del Asp85 de protonar-se, el seu pK_a , i canvis en aquest indiquen canvis en el seu entorn. Es sol assumir un pK_a model per a l'àcid aspàrtic de 3,9 [299, 300] i l'entorn del RBP de la bR el disminueix fins a 2,5. Aquestes mutacions en el costat extracel·lular fan al Asp85 més propens a protonar-se, tal volta augmentant l'accessibilitat de les molècules d'aigua extracel·lulars a aquest residu. La fixació del bucle BC amb el DE (mutant K129C/F71Cox) quasi no modifica el pK_a del Asp85. Aquesta fixació si que produeix canvis importants quan es treballa en aigua

Resultats i Discussió: Part 2

destil·lada, ja que encara que el pK_a augmenta fins a 5,5, sense la formació del pont disulfur augmenta molt més, fins a 6,4.

La mutació dels residus L13 i L61, situats en l'extrem extracel·lular de l'hèlix A i la B respectivament, també augmenta molt el pK_a del Asp85, sobretot quan el moviment no està restringit, sent en aquest cas 0,4 unitats superior (5,3 en el mutant reduït front a 4,9 en l'oxidat. Aquest efecte es veu augmentat quan el medi és aigua destil·lada i la diferència entre els pK_a és de 0,7 unitats. A pesar de que la mutació dels residus causa uns augments tan grans del pK_a , suficients per a que en el cas del reduït a pH de treball (6,5-7,0) una part considerable del Asp85 estigui protonat ja en estat basal, la restricció del moviment de les hèlix disminueix el pK_a . Aquest fet pot fer pensar que la mutació en si causa un gran augment en la flexibilitat de les hèlix que seria en part contrarestat per l'oxidació de les cisteïnes.

L'obtenció d'almenys un dels dos mutants simples per a cada doble mutant ens permet veure l'efecte parcial d'una de les dues mutacions. Tant el mutant K129C com el L61C tenen els pK_a significativament més alts que WT però no tant com els dobles mutants, el que ens fa pensar que l'alt pK_a dels dobles mutants està causat parcialment per cada mutació puntual i tal vegada per la combinació d'ambdues mutacions.

c. Estabilitat tèrmica de la bR.

Amb els mutants extracel·lulars també podem seguir la desnaturalització del RBP amb la temperatura per UV-Vis i veure quins intermediaris apareixen durant el procés.

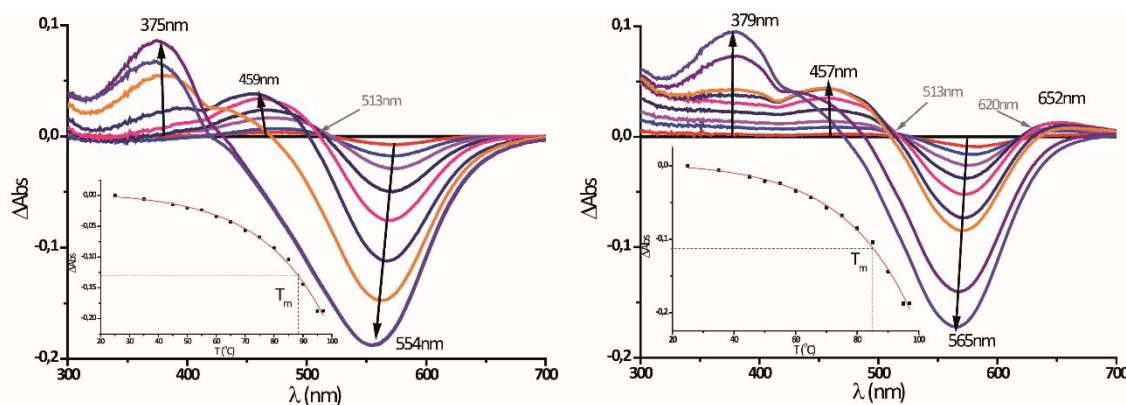


Fig. 119. Es representen dos figures com a exemples representatius. A l'**esquerra** veiem el TDS del doble mutant **L13C/L61Cox** i incrustada a la gràfica de la variació de l'absorbància respecte a la temperatura a 554 nm, que serveix per calcular la temperatura de desnaturalització (T_m). En aquest cas, veiem que quan el RBP natiu comença a desnaturalitzar-se, primer apareix una forma vermella i finalment el pic degut al retinal lliure. A la **dreta**, l'espectre de diferència del mutant simple K129C amb la corresponent gràfica de la variació de l'absorbància amb la temperatura. En aquest cas, durant la desnaturalització de la RBP es formen dos intermediaris, la forma blava i la vermella i finalment el retinal lliure, tal i com passa a WT (veure Fig. 62).

Representant la variació de l'absorbància en la longitud d'ona on la variació és major (els pics que es veuen a l'espectre de diferència) respecte a la temperatura, ajustant a una sigmoïdal es calcula la temperatura de desnaturalització o T_m , que ens servirà per a comparar l'estabilitat tèrmica de la butxaca d'unió del retinal i establir un ordre cronològic de la formació i desaparició de les diferents formes.

	T_m (°C) a 370 nm	T_m (°C) a 450 nm	T_m (°C) a 560 nm	T_m (°C) a 650 nm
WT	90,8±1,6	74,2±2,4	87,6±0,8	67,9±4,5
K129C/F71Cred	86,9±3,4	-	86,5±0,7	-
K129C/F71Cox	n.d.	-	86,2±2,1	-
K129C	87,3±0,6	64,0±0,8	85,5±1,0	50,8±2,4
L13C/L61Cred	88,4±2,6	56,9±4,8	82,1±2,3	-
L13C/L61Cox	89,4±1,9	63,7±0,1	82,1±0,9	-
L61C	91,9±2,0	64,8±6,3	83,9±2,4	-

Taula 14. Valors de T_m per a les diferents formes que apareixen durant la desnaturalització tèrmica de cada mutant. El guió indica que l'esmentada forma no apareix. n.d.: no disponible, no s'ha pogut calcular degut a grans variacions en la línia base de la regió entre 250-400 nm.

Els mutants extracel·lulars estudiats, a excepció del K129C, no presenten forma blava, que s'associa a una depleció dels cations [301]. Estrictament parlant, els mutants K129C/F71Cox i K129C/F71Cred no manquen de forma vermella, però la seva presència és quasi marginal, difícil de separar de bandes veïnes o de soroll degut a la línia base. Per a comparar millor visualment la temperatura de desnaturalització, representem els valors de T_m per al retinal en estat basal en un histograma:

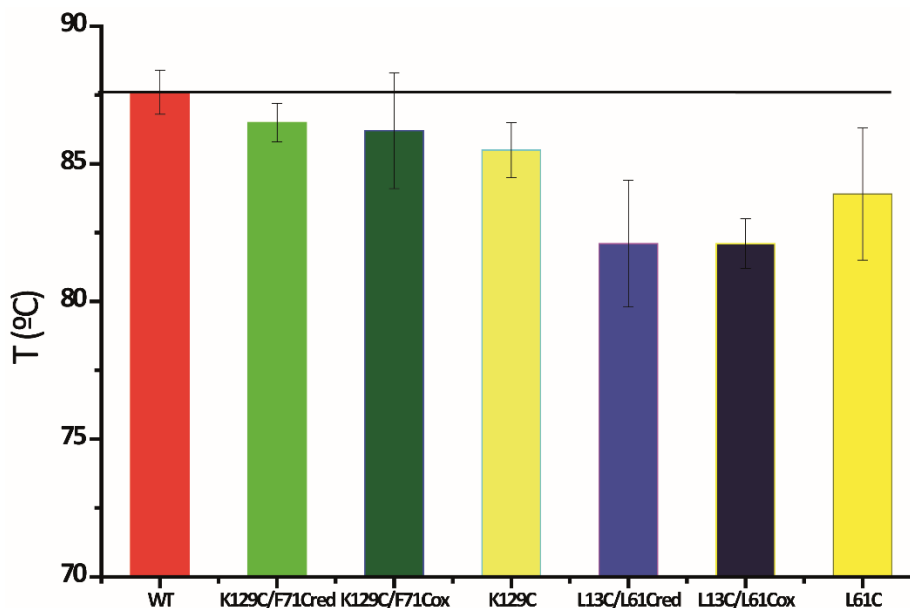


Fig. 120. Histograma amb la temperatura de desnaturalització i la desviació estàndard. La línia negra serveix de referència per a comparar amb la T_m de WT.

Resultats i Discussió: Part 2

Tenint en compte la desviació estàndard de les mesures, s'ha de considerar que la resistència del RBP a la desnaturalització tèrmica en els mutants K129C/F71C és com la de WT i és igual entre ells. La mitjana de la T_m de K129C és lleugerament menor que la de WT i que la dels dobles mutants.

Els mutants L13C/L61Cred i L13C/L61Cox tenen una T_m unes 5 unitats menor de temperatura, o sigui que aquestes mutacions afecten a l'estabilitat tèrmica del centre actiu de la bR. Que L61C tingui una T_m també menor que WT suggereix que la mutació d'aquest residu és important en la resistència a la temperatura dels dobles mutants.

Amb el càlcul de la T_m de les diferents formes que apareixen durant el procés, podem fer una cronologia de la formació d'aquests i quedaria així:

bR (562 nm) → bR (458 nm, forma vermella) + bR (651 nm, forma blava) → bO (361 nm, retinal lliure).
bR _{K129C/F71Cred} (550 nm) → bO _{K129C/F71Cred} (379 nm, retinal lliure).
bR _{K129C/F71Cox} (549 nm) → bO _{K129C/F71Cox} (363 nm, retinal lliure).
bR _{K129C} (556 nm) → bR _{K129C} (652 nm, forma blava) → bR _{K129C} (457 nm, forma vermella) → bO _{K129C} (379 nm, retinal lliure).
bR _{L13C/L61Cred} (553 nm) → bR _{L13C/L61Cred} (462 nm, forma vermella) → bO _{L13C/L61Cred} (373 nm, retinal lliure).
bR _{L13C/L61Cox} (547 nm) → bR _{L13C/L61Cox} (459 nm, forma vermella) → bO _{L13C/L61Cox} (375 nm, retinal lliure).
bR _{L61C} (550 nm) → bR _{L61C} (459 nm, forma vermella) → bO _{L61C} (380 nm, retinal lliure).

Com a recordatori, en WT la forma púrpura (la nativa) comença a desaparèixer i va formant-se la forma vermella i seguidament la blava. A més temperatura aquestes dos desapareixen per a formar retinal lliure que absorbeix a 361 nm.

En ambdós mutants K129C/F71C, en les seves formes reduïdes i oxidades la transició que es dona és directament de forma púrpura a retinal lliure, no apareix ni la forma vermella ni la blava. Per a la forma blava són necessaris els cations units a la superfície de la bR, pel qual si les mutacions afecten als llocs d'unió dels cations la seva formació es veuria afectada. Açò podria relacionar-se amb l'elevat pK_a del Asp85 ja que aquest depèn del potencial de la superfície.

La falta de forma vermella es deuria a que els residus responsables de la seva formació s'han vist afectats. Una de les raons per a l'aparició de la forma vermella és la desprotonació de la Base de Schiff, que en estat basal està protonada. La presència de dues poblacions en estat basal, una amb la BS protonada i l'altra amb la BS desprotonada

podria explicar l'absència de forma vermella i el desplaçament cap al blau del màxim d'absorció observat als experiments d'adaptació llum-fosc. Una altra possibilitat és que es degui a la desprotonació del PRG en l'estat basal.

En la desnaturalització tèrmica de K129C la cronologia de les diferents formes és com la de WT, però amb una T_m de les formes intermèdies molt menor, 10 °C menys en el cas de la forma vermella i 17 °C en la blava. Aquesta mutació simple afecta a les formes intermèdies fent-les menys estables, però encara apareixen.

En els mutants de les hèlixs A i B, tant L13C/L61Cred, L13C/L61Cox com L61C, apareix la forma vermella però no la blava i la vermella té una T_m 10 unitats menor que WT en L61C i en L13C/L61Cox i 17 en L13C/L61Cred.

Hem comparat els diferents mutants entre sí i si comparem els dobles mutants el L13C/L61Cred amb el L13C/L61Cox, es veu que la restricció de les hèlixs no afecta a l'estabilitat tèrmica del RBP i que sols afecta a la forma vermella.

d. Estabilitat química de la bR.

Per a estudiar l'accessibilitat del RBP al dissolvent, utilitzàvem hidroxilamina (HA), que interacciona amb la BS hidrolitzant-la i alliberant el retinal en forma de retinal oxima. A la figura 59 vèiem com es calcula la velocitat de reacció: il·luminem la proteïna i cada cert temps adquirim un espectre d'absorció. El pic principal, en 568 nm, degut a l'absorció del retinal unit a la proteïna adaptada a la llum va disminuint conforme la HA va hidrolitzant el retinal i va formant-se un nou pic en 365 nm, el del retinal oxima. Representant la variació de l'absorbància a 568 nm respecte al temps d'il·luminació i ajustant els punts a una cinètica exponencial obtenim τ i d'aquí la velocitat de reacció, $t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2$.

	$t_{1/2}$ (min)
WT	70,2±6,5
K129C/F71Cred	12,7±2,5
K129C/F71Cox	22,6±1,0
K129C	52,8±1,4
L13C/L61Cred	4,0±1,3
L13C/L61Cox	3,6±1,1
L61C	34,0±7,0

Taula 15. Valors de la velocitat de reacció de la HA amb la BS per a WT i els mutants extracel·lulars. Mesures indicades en minuts.

En quant als valors de la velocitat de reacció, tots els mutants obtinguts tenen una velocitat d'hidròlisi major, el que es representa amb temps de reacció més curts. Així doncs, l'accessibilitat del dissolvent al retinal és major que en WT en tots els mutants.

Resultats i Discussió: Part 2

No hi ha diferències significatives entre les formes oxidades i reduïdes dels dobles mutants, el que ens diu que la fixació de les hèlix no varia l'accessibilitat del solvent al RBP, però les mutacions puntuals si que hi afecten.

Els mutants simples disponibles, encara que també s'hidrolitzen més ràpid que WT no ho fan tan ràpid com els dobles mutants. El mutant simple K129C s'hidrolitza un 25% més ràpid que WT però més del doble de lent que els dobles mutants. La mutació del residu K129 per una cisteïna ha augmentat l'accessibilitat, però és la mutació de F71 o la combinació d'ambdues la que causa que la velocitat de reacció es tripliqui.

El mutant simple L61C s'hidrolitza el doble de ràpid que WT, indicant que la mutació permet la major entrada de molècules d'aigua cap a l'interior de la proteïna. Però el temps d'hidròlisi dels dobles mutants corresponents (L13C/L61C) tenen un temps d'hidròlisi que és tan sols el 6% (una velocitat unes 17 vegades major) del de WT. Aquí, tant la mutació d'un sol residu (L61) com la dels dos, causa un augment important en la velocitat de reacció, el que, a més d'indicar que el segon residu mutat o bé la combinació d'ambdues mutacions té un paper molt important, suggereix que la regió mutada (extrem extracel·lular de les hèlixs A i B) té un rol destacat en el manteniment d'una permeabilitat al solvent adequada.

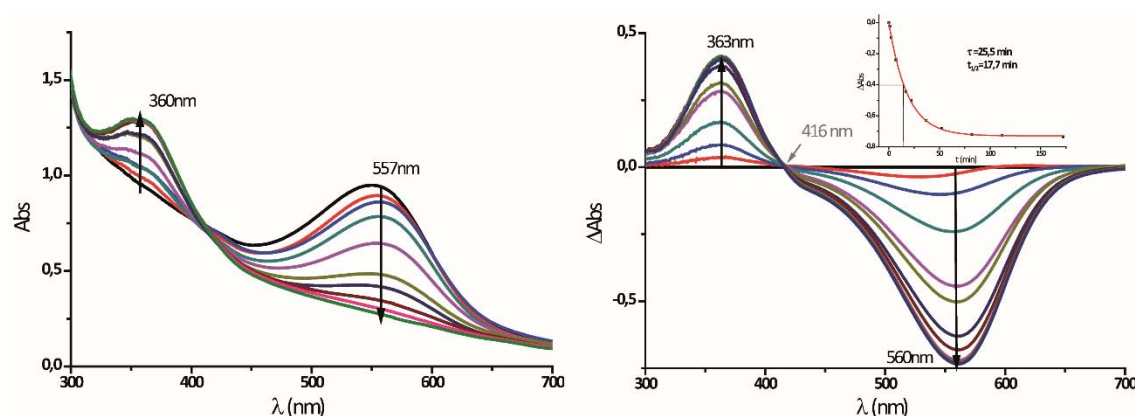


Fig. 121. Espectre d'absorció a diferents temps d'il·luminació (esquerra) i espectre de diferència dels diferents espectres respecte a l'inicial, amb la representació de la variació de l'absorbància amb el temps (dreta) del mutant K129C/F71Cred.

En quant a la forma del procés d'hidròlisi, a l'espectre de diferència de tots els mutants es veuen dos bandes, una negativa i l'altra positiva, separades per un punt isobèstic perfecte. Aquesta forma de l'espectre de diferència ens indica que el procés d'hidròlisi es produeix com en WT, el retinal unit a la proteïna a través de la BS absorbeix a 560 nm i aquest enllaç és hidrolitzat alliberant una nova espècie, el retinal oxima, que absorbeix al voltant de 360 nm. Sols hi ha el pas d'una espècie a l'altra, sense perturbacions addicionals ni espècies intermèdies.

En aquests mutants, com als de la Part 1, és la mutació dels residus i no la fixació de les hèlixs allò que més afecta a l'accessibilitat del solvent a la RBP.

2. Estudi funcional dels dobles mutants extracel·lulars.

a. Fotòlisi de llampec.

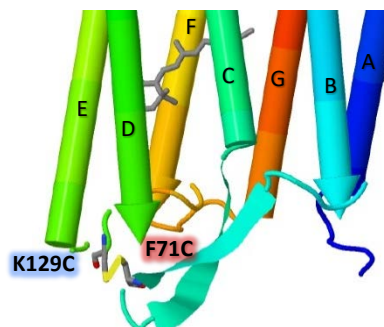
Com en els mutants citoplasmàtics, s'ha estudiat la cinètica de l'intermediari M en KCl 150 mM a pH 7 i pH 10, s'han ajustat els resultats a corbes exponencials i s'han calculat les constants de formació i decaïment o desaparició de M (τ).

Mostra	Formació (μ s)				Desaparició (ms)			
	pH 7		pH 10		pH 7		pH 10	
WT	6,2 (15%) 84,2 (85%)		2,2 (85%) 21,9 (15%)		3,2		2,7 (54%) 49,2 (46%)	
K129C/F71C <i>red</i>	3,6 (42%) 14,8 (58%)	x1,7 x5,7	2,8 (57%) 23,4 (43%)		4,6 (48%) 22,1 (52%)	x0,7	4,3 (65%) 54,4 (35%)	x0,6
K129C/F71C <i>ox</i>	1,7 (84%) 15,6 (16%)	x3,6 x5,7	2,1 (61%) 18,7 (39%)		5,1 (59%) 23,8 (41%)	x0,6	3,5 (65%) 41,3 (35%)	
K129C	3,9 (33%) 49,7 (67%)	x1,6 x1,7	5,6 (52%) 18,5 (48%)	x0,4	4,4	x0,7	2,9 (31%) 38,6 (69%)	x1,3
L13C/L61C <i>red</i>	2,5 (57%) 19,0 (43%)	x2,5 x4,4	2,6 (58%) 19,3 (42%)		2,4 (52%) 14,5 (48%)	x1,3	3,3 (61%) 23,3 (39%)	x2,1
L13C/L61C <i>ox</i>	1,1 (50%) 14,3 (50%)	x5,6 x5,6	1,4 (27%) 17,9 (73%)	x1,6	3,2 (12%) 17,8 (88%)		2,6 (65%) 33,6 (35%)	x1,5
L61C	3,6 (23%) 31,3 (77%)	x1,7 x2,7	1,8 (57%) 19,0 (43%)	x1,2	6,0 (50%) 16,2 (50%)	x0,5	2,8 (64%) 25,6 (36%)	x1,9

Taula 16. Valors de τ de la cinètica d'aparició i desaparició de l'intermediari M en WT i els mutants extracel·lulars a KCl 150 mM pH 7 i pH 10. Entre parèntesi es representen els percentatges que representen cada component respecte del total de la variació d'absorbància durant la formació i desaparició de M.

Per a poder abordar millor la descripció dels resultats anirem mutant per mutant, comentant primer el mutant doble en la forma reduïda i oxidada i a continuació el mutant simple disponible.

K129C/F71C.



Les gràfiques de fotòlisi de llampec obtingudes per aquest mutant són les següents:

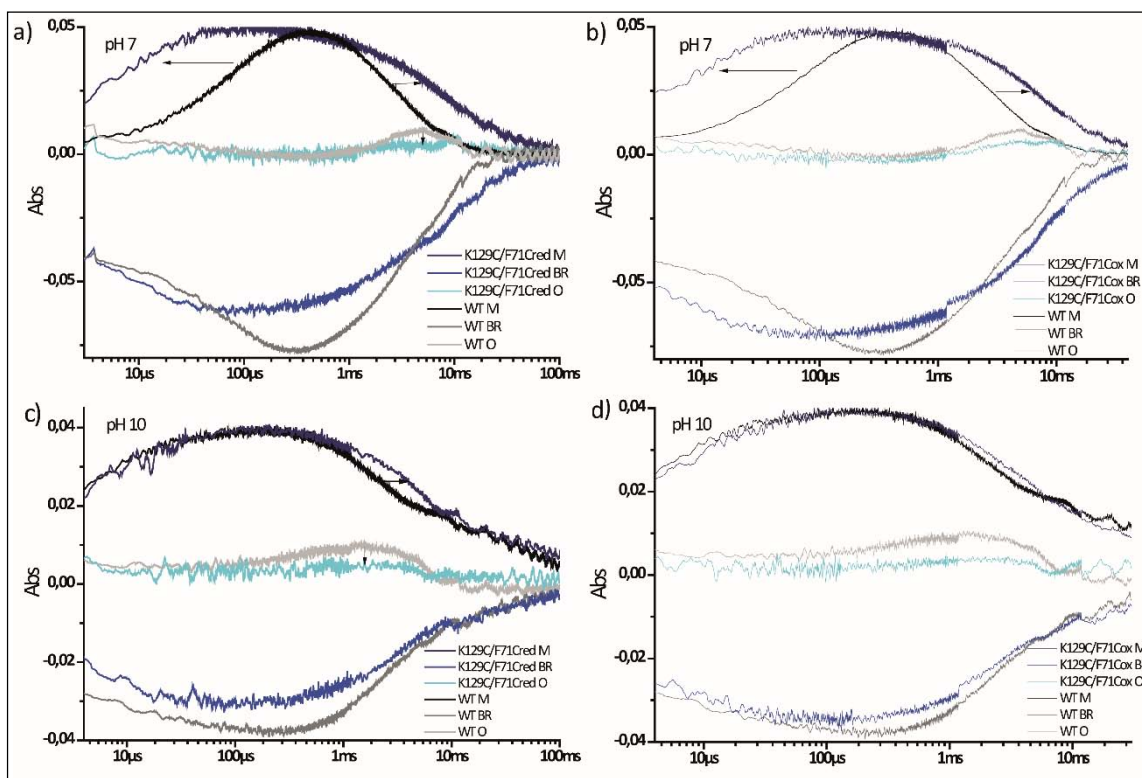


Fig. 122. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** K129C/F71Cred pH 7, **b)** K129C/F71Cox pH 7, **c)** K129C/F71Cred pH 10, **d)** K129C/F71Cox pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa en mode logarítmic.

La primera característica que s'observa a les figures d'evolució temporal obtingudes a pH 7 en els mutants és que la formació de M està fortament accelerada, una característica que encara no havia aparegut en cap dels mutants d'aquest treball. Si recordem la primera part, la formació de M o desprotonació de la BS en WT ajusta a una biexponencial que corresponia a dos components, el primer a la formació de M_1 i el segon a la de M_2 .

Al mutant K129C/F71Cred la formació de M_1 és el doble de ràpid i representa un 42% del total, mentre que en WT era de sols el 15%. La formació de M_2 te lloc en una cinquena part del temps que en WT, el que en conjunt recorda a la formació de M en WT a pH 10. Al constrènyer el moviment de les hèlixs (mutant K129C/F71Cox) la formació del primer component passa a representar gran part de l'absorció i és encara més ràpida que al mutant K129C/F71Cred. En aquest cas, tant els temps com les proporcions entre components són quasi idèntics a WT a pH 10, fet que analitzarem després.

La reprotonació de la Base de Schiff (decaïment de M) en aquests mutants també presenta dos components, un ràpid de l'ordre del de WT i un segon lent que té una velocitat de l'ordre de 20 mil·lisegons. L'acumulació de l'intermediari O és menor que WT en K129C/F71Cox i quasi nul·la en K129C/F71Cred.

A pH 10 l'evolució temporal de l'absorbància d'ambdós mutants té la mateixa forma que WT, fet que es confirma amb uns temps de formació molt semblants, sols varien les proporcions dels components ja que en els mutants la formació de M_2 ocupa una major proporció. La reprotonació de la BS a pH 10 també és com a WT, tant en temps com en proporció dels components. L'acumulació de l'intermediari O és quasi zero en els dos mutants, encara que açò és normal, ja que inclús a pH 10 l'intermediari O en WT o no s'acumula o és molt difícil de veure.

La presència del segon component en el decaïment de M indicava la formació del component lent de M (M^s), provinent del retorn de N a M causat pel bloqueig del pas de N a O. Aquest bloqueig es deuria a que es dificulta la reprotonació del Asp96 treballant a pH 10 ja que el pH de la dissolució estaria a un pH superior al pK_a del Asp96 en aquest moment del fotocicle (veure Taula 9). Però en aquest mutants açò també passa treballant a pH 7, el que indicaria que les mutacions han afectat al pK_a dels grups que participen en la formació de l'intermediari O, o sigui, principalment al pK_a del Asp96. En els mutants citoplasmàtics, al estar les mutacions situades relativament prop del Asp96 o en el camí que hauria de realitzar el protó des dels residus captadors de protons al costat citoplasmàtic fins al Asp96, esperàvem que podria afectar d'aquesta manera, sobretot en el cas dels mutants oxidats. Però veure-ho en mutants extracel·lulars xoca més ja que implica efectes a llarga distància. Aquests efectes a llarga distància solen ocórrer a través de xarxes de ponts d'hidrogen que continuen al llarg del costat extracel·lular, al contrari que en el citoplasmàtic. Aleshores, les mutacions fixant ambdós hèlixs afectarien a la distribució d'aquesta xarxa contínua, que a la seva vegada afectaria al pK_a d'alguns residus capaços de formar ponts d'hidrogen, com per exemple el Asp85 (tal com hem observat), la BS i la RBP.

Per a veure millor el possible efecte de les mutacions en el pK_a dels grups participants en la transferència de protons, representem en una mateixa gràfica l'evolució temporal de l'absorbància a pH 7 i a pH 10. Mostrarem també junts el de la forma reduïda i l'oxidada al mateix pH per a veure visualment si l'oxidació ha causat efectes:

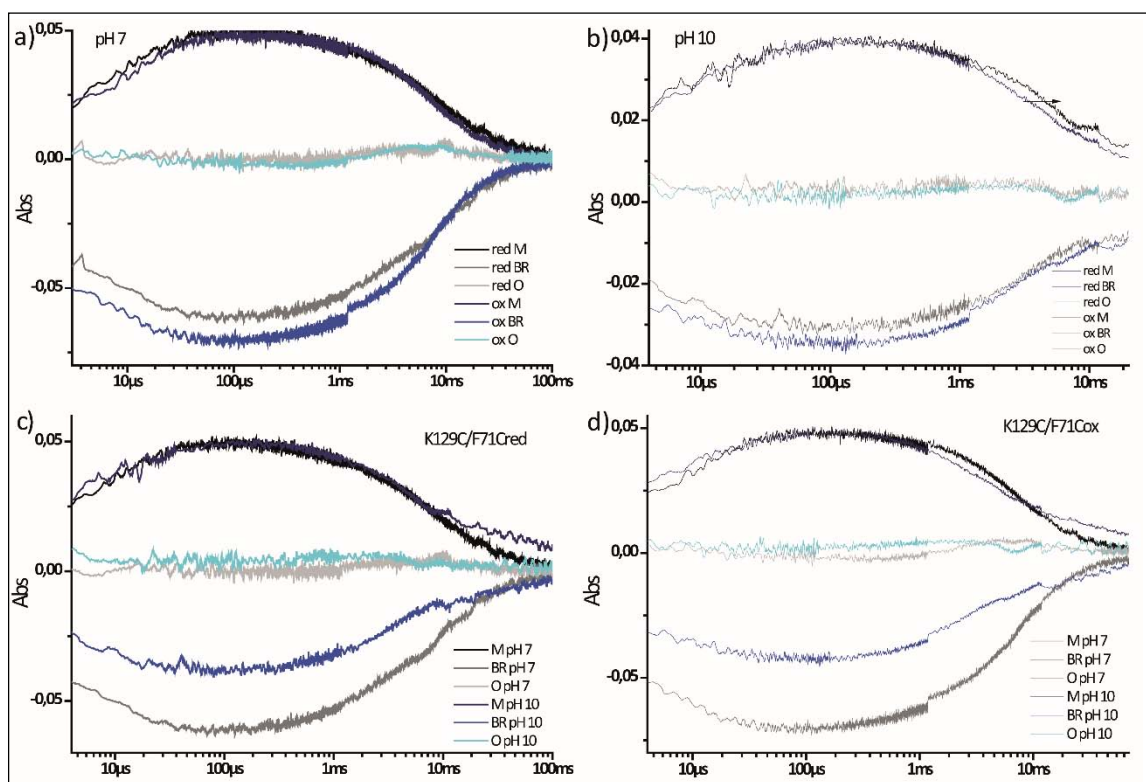


Fig. 123. Comparació de K129C/F71Cred i K129C/F71Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b) i comparació de la mostra K129C/F71Cred (c) i K129C/F71Cox (d) a pH 7 i pH 10.

A pH 7 l'evolució temporal de l'absorbància del mutant reduït i oxidat és quasi idèntics. Les petites diferències que es veuen en l'intermediari M es deuen a la diferent proporció dels dos components, tant en la formació com en el decaïment. A pH 10 el mutant K129C/F71Cred té el segon component una mica més lent que WT i 13 ms més lent que el de K129C/F71Cox. A pH 7 les variacions respecte a WT són molt grans però degudes a la mutació dels residus. A pH 10 es veu cert efecte de la restricció del moviment relatiu entre l'hèlix D i el bucle BC, accelerant la desaparició del component lent de M.

Les gràfiques de l'evolució temporal a pH 7 i pH 10 són molt semblants per al mutant K129C/F71Cred i K129C/F71Cox. La principal diferència és la velocitat del component lent durant la desaparició de M, que a pH 10 és el doble de lent que a pH 7. Que la formació de M sigui igual als dos pH indica que les mutacions han afectat al pK_a dels grups responsables de la desprotonació de la BS. Quan treballem a pH 10, com el pK_a en WT del grup alliberador del protó (PRG) és de 9,5 afavorim que es desprotoni, el que junt a que el pK_a i estat de protonació del PRG i el Asp85 estan acoblats, fa que es forci el sistema a avançar cap a l'intermediari M, desprotonat-se la BS i protonat-se el Asp85.

Tenint en compte açò, una possible explicació de perquè la cinètica de la formació de M és igual a pH 7 i pH 10 seria que el pK_a del PRG s'ha reduït fins al voltant de 7, causant el mateix efecte que a pH 10 en WT. Però si recordem els experiments de titració

del Asp85, en aquests mutants el seu pK_a en estat basal era molt alt, el que augmentaria la probabilitat d'una protonació del Asp85 per part de la BS, no fent necessari l'augment de pK_a del Asp85 en el pas de L a M per a la seva protonació. Probablement l'explicació sigui una mescla d'ambdues, degut a l'acoblament entre pK_a del Asp85 i el PRG.

K129C.

Vist que les mutacions puntuals han causat molt més efecte que la fixació de les hèlixs, anem ara a analitzar l'únic mutant puntual que ha sigut possible aconseguir, el mutant simple K129C.

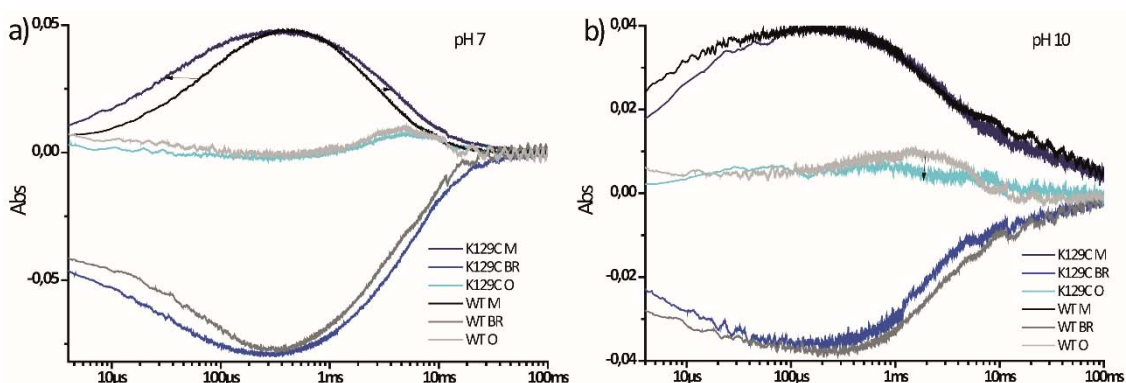


Fig. 124. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** K129C pH 7 i **b)** K129C pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa de mode logarítmic.

Aquesta mutació accelera a pH 7 tant la formació de M_1 com de M_2 quasi un 40% respecte a WT, explicant parcialment l'acceleració en el doble mutant. També contribueix parcialment a l'augment en la preponderància del primer component duplicant la seva proporció. La desaparició de l'intermediari M també es veu alentida respecte a WT però segueix mantenint el decaïment monoexponencial característic en WT.

A pH 10 la formació de M_1 és més lenta que en WT i els dobles mutants i la de M_2 és com en K129C/F71Cox. La proporció d'ambdós subintermediaris canvia respecte a WT, disminuint la proporció de M_1 fins al rang vist als dobles mutants (al voltant de 60:40% en la proporció $M_1:M_2$). En la reprotonació de la BS el component lent és més ràpid que WT i el mutant K129C/F71Cred i molt similar a K129C/F71Cox.

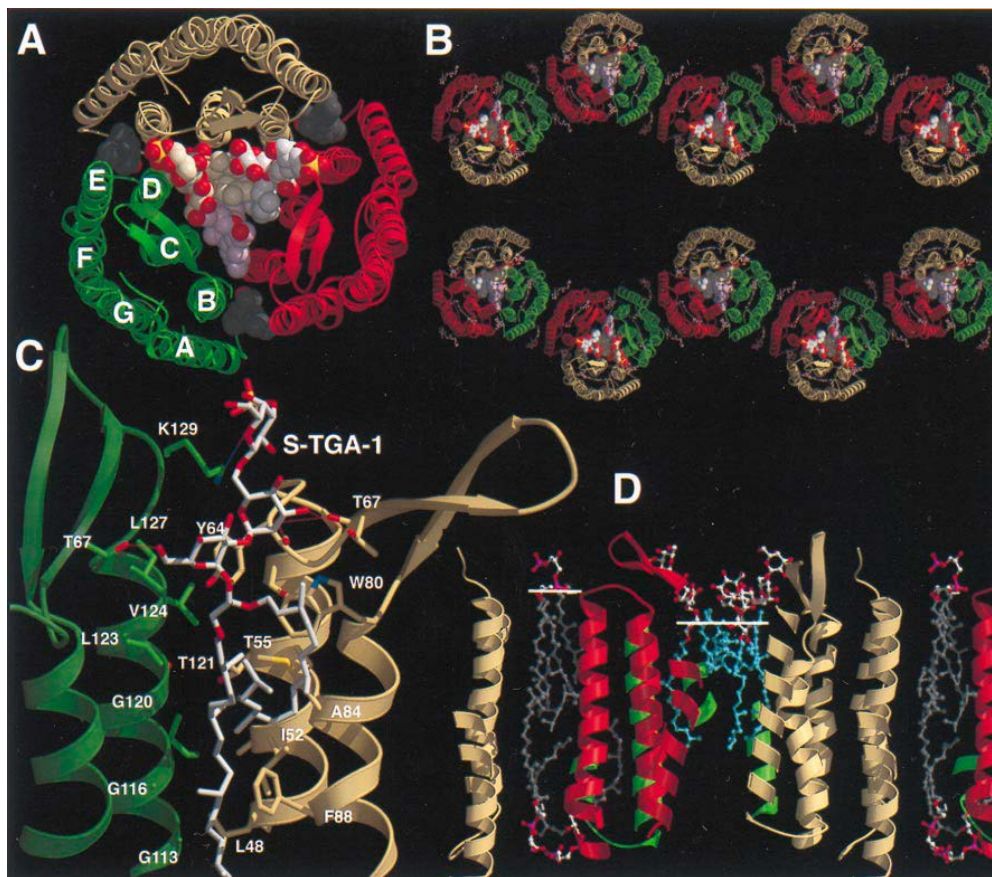


Fig. 125. A) Vista des del costat extracel·lular del complex trimer de bR/lípids. B) Representació dels hexàmers formats pels trímers de bR. C) Lloc d'unió del glicolípid S-TGA-1 i els residus amb els que interacciona. D) Secció transversal de la MP. Figura extreta de [204].

Per explicar els efectes de la mutació és important tenir en compte on està situat el residu original i les possibles funcions que tingui. A la figura 119 es veu que el residu K129 està situat al bucle DE, que està encarada a l'hèlix B del monòmer contigu i als lípids de l'espai intern del trimer. S'ha descrit que la K129 està orientada cap a l'espai intern del trimer i interacciona mitjançant un pont salí amb el sulfat del S-TGA-1, lípid que a més interaccionaria amb altres residus de l'hèlix D [204].

L'efecte de mutar la lisina per una cisteïna seria, *a priori*, la pèrdua d'una interacció amb els sulfats dels lípids de la MP, el que podria provocar la pèrdua de part de l'estabilitat o fermesa en la cohesió del trimer. També es perdria una càrrega positiva en la superfície extracel·lular de la bR. Com ja hem vist abans, en la caracterització de l'estat basal mitjançant estudis estructurals, l'adaptació llum-fosc és quasi idèntica a WT, pel qual les conformacions del retinal no s'han vist afectades per la mutació. La velocitat de la reacció de la hidroxilamina amb la BS s'ha vist accelerada un 25%, indicant que la mutació ha afectat a l'estabilitat química de la bR, fent la BS més accessible al dissolvent. Aquesta mutació ha tingut efecte a llarga distància sobre la butxaca d'unió del retinal, ja que el pK_a del Asp85, que en la bR està fortament modulada per l'entorn, ha augmentat en quasi dos unitats.

Una estabilitat química molt menor i un pK_a molt major en el doble mutant K129C/F71C no s'expliquen sols pel que hem vist a K129C, indicant que la mutació F71C també deu tenir el seu efecte sobre la RBP.

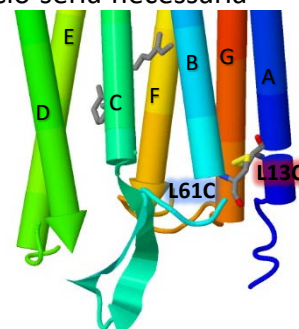
Ara, amb l'experiment de fotòlisi de llampec podem discutir si els canvis del doble mutant respecte a WT són deguts a la mutació del residu K129, al de F71 o tal vegada a la combinació d'ambdós. A pH 7 la formació de l'intermediari M_1 no es veu afectada, però sí la de M_2 , s'accelera de 84,2 μs en WT a 50,8 μs en K129C, explicant en part l'acceleració de M_2 en els dobles mutants. L'acceleració de la formació de M_1 en els dobles mutants no es pot explicar pels resultats que veiem a K129C, pel que s'ha d'atribuir a la mutació de F71 o a la combinació d'ambdós mutacions que tindria un efecte combinat. El decaïment de M en K129C manté la forma monoexponencial característica de WT però decau més lentament (4,4 ms front a 3,2 en WT). De nou, la mutació de K129 podria explicar el primer component del decaïment de M en el doble mutant però no la presència del segon component lent. En aquest mutant no hi ha quasi retorn de N a M i per això no es veu el segon component. Açò seria perquè el pas de N a O es produeix correctament i per això en aquest cas si que es detecta l'acumulació de l'intermediari O.

Les dades prèvies disponibles de mutants o modificacions de K129 relaten efectes variats, des de no observar-se efectes inusuals [302, 303] a K129 modificades químicament que tenen disminuït o eliminat l'alliberament del protó. No hi ha dades prèvies de fotòlisi de llampec de mutants K129C o F71C, però sí del K129H [260]. En K129H han substituït la Lys129 per una histidina, que a pH fisiològic es troba desprotonada. L'efecte d'aquesta substitució és un increment del pK_a del Asp85 i una reducció del pK_a del PRG en estat basal i respecte a WT. El pK_a del PRG és major durant l'intermediari M que en WT provocant un canvi en l'ordre d'alliberament i captació dels protons. En quant al fotocicle, descriuen la formació de l'intermediari M com molt accelerada i el decaïment ajusta a tres components, els dos primers de l'ordre dels vistos als dobles mutants i el tercer, encara que minoritari, és més lent.

Quan hem mutat la K129 a una cisteïna, també hem mesurat un augment del pK_a del Asp85 i una acceleració de la formació de M. Aquestes dues coincidències significarien que la K129 té un paper en el manteniment del baix pK_a del Asp85 i en regular el moment per a formar-se M. La resta de canvis observats en K129H es deurien més al fet d'introduir una histidina que de mutar la lisina.

A pH 10, en el mutant K129C i al igual que en els dobles mutants, la cinètica de formació i decaïment de M és com la de WT. La cinètica de l'intermediari O a pH 7 és normal, al igual que en el mutant K129H. Els esdeveniments de la segona meitat del fotocicle ocorren en la meitat citoplasmàtica, mentre que la mutació està situada en costat extracel·lular. Al doble mutant no s'acumulava O, tampoc a pH 7. Hem discutit

sobre la possibilitat de que les mutacions hagin afectat al pK_a dels grups que intervenen en les transferències de protons en la segona meitat del fotocicle i el mutant simple ens diu que K129 participaria parcialment en aquest efecte, però afectant-los sols de manera que s'ha de treballar a pH 10 per a poder veure's. La segona mutació seria necessària per a accentuar els efectes.



L13C/L61C.

Ara veurem les cinètiques dels dobles mutants L13C/L61Cred i L13C/L61Cox.

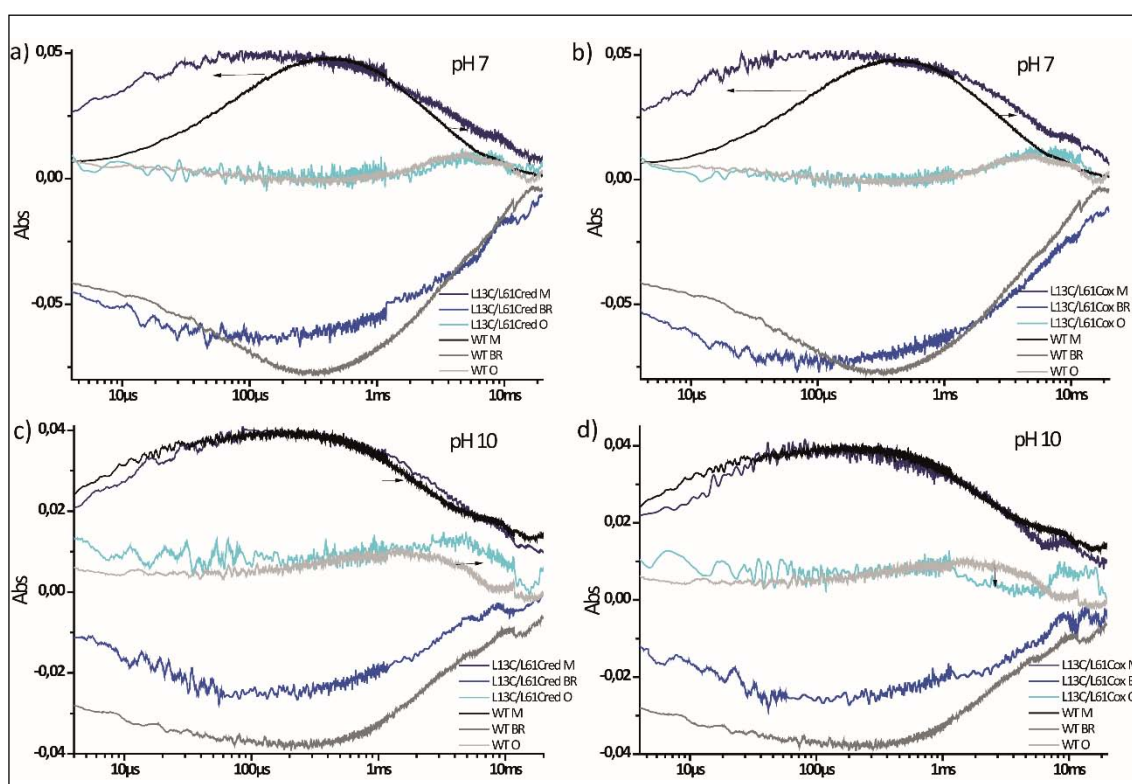


Fig. 126. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** L13C/L61Cred pH 7, **b)** L13C/L61Cox pH 7, **c)** L13C/L61Cred pH 10 i **d)** L13C/L61Cox pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa en mode logarímic.

A la Taula 16 veiem que la formació de M a pH 7 en els mutants L13C/L61Cred i L13C/L61Cox estava accelerada 2,5 i 5,6 vegades respectivament en comparació a WT i a més la població del component lent passava de representar el 15% en WT al 57% i 50% en el mutant L13C/L61Cred i L13C/L61Cox. Açò es veu clarament a les gràfiques de la Fig. 126. i que, com en els mutants K129C/F71C, la forma es sembla a la de WT a pH 10. En el decaïment de M a pH 7 en els mutants es veuen dos components, un ràpid molt semblant a l'únic observat a WT i un nou component un ordre de magnitud més lent. Al

mutant L13C/L61Cred el component lent representa el 52% de la població mentre que al L13C/L61Cox representa tan sols el 12%. A pH 7 veiem que la introducció de les mutacions ha accelerat l'aparició dels dos components de M, ha augmentat la població del component ràpid M^f i ha causat la formació d'un component lent M^s durant la desaparició de M. Però a més, s'observen diferències entre la versió reduïda i l'oxidada que han d'atribuir-se a l'efecte de la fixació de les hèlixs A i B. Aquestes diferències són una lleugera acceleració de la formació de M i una major acumulació del component lent durant el decaïment de M. Com s'havia comentat, el component lent de la desaparició de M correspon a l'intermediari M format per la reacció de tornada de N a M, indicant que la fixació de les hèlix causa un efecte a llarga distància que provoca una major acumulació de l'intermediari N. Hem de recordar que els esdeveniments involucrats en la formació i desaparició de N són la reprotonació de la BS per part del Asp96 i la reprotonació d'aquest amb un protó provinent del citoplasma i que aleshores fixant l'extrem citoplasmàtic de les hèlixs A i B estaríem afectant-los.

A pH 10 els temps de formació de l'intermediari M no es veuen afectats en el doble mutant reduït, però sí la proporció d'intermediari ràpid que passa de representar el 85% en WT al 58%. La fixació de les hèlix mitjançant l'oxidació de les cisteïnes ha provocat que l'intermediari M_1 es formi 1,6 vegades més ràpid que en WT i L13C/L61Cred però que passi a representar sols un 27% de la població. En el decaïment de M, ambdós formes presenten un component ràpid molt semblant a WT però el lent s'accelera entre 1,5 i 2,1 vegades en el mutant L13C/L61Cox i L13C/L61Cred respectivament. Ja havíem vist que el component lent del decaïment de M era l'intermediari M que provenia de la tornada de N a M, pel qual un component lent de M que decau més ràpid implicaria una vida mitjana de N més curta, el Asp96 es reprotona més ràpidament. S'afecten a esdeveniments que ocorren a la meitat citoplasmàtica. Aquest efecte és menor en el mutant L13C/L61Cox, on el component lent del decaïment de M és un 50% més lent que en el L13C/L61Cred, suggerint que en aquest moment les hèlixs A i B actuarien com a estructures rígides i aquesta rigidesa seria pertorbada per la mutació de les leucines per cisteïnes. Més endavant tornarem a discutir aquesta possibilitat quan estudiem el mutant simple L61C. L'intermediari O s'acumula suficientment com per a ser vist en totes les situacions excepte en el mutant L13C/L61Cox a pH 10, on no es veu.

pK _a	BR	M ₁	M ₂	N	O
Asp96	11,0				7,5
Base de Schiff	13,0		8,2		
Asp85	2,6	7,5			
PRG	9,5	5,8			4,5

Taula 17. Esquema dels pK_a dels diferents grups que participen en el transport de protons durant els diferents intermediaris. Les fletxes indiquen les transferències de protons entre diferents grups.

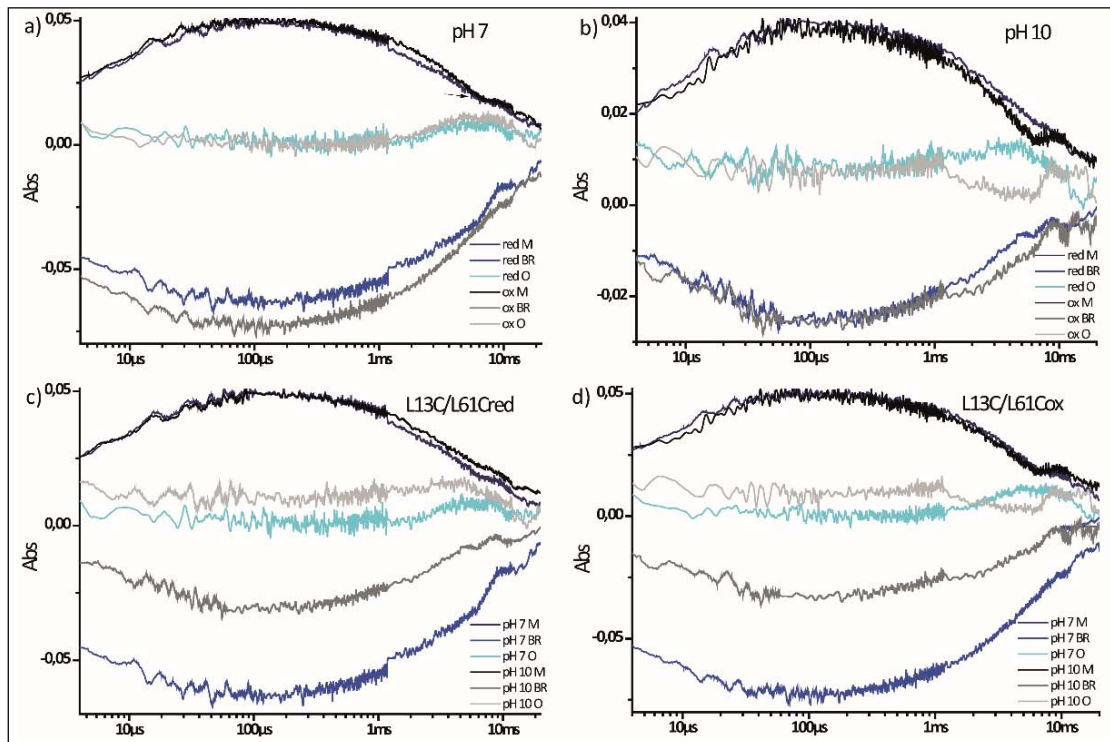


Fig. 127. Comparació de L13C/L61Cred i L13C/L61Cox a pH 7 (a) i pH 10 (b) i comparació de la mostra en la forma reduïda (c) i oxidada (d) a pH 7 i pH 10.

A pH 7, la cinètica de formació i desaparició de M en la forma reduïda i l'oxidada són semblants, amb una formació accelerada respecte a WT i un decaïment amb dos components. La fixació de les hèlixs A i B accelera la cinètica de formació de M respecte a la forma reduïda. Degut a la situació de les mutacions (superfície extracel·lular) s'esperaria que si afecten ho fessin en la primera meitat del fotocicle, en el moment de l'alliberament del potó al medi extracel·lular ja que els esdeveniments moleculars que ho provoquen ocorren en aquesta part de la proteïna. Al igual que amb el mutant K129C/F71C, en aquest doble mutant L13C/L61C el sol fet d'introduir les mutacions ha fet que a pH 7 la cinètica de l'intermediari M sigui com la que veiem a WT a pH 10. Aquest fet es veu clarament a les figures 121.c. i 121.d on es representen les cinètiques de la forma reduïda i oxidada (respectivament) a pH 7 i pH 10 per a poder comparar-les. La cinètica de M a pH 7 i pH 10 d'ambdós formes és quasi idèntica, sols amb alguns canvis com per exemple en les proporcions de component ràpid i component lent o que a pH 10 el component lent del decaïment de M és el doble de lent que a pH 7. Aquí, com en K129C/F71C les mutacions deuen haver afectat al pK_a dels grups que intervenen en la formació i desaparició de M, fent que a pH 7 la protonació del Asp85 per part de la BS sigui tan favorable com en WT a pH 10. L'alt pK_a del Asp85 als mutants és una de les possibles explicacions.

L61C.

En aquest cas tampoc disposem dels dos mutants simples ja que no ha sigut possible aconseguir que el mutant L13C expressés la proteïna. Ja que disposem del mutant L61C, anem a veure els resultats de fotòlisi de llampec.

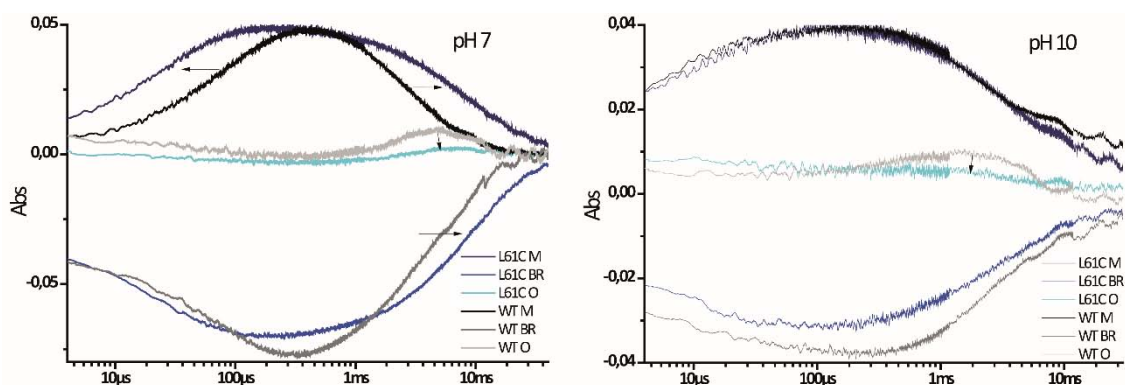


Fig. 128. Representació de l'absorbància amb el temps a 410 nm (intermediari M), 570 nm (desaparició de BR, estat basal) i 660 nm (intermediari O) amb KCl 150 mM de **a)** L61C pH 7, **b)** L61C pH 10. Junt als mutants es representa WT, en negres i grisos. L'escala de temps es representa en mode logarítmic.

Respecte a WT, en el mutant L61C és la cinètica de la formació a pH 7 de M₁ 1,7 vegades més ràpida i la de M₂ ho és 2,7 vegades. En L61C és més ràpida que en WT però no arriba a ser-ho tant com en els dobles mutants, sent per exemple el component de M₂ el doble de lent en el mutant simple que en el doble. La proporció d'ambdues poblacions de subintermediaris de M és similar a WT, augmentant la població de M₁ sols fins al 23% en contrast al 57% que arriba a representar en el doble mutant reduït.

La reprotonació de la BS (decaïment de M) en el mutant L61C a pH 7 també presenta dos components, com els dobles mutants. La cinètica del component lent és semblant a la dels dobles mutants però la del ràpid és el doble de lent que en WT i L13C/L61Cox. Aquesta característica no es veu als dobles mutants, el que indueix a pensar que és efecte de la mutació L13C. La població del component ràpid suposa el 50%, molt similar al 52% del mutant L13C/L61Cred però molt superior al 12% del mutant L13C/L61Cox. Al mutant L13C/L61Cred no s'observa, doncs, que la segona mutació afecti a la població dels intermediaris i a més la constricció del moviment de les hèlixs augmentaria la població del component lent fins a representar el 88%.

La cinètica de formació de M a pH 10 en L61C és com en WT i L13C/L61Cred, però amb la població relativa de cada component alterada, on l'intermediari M₂ representa el 66% mentre que és del 15% i 42% a WT i el mutant L13C/L61Cred respectivament. La proporció dels components durant la desaparició de M a pH 10 és com en WT. La cinètica

observada en el decaïment de M a pH 10 en el mutant L13C/L61Cred quedaria explicada amb la mutació L61C.

b. Proteïna incorporada en liposomes.

A la figura 69 podíem veure com és la variació del pH amb el temps per a WT en l'experiment per a mesurar el transport de protons de la bR en liposomes.

	V_i ($\times 10^3$)	$V_i/V_{i,WT}$	$T_{m\grave{a}x}$	$(T/T_{WT}\cdot 100)\%$
WT	2,62	1	0,108	100
K129C/F71Cred	0,39	0,15	0,008	7,4
K129C/F71Cox	0,13	0,05	0,011	10
K129C	0,27	0,1	0,02	19
L13C/L61Cred	0,36	0,14	0,007	6,5
L13C/L61Cox	0,40	0,15	0,0095	7,7
L61C	3,26	1,2	0,064	59

Taula 18. Valors obtinguts dels experiments de transport amb liposomes i comparació dels valors respecte a WT. V_i és la velocitat inicial del bombeig de protons i està expressada en unitats de pH per segon ($\Delta\text{pH/s}$). $V_i/V_{i,WT}$ és la V_i comparada amb la V_i de WT. $T_{m\grave{a}x}$ és el transport màxim de protons i s'expressa en unitats de pH.

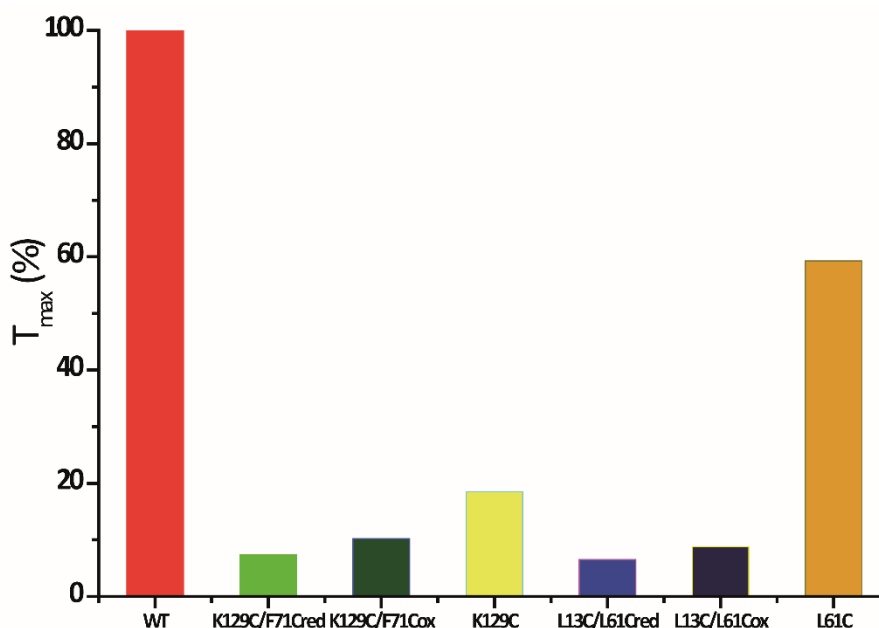


Fig. 129. Representació en histograma del transport màxim de cada mutant respecte a WT, considerant el transport de WT el 100%. $T=(T_{m\grave{a}x\text{ WT}}/T_{m\grave{a}x})\cdot 100$.

A diferència dels dobles mutants citoplasmàtics, els extracel·lulars afecten fortament a la capacitat de bombeig de protons de la bR, tal i com es pot veure clarament a la Fig. 129. A excepció del mutant simple L61C, el qual manté un 60% de la

capacitat de transport màxim de protons, la resta de mutants estudiats oscil·len entre un 5 i un 20% de la capacitat màxima de bombeig de protons.

En el cas del doble mutant K129C/F71C, la mutació K129C ja disminueix el bombeig màxim a un 20% i la segona mutació o combinació d'ambdues el baixa fins a menys del 10%. Aquestes dades ens diuen que la Lys129 és important per a la capacitat de bombeig de la bR, el que recolza la importància dels efectes a llargues distàncies que hem anat observant als diferents experiments que hem fet amb aquests mutants, sobretot en quant al gran increment en el pK_a del Asp85.

El doble mutant L16C/L61C tant en la forma reduïda com oxidada presenta una reducció en el màxim de bombeig similar al de K129C/F71C però en aquest cas el mutant amb la mutació simple del que disposem, el L61C, sols explica una disminució fins al 50%, la resta es deurà a l'efecte de la mutació L13C o la combinació d'ambdues.

Una vegada determinat que les mutacions han afectat molt al transport de protons i discutit el possible paper de cada mutació puntual, compararem el transport de cada doble mutant reduït i oxidat per tractar de discernir el paper de la fixació del moviment de les hèlixs. En el cas dels mutants K129C/F71C la constricció del moviment ha disminuït la velocitat inicial de bombeig de protons a una tercera part. La capacitat de bombeig a més de veure's fortament disminuïda per les mutacions, es veu encara més dificultada amb la formació del pont disulfur, suggerint que l'obertura entre l'hèlix D i el bucle BC té el seu paper en el bombeig de protons. A pesar de la disminució en la velocitat de bombeig, la capacitat màxima de bombeig de protons ($T_{màx}$) es veu augmentada quasi un 40% en el mutant K129C/F71Cox respecte a K129C/F71Cred. Encara que aquest 40% pugui semblar molt, respecte a WT sols suposa pujar de 7,4 a 10% del transport màxim de la proteïna nativa.

En el mutant L13C/L61C la velocitat inicial de bombeig de protons és pràcticament idèntica en la forma reduïda i en l'oxidada. Al igual que amb K129C/F71C, la formació del pont disulfur augmenta lleugerament el transport màxim de protons, passant del 6,5% de l'activitat nativa en L13C/L61Cred a un 7,7% en L13C/L61Cox.

c. Transport de protons en presència de piranina.

K129C/F71C

Per a mesurar el transport de protons, a més de mesurar el transport màxim fent ús dels proteoliposomes, també es podia mesurar el transport amb resolució temporal fent ús de la tècnica de fotòlisi de llampec.

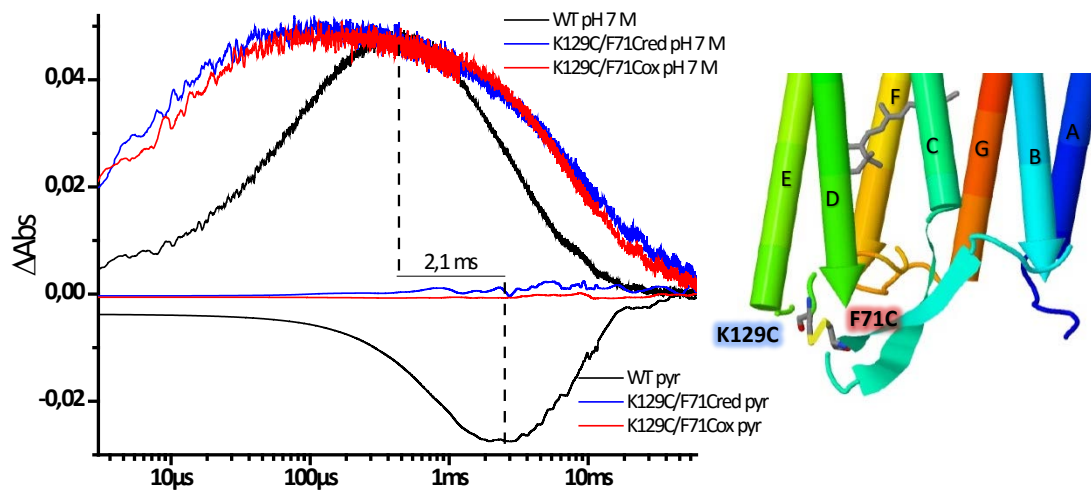


Fig. 130. En aquesta figura es representa la cinètica de M per a WT, K129C/F71Cred i K129C/F71Cox i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. No s'indica el retard dels mutants perquè no es detecta transport. Resultats normalitzats.

Als liposomes es van mesurar quantitats de transport molt baixes, que en els mutants K129C/F71Cred i K129C/F71Cox eren de entre un 5 i un 10% del mesurat en WT. Amb la piranina no es veu transport, l'absorbància és quasi zero tot el temps mentre que en WT l'absorció disminuïa a l'alliberar el protó i augmentava al captar un altre protó. El que queda clar, és que els mutants, pel simple fet de tenir les mutacions tenen el transport de protons molt afectat, disminuït pràcticament a zero. En cas d'haver mesurat transport haguéssim esperat veure que la cinètica d'alliberament i captació dels protons tenia un *plateau* molt més llarg que en WT, al igual que el *plateau* de la cinètica de l'intermediari M en els mutants extracel·lulars.

Si no hi ha transport de protons, d'on surten i on van els protons que causen el canvi d'estat de protonació de la BS observats amb la cinètica de l'intermediari M? Si recordem la figura 70, la mesura del transport dels protons es calculava restant l'evolució temporal de l'absorció sense piranina a la que sí tenia piranina. Una explicació de perquè amb liposomes mesuram transport i amb piranina no, podria ser que com és tan baixa la resolució de l'experiment no ens permet diferenciar l'absorbància de la mostra amb piranina del que no té i per tant surt transport zero. Si fos així, quadraria amb el fet de veure transport amb liposomes ja que es mesura el transport acumulat amb el temps, fent plausible la seva detecció quan per fotòlisi de llampec no es veu res.

Hi ha més possibles explicacions, les quals són que les diferències entre els resultats de mesura de transport amb piranina i amb liposomes es deuen a la diferent metodologia, que la primera detecta aparició i desaparició de protons al medi i la segona detecta entrada de protons als liposomes. Tampoc es podria descartar la possibilitat de que la captació i l'alliberament del protó coincidissin en el temps, de manera que la

disminució de senyal associada a l'alliberament de protons quedaria compensada per un augment de la senyal deguda a la captació al mateix temps de nous protons del medi.

S'ha proposat abans que la gran modificació del pK_a en estat basal del Asp85 seria una explicació per a la ràpida formació de l'intermediari M en aquests dobles mutants, ja que reduiria la diferència de pK_a entre el grup donador i l'acceptor fent més probable el traspàs dels protons. El que havíem explicat com a una major probabilitat del pas del protó des de la BS al Asp85, vistos els resultats del transport mesurat amb piranina, podria ser ampliat a esdeveniments moleculars posteriors, suggerint que el pK_a del Asp85 durant l'intermediari M en els mutants K129C/F71C dificultaria la transferència normal dels protons entre els diferents grups protonables.

K129C

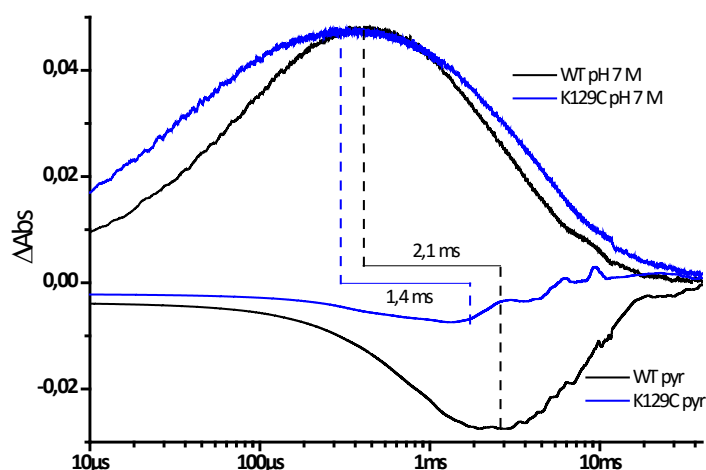


Fig. 131. En aquesta figura es representa la cinètica de M per a WT i K129C i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

En el mutant simple K129C si que es veu transport. L'alliberament del protó, a l'igual que la formació de l'intermediari M està accelerada respecte a WT. El rendiment del transport en el mutant, indicat per la variació màxima de l'absorbància, és tan sols d'un 26% respecte a WT. El desfasament del màxim en l'intermediari M i la disminució de l'absorbància de la piranina és menor en el mutant, passant de 2,1 ms en WT a 1,4 ms en K129C, un 32% menor. La disminució del rendiment mesurat amb piranina és molt semblant al mesurat amb els liposomes, 26 i 19% respectivament, el que recolza encara més que gran part dels efectes observats en K129C/F71C es deuen a la mutació K129C.

L13C/L61C

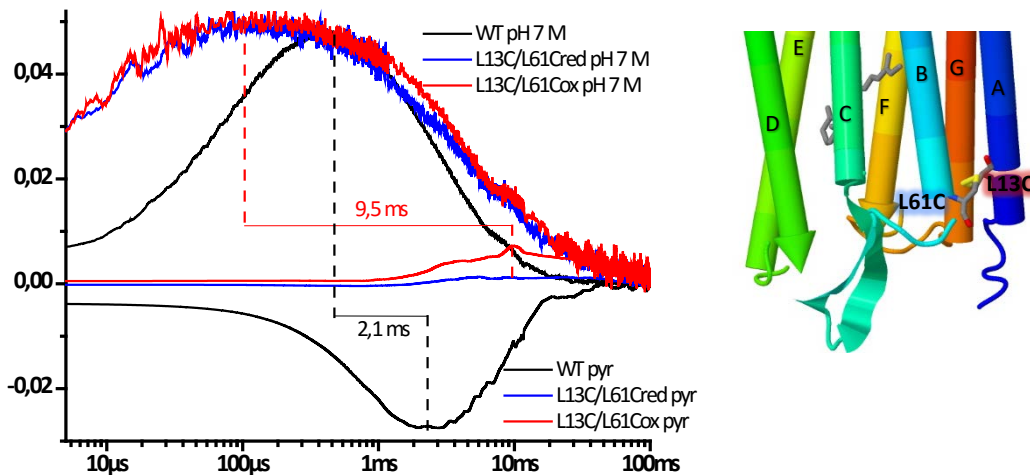


Fig. 132. En aquesta figura es representa la cinètica de M per a WT, L13C/L61Cred i L13C/L61Cox i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

Tal com es veu a la gràfica anterior, el doble mutant L13C/L61Cred tampoc mostra canvis detectables entre la mostra amb piranina i la sense piranina, que pot ser degut a que el pK_a ha afectat al transport disminuint-lo per baix del límit detectable o a que l'alliberament i captació del protó és coincident en el temps. Però el mutant L13C/L61Cox es comporta diferent, l'absorbància primer augmenta i després disminueix, al contrari del que passa amb WT. A WT l'absorbància de la piranina primer decreixia degut a la seva protonació deguda a l'alliberament d'un protó, i després l'absorbància es recuperava per la desprotonació de la piranina degut a que la bR captava un nou protó. En el mutant L13C/L61Cox, quan WT comença a recuperar l'absorbància (captació d'un nou protó), l'absorbància augmenta cap a valors positius i després disminueix tornant a zero. Açò s'ha observat a altres mutants i s'ha explicat atribuint-ho a que s'inverteix l'ordre d'alliberament i captació dels protons. En L13C/L61Cox, quan es forma l'intermediari M el PRG no allibera el protó, roman protonat i per això no disminueix l'absorbància. Més tard, quan en WT es capta el nou protó, en L13C/L61Cox també es capta, per això en ambdós mostres augmenta l'absorbància, sols que en el mutant com no s'havia alliberat cap protó l'absorbància pren valors positius. Momentàniament en el doble mutant L13C/L61Cox hi ha un protó extra respecte a WT, que és alliberat al final del fotocicle.

A pesar de la inversió en l'ordre de captació i alliberament del protó, el resultat final també és el transport net d'un protó. Com la variació màxima de l'absorbància és molt menor que en WT, el rendiment en el doble mutant oxidat és molt baix, tal i com ja hem vist amb l'experiment de transport en liposomes. En el mutant L13C/L61Cred, com en K129C/F71Cred i K129C/F71Cox, amb els liposomes mesurem una mica de transport

però amb la piranina no ho podem mesurar. En canvi, en L13C/L61Cox el transport en liposomes és tan sols el 7% de l'observat a WT però sí que s'ha pogut observar.

La mutació dels dos residus, el L13 i L61 ha afectat greument la capacitat de transport de protons indicant-nos que les leucines situades als extrems extracel·lulars de les hèlixs A i B són importants per al correcte funcionament de la bR. Però aquí, a diferència de l'anterior doble mutant, la constricció del moviment relatiu dels extrems extracel·lulars de les hèlixs A i B sí que té un efecte: la inversió en l'ordre de captació/alliberament del protó.

Aquest endarreriment en l'alliberació del protó s'ha observat també en mutants dels glutàmics de la superfície extracel·lular Glu194 i Glu204, junt a un augment en el pK_a del Asp85. El retard en l'alliberament en els mutants de Glu es produeix perquè aquests dos formen part del grup alliberador del protó (PRG) i l'augment del pK_a del Asp85, que també s'ha observat en mutants del Glu9, es deu a que formen part d'una xarxa de ponts d'hidrogen que es veu afectada per les mutacions. Donat que ni L13 ni L61 formen part del PRG, l'augment del pK_a seria degut a la pertorbació de les xarxes de ponts d'hidrogen i l'endarreriment en l'alliberació del protó seria a que d'alguna manera afecta a l'estat de protonació del PRG. Ja que l'endarreriment de l'alliberació del protó sols es veu al constrènyer el moviment de les hèlixs A i B pel costat extracel·lular, aquests resultats suggeririen que aquest moviment seria necessari per a l'estabilitat del PRG, necessari per a que tingui el pK_a adequat per a desprotonar-se en el moment just. La impossibilitat del moviment entre l'hèlix A i la B mantindria protonat al PRG fins al final del fotocicle, quan es desprotonaria alliberant el protó al medi.

L61C

Estudiem ara el mutant L61C per a dilucidar millor el paper de cada residu.

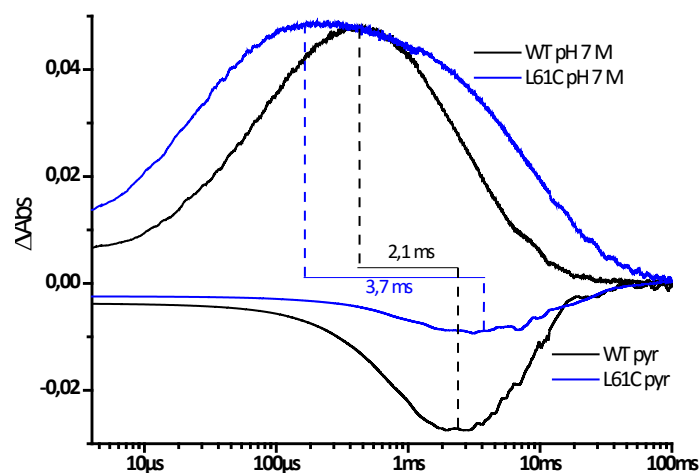


Fig. 133. En aquesta figura es representa la cinètica de M per a WT i L61C i la cinètica de l'alliberament i captació del protó mesurat amb piranina. S'indica el temps de retard entre el màxim d'absorció de l'intermediari M i el mínim amb piranina. Resultats normalitzats.

El transport màxim de protons en el mutant L61C mesurat amb liposomes era un 59% del de WT. Mesurat amb piranina també és menor, però en aquest cas el màxim d'absorció és un 34% del de WT. Una altra diferència és el retard. Mentre que el retard entre el màxim de l'intermediari M i el de piranina en WT mostra un retard d'uns 2 ms, en el mutant L61C és de 3,7 ms i no sols és degut a la formació més ràpida de M en el mutant. La cinètica de reprotonació en el mutant és més lenta, el que concorda amb un decaïment de M més lent que retardaria tant l'intermediari N com l'O, que és quan es capta el nou protó.

L'estudi de la cinètica de captació i alliberament dels protons en el mutant L61C ens diu de nou que, encara que la mutació va mostrant part dels canvis observats en el doble mutant, com la disminució en l'eficiència del transport, aquest residu no és el més determinant per a explicar les característiques de L13C/L61C.

L'estudi de L61C va mostrant que el residu Leu13 és important per al correcte funcionament de molts aspectes de la bR. Per a explicar el doble mutant L13C/L61C, s'ha d'atorgar a Leu13 importància en la formació de xarxes de ponts d'hidrogen que modulen el pK_a del Asp85, en l'estabilitat química de la bR, en la cinètica de l'intermediari M i en la cinètica dels protons.

De moment, una possible explicació de la importància d'aquest residu seria la seva proximitat a diversos residus importants. Per una banda, prop de Leu13 es troba Glu9, residu que si es muta provoca un fort increment en el pK_a del Asp85 i afecta a la unió de cations a la superfície extracel·lular. Per una altra banda, prop hi ha situats uns quants triptòfans, com el Trp8 o el Trp10, els quals serien importants per a l'ancoratge de la bR a la membrana i Trp12 seria important en la formació dels trímers de bR [304, 305].

d. Espectres d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR).

Estudi dels espectres de diferència del doble mutant K129C/F71C.

Estudiant els espectres de diferència de FTIR dels mutants citoplasmàtics, vam veure que modulant les condicions a les que es preparaven els films per a l'adquisició dels espectres es podien acumular determinats intermediaris del fotocicle (veure Fig. 76.). En el cas d'aquest doble mutant i sobretot en el cas de la forma oxidada, les condicions que servien per a atrapar els intermediaris en WT no han servit o be els espectres són bastant poc definits. El perquè no s'han pogut atrapar s'anirà discutint al llarg dels següents punts.

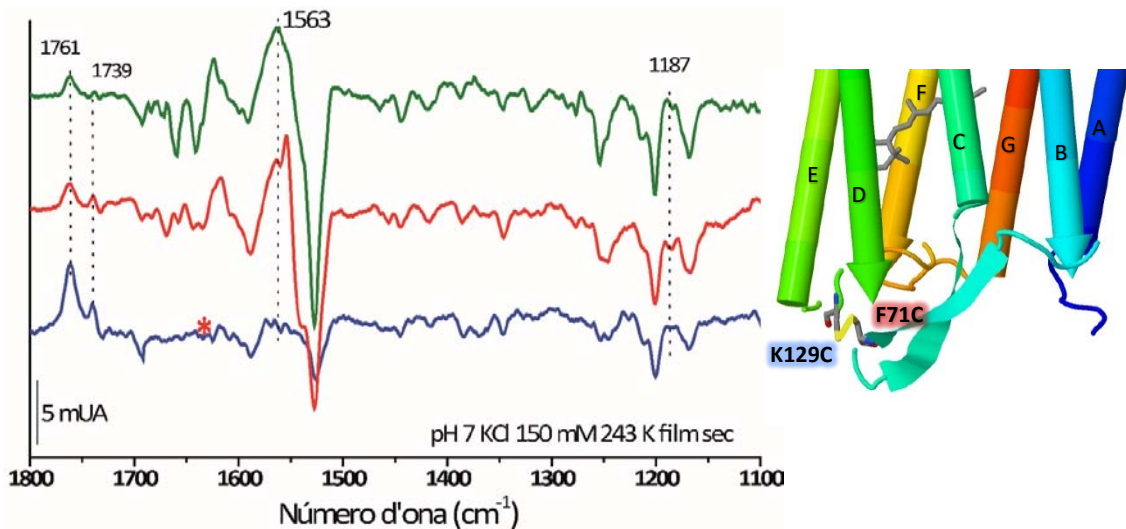


Fig. 134. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i a 243 K (-30 °C) de K129C/F71Cred (**vermell**), K129C/F71Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M_1 .

En aquestes condicions en que WT queda atrapat en l'intermediari M_1 , veiem que K129C/F71Cred també queda atrapat en M_1 tal i com es veu per la banda situada en 1.187 cm^{-1} i que indica que la BS està desprotonada, per la banda de 1.761 cm^{-1} corresponent al Asp85 protonat en entorn M i la regió de l'Amida I que correspon als canvis estructurals típics de M.

L'intermediari atrapat en K129C/F71Cox és més difícil de determinar. En el rang entre 1.800 i 1.700 cm^{-1} que correspon a les vibracions de C=O dels grups COOH es detecten les mateixes bandes que en WT estant en intermediari M. Aquestes són la banda positiva corresponent al Asp85 protonat en 1.762 cm^{-1} i la banda positiva en 1739 cm^{-1} corresponent al Asp115. També hi trobem la banda en 1.187 cm^{-1} per baix de la línia base indicant una BS desprotonada i el retinal en conformació *13-cis*. Però en el rang de l'Amida I no hi ha bandes ben resoltes en 1.657 cm^{-1} . A més en la regió de l'Amida II la banda en 1.563 cm^{-1} , atribuïda a la part proteica [306] i a la vibració de *stretching* del cromòfor en M (que hauria de ser positiva en 1535 cm^{-1}), és quasi absent mentre que la banda negativa en 1.527 cm^{-1} que correspon a la vibració C=C del retinal en *tot-trans* en estat basal té menor intensitat. Durant la realització dels experiments es fan repeticions per a assegurar la fiabilitat dels resultats i durant l'adquisició dels espectres de FTIR de K129C/F71C es va observar que amb la primera adquisició s'obtenien uns espectres més o menys acceptables però que en les successives repeticions els espectres eren quasi plans, com si fos sols soroll. Allargar el temps d'espera entre dos mesures millorava els espectres, el que ens va conduir a pensar que el temps de vida mitjana dels intermediaris atrapats en els mutants eren molt més llargs que en WT i que aleshores en les successives repeticions estaríem obtenint espectres de diferència entre els mateixos intermediaris i per tant no s'observarien diferències.

Igualment, en diversos casos no es van poder obtenir bons espectres ni en la primera adquisició. De moment, es pot dir que en K129C/F71Cox, en condicions en que WT queda atrapat en M₁, els canvis en la vibració dels enllaços C=C del retinal són molt menors que els que veiem en WT. A pesar dels problemes per a adquirir espectres, la protonació del Asp85 es veu molt clarament, és l'esdeveniment molecular més clar de tots i sembla que no té problemes per a protonar-se i desprotonar-se entre cada mesura.

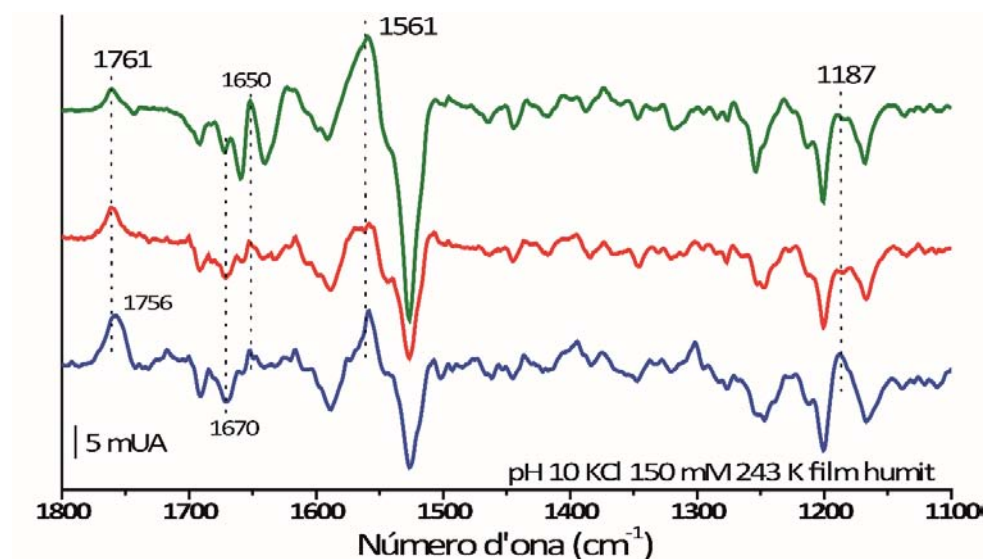


Fig. 135. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K de WT (verd), K129C/F71Cred (vermell) i K129C/F71Cox (blau). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₂. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

A la figura anterior estan representats els espectres de diferència en condicions en les que WT queda atrapat en M₂. Els espectres de diferència dels mutants permeten distingir i estudiar algunes de les bandes més característiques per a determinar quin és l'intermediari atrapat. Començant per l'estat de protonació de la Base de Schiff, tant WT com el mutant reduït tenen la banda de 1.187 cm⁻¹ situada per baix de la línia base que correspon a la BS desprotonada i al retinal en conformació *13-cis*, com en l'intermediari M. El mutant K129C/F71Cox, en canvi, la banda sobrepassa clarament la línia base indicant que la BS està protonada de nou tal i com s'esperaria de l'intermediari N.

De moment, sembla que WT i K129C/F71Cred en aquestes condicions queden atrapats en M i K129C/F71Cox en N. Anem a veure més bandes característiques per a veure si es confirma:

- La banda deguda a la protonació del Asp85 està situada en 1.761 cm⁻¹ en WT i el mutant reduït, que correspon al Asp85 protonat en entorn de M. En el mutant K129C/F71Cox se situa en 1.756 cm⁻¹, Asp85 en entorn de N.
- La proporció entre les bandes en 1.670 cm⁻¹ i 1.650 cm⁻¹ en WT indica que els canvis en les hèlixs són els característics de M. En el mutant K129C/F71Cred la proporció no és la esperable en M però la intensitat és molt petita, el que serà degut probablement

a l'absència d'aquests canvis. En K129C/F71Cox, la proporció és més accentuada i la banda en 1.657 cm^{-1} és quasi inexistent, el que ens indica que en aquest mutant els canvis en les hèlixs són més be com ens esperats en N.

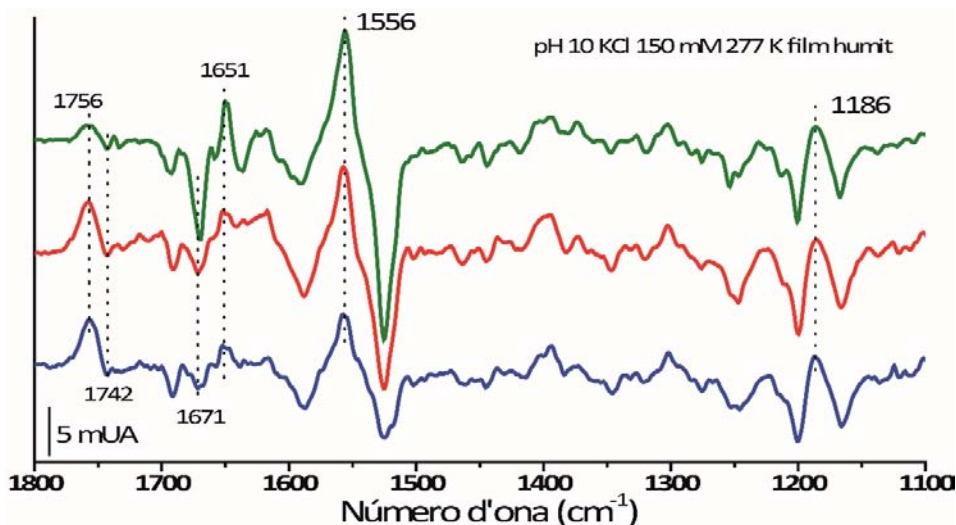


Fig. 136. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 277 K (4°C) de K129C/F71Cred (vermell), K129C/F71Cox (blau) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari N. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En condicions per a atrapar l'intermediari N en WT, tant la forma reduïda com l'oxidada del doble mutant K129C/F71C també queden atrapats en N. Tenen la BS protonada, el Asp85 en entorn de N, el Asp96 desprotonat (banda negativa en 1.742 cm^{-1}) i la banda negativa situada en 1.657 cm^{-1} és pràcticament inexistent.

Com ja s'ha vist en espectres anteriors, la zona de l'Amida I en els mutants no mostra els canvis tan clars que es veuen en WT, però en la resta en aquestes condicions els mutants tenen les característiques de WT en N.

En les condicions descrites en la Fig. 137. no es pot atrapar WT en cap intermediari, sols en estat basal i per això no s'obtenen espectres de diferència de FTIR. S'han pogut obtenir espectres de diferència dels mutants K129C/F71Cred i K129C/F71Cox que mostren característiques de quedar atrapats en l'intermediari M. Es veu la banda característica del Asp85 protonat en entorn M (1.762 cm^{-1}), bandes corresponents a girs reversos en el rang de l'Amida I (1692 cm^{-1}), bandes corresponents a la vibració C=C del cromòfor (una positiva en 1.563 cm^{-1} i una negativa en 1.527 cm^{-1}), la banda negativa corresponent a la vibració C₁₄-C₁₅ del retinal *tot-trans* (1199 cm^{-1}) i la banda indicant que la BS està desprotonada (1184 cm^{-1}).

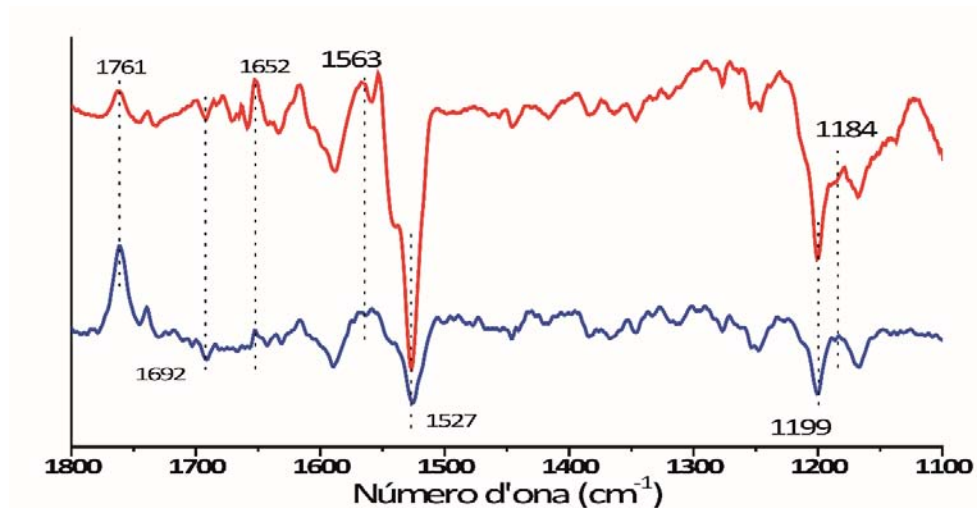


Fig. 137. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films en tampó 3 mM fosfat sòdic pH 7, KCl 150 mM i a 277 K de K129C/F71Cred, film sec (vermell) i K129C/F71Cox, film humit (blau).

Amb les mateixes condicions de temperatura, força iònica i humitat però a pH 10 si que és possible atrapar intermediaris del fotocicle en WT. Si recordem els resultats de fotòlisi de llampec, veiem que per als mutants K129C/F71C la cinètica de formació i desaparició de M a pH 7 era quasi idèntica a la de pH 10 i postulàvem que els pK_a dels grups que intervenien s'haurien vist modificats de tal manera que a pH 7 ja veuríem els efectes que en WT cal treballar a pH 10 per a veure. Haver pogut atrapar amb FTIR a pH 7 intermediaris amb els que en WT cal treballar a pH 10 seria una prova més de l'afirmació anterior.

Estudi dels espectres de diferència del mutant K129C.

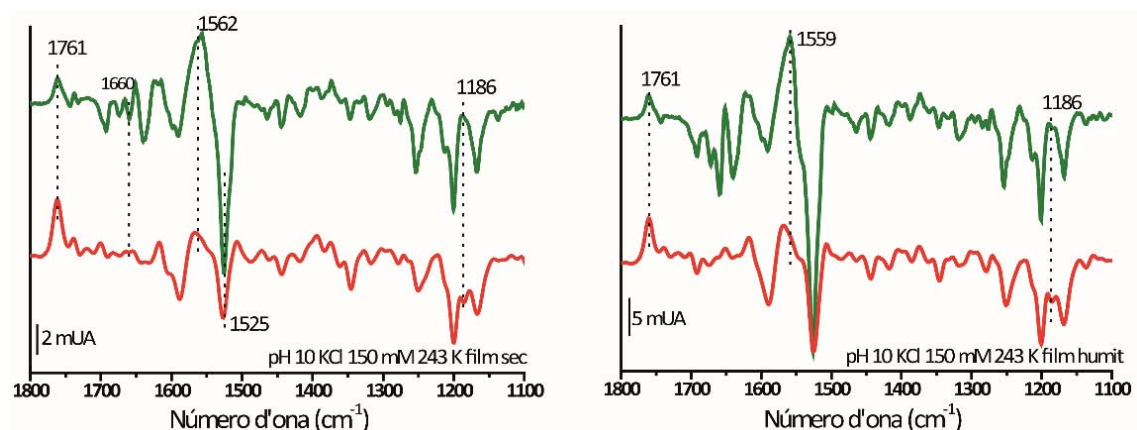


Fig. 138. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs (esquerra) i humits (dreta) en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i 243 K de K129C (vermell) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M en WT. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En les condicions indicades a la figura 132 el mutant K129C queda atrapat en M, al igual que WT. La intensitat d'algunes bandes és menor en el mutant, com la banda negativa situada en 1525 cm^{-1} o la de 1.562 cm^{-1} . La principal diferència és l'absència de

les bandes de la regió situada entre 1.700 i 1.600 cm^{-1} que corresponen a l'Amida I i indiquen canvis en les hèlixs i en girs reversos.

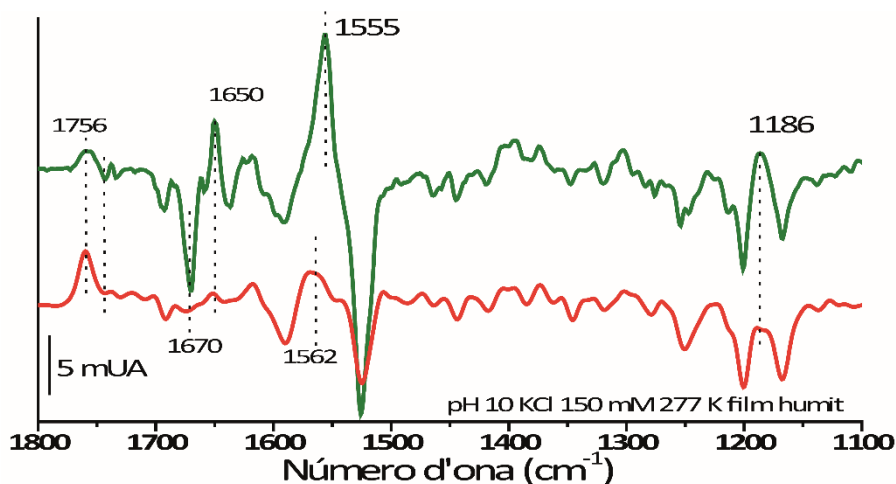
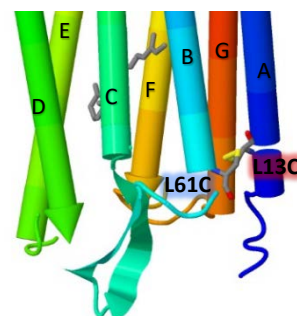


Fig. 139. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i 277 K de K129C (vermell) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari N en WT. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En general, en els condicions per atrapar M en WT el mutant K129C també queda atrapat en M (figura 132), encara que amb algunes diferències. En aquest cas (figura 133), quan WT queda atrapat en N el mutant és atrapat en l'intermediari M, per tant la mutació del residu Lys129 afecta a la formació de l'intermediari N. Açò en el doble mutant no passa, raó per la qual es podria suposar que la segona mutació compensa l'efecte de la primera, fent que el temps de reprotonació de la BS torni a ser normal.

Ja s'havia proposat la participació de Lys129 en xarxes de ponts d'hidrogen el que causaria que la seva mutació tingués efectes a llarga distància. En aquest cas, l'efecte ha sigut que la BS és més difícil de reprotonar (esdeveniment molecular que marca la formació de l'intermediari N), pel qual no es veuria intermediari N atrapat en condicions en que en WT si que es veu.

Estudi dels espectres de diferència del mutant L13C/L61C.



Al igual que els dobles mutants K129C/F71C, aquests també han sigut bastant difícils d'obtenir i alguns espectres no han sigut massa bons, com per exemple el del mutant K129C/F71Cox de l'espectre de la dreta de la Fig. 140.

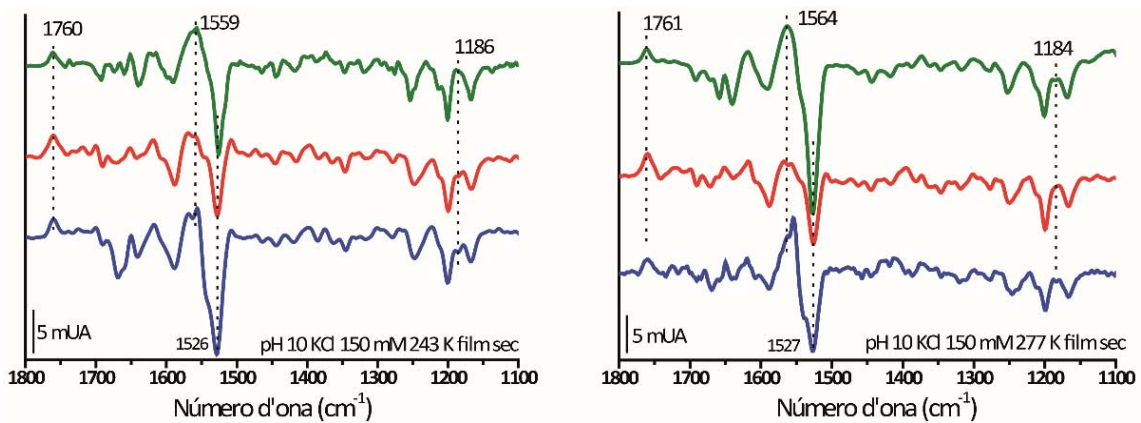


Fig. 140. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i 243 K (esquerra) i 277 K (dreta) de L13C/L61Cred (**vermell**), L13C/L61Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₁ en WT. Espectres normalitzats en 1.201 cm⁻¹.

Com es pot veure a la figura, a pesar d'haver algunes bandes irregulars, en general es pot veure que els pics més característics dels intermediaris es poden veure i l'intermediari atrapat coincideix amb el de WT. Així, les molècules que entren al fotocicle mostren espectres de diferència molt semblants als de WT.

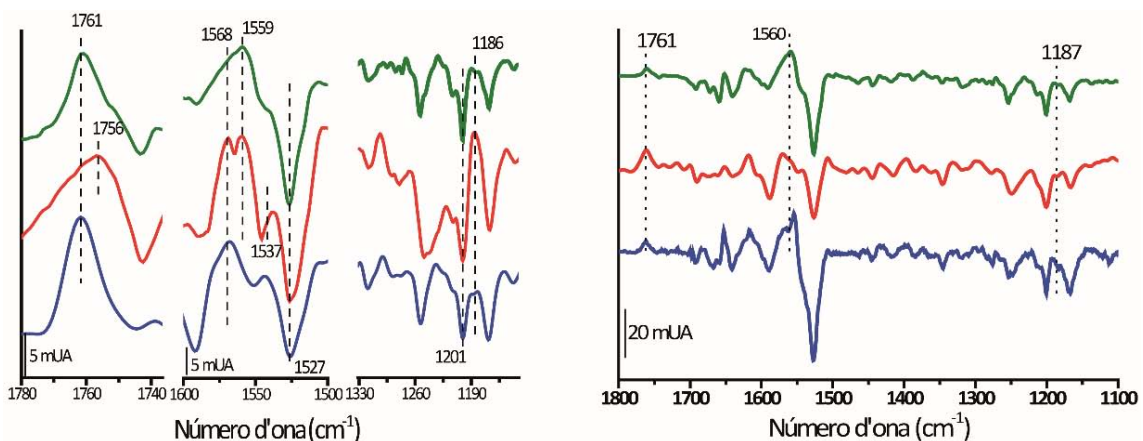


Fig. 141. A l'esquerra, regions seleccionades dels espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i 243 K de L13C/L61Cred (**vermell**), L13C/L61Cox (**blau**) i WT (**verd**). A la dreta es representen els espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó fosfat 3 mM pH 7, KCl 150 mM i 243 K de L13C/L61Cred (**vermell**), L13C/L61Cox (**blau**) i WT (**verd**). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M₂ en WT.

A la Fig. 141. es mostren una selecció de les bandes en condicions per atrapar l'intermediari M₂ en WT. El mutant L13C/L61Cox presenta les bandes característiques de l'intermediari M amb la peculiaritat de presentar una banda del Asp85 protonat en entorn M molt intensa (1.761 cm⁻¹). En canvi, L13C/L61Cred té la banda del Asp85 en 1.756 cm⁻¹ indicant que té un entorn de N, la banda situada en 1.186 cm⁻¹ supera la línia base indicant SB protonada i retinal en conformació *13-cis* i la banda de l'Amida II,

encara que complexa, té un pic en 1.559 cm^{-1} i en 1537 cm^{-1} , característic de l'intermediari N. En aquestes condicions la introducció de les mutacions ha accelerat el fotocicle, fent que s'atrapí l'intermediari N en compte del M. Al formar el pont disulfur torna a atrapar-se l'intermediari M, indicant que la restricció del moviment de l'hèlix A i B ha alentit el fotocicle respecte al doble mutant amb moviment lliure.

Les mutacions de L13 i L61 ha accelerat la formació de N en aquestes condicions de treball, per això en compte de M es queda atrapat N. Als experiments de fotòlisi de llampec es va mesurar que a pH 10 el decaïment de M al doble mutant reduït ocorria en la meitat de temps que en WT, recolzant la idea de la formació accelerada de N. Igualment, l'intermediari M del mutant L13C/L61Cox en fotòlisi de llampec decau un 1,5 vegades més ràpid que WT però més lentament que la forma reduïda.

A la figura de la dreta en WT s'atrapa M_2 i els mutants L13C/L61Cred i L13C/L61Cox també estan en conformació M. En condicions per a atrapar l'intermediari N en WT, L13C/L61Cred també queda atrapat en N però L13C/L61Cox no ha sigut possible d'atrapar.

També trobem alguna peculiaritat, com per exemple que s'ha pogut atrapar els dobles mutants L13C/L61C en l'intermediari M a pH 7, 277 K i film humit, unes condicions que no permeten atrapar cap intermediari en WT. La raó podria ser la major duració de M captada amb l'experiment de fotòlisi de llampec.

Estudi dels espectres de diferència del mutant L61C.

Encara que els dobles mutants L13C/L61C tant en la forma reduïda com en l'oxidada es comportaven igual en els experiments d'infraroig, ara veurem com eren els espectres de diferència de FTIR del mutant simple L61C.

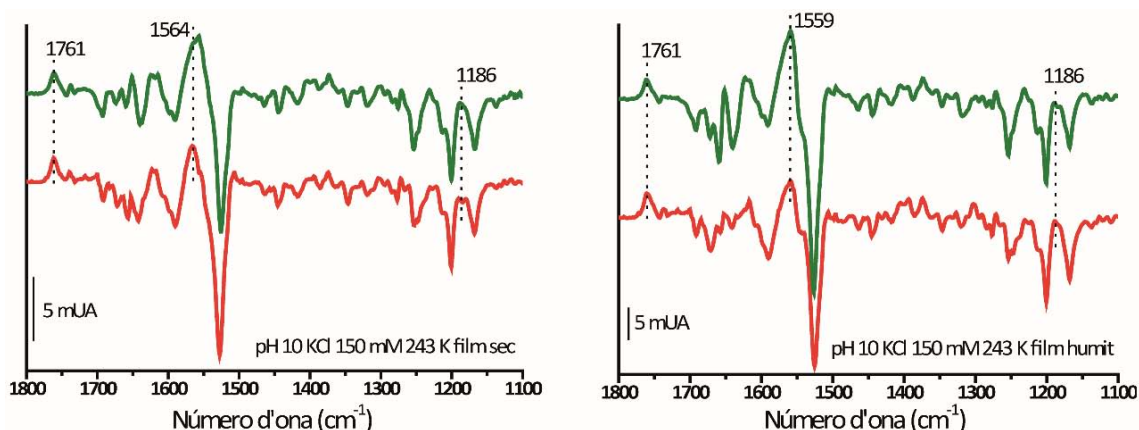


Fig. 142. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films secs (esquerra) i humits (dreta) en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i a 243 K de L61C (vermell) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari M. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En aquestes condicions, i en general en les estudiades, el mutant queda atrapat en les mateixes condicions que WT, tal i com passava amb els dobles mutants. La diferència la podem veure a la següent figura, en la que en condicions en que WT queda atrapat en N, el mutant s'atrapa en M:

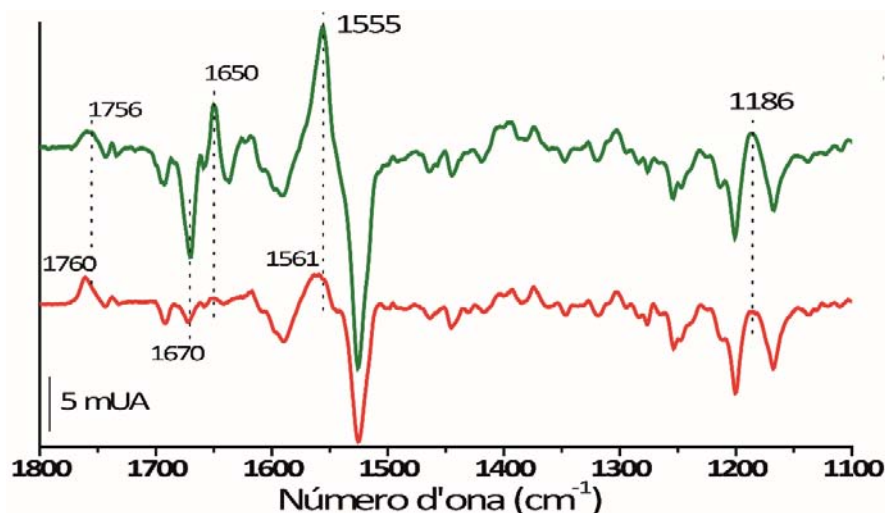


Fig. 143. Espectres de diferència de FTIR obtinguts a partir de films humits en tampó 3 mM carbonat sòdic pH 10, KCl 150 mM i 277 K de L61C (vermell) i WT (verd). En aquestes condicions s'afavoreix l'acumulació de l'intermediari N. Espectres normalitzats en 1.201 cm^{-1} .

En condicions per atrapar N el mutant L61 queda atrapat en M. L'estudi d'aquesta sola mutació no explica els canvis respecte a WT observats als dobles mutants. De nou, aquestes dades atribueixen un paper destacat a la funció del segon residu mutat, el L13.

e. Potencials aplicacions biotecnològiques dels mutants.

Hem comentat que vam tenir problemes als experiments de FTIR amb els dobles mutants, que la primera vegada que obteníem les dades els espectres eren decents i en les repeticions no es veia res i calia esperar molt de temps entre mesura i mesura per tornar a obtenir espectres decents. Com amb fotòlisi de llampec es veia que l'intermediari M durava més, una de les explicacions que ens vam plantejar era que açò es devia a que l'intermediari M tenia una vida mitjana molt llarga en les condicions utilitzades en FTIR i aleshores en les repeticions els espectres de diferència obtinguts no eren entre l'intermediari atrapat i l'estat basal, sinó entre l'atrapat i ell mateix, pel qual els espectres serien bàsicament soroll.

Una pista clau la va proporcionar un film que es trobava a la taula del laboratori ja en desús. Aquest film que ja havia sigut descartat, a l'estar a temperatura i humitat ambiental i exposada a la il·luminació de la sala i que en WT tindria un color púrpura, resultava que era de color groguenc. A la figura 12 de la introducció es representa un esquema del fotocicle amb la longitud d'ona a la que cada intermediari té el seu màxim d'absorció i tot dins d'un requadre de color, que intenta ser aproximadament el color

d'aquesta longitud d'ona d'absorció màxima. L'únic intermediari de color groguenc és el M, que absorbeix a 412 nm i per tant si la seva vida mitjana no fos de l'ordre de mil·lisegons nosaltres el veuríem groc.

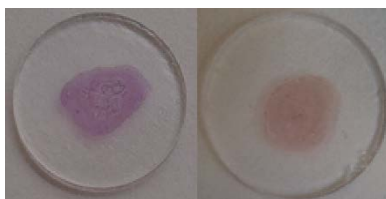


Fig. 144. A l'esquerra veiem un film de WT preparat per a FTIR, a pH 10, temperatura, humitat i il·luminació ambiental. A la dreta veiem el film del mutant K129C/F71C pH 10 temperatura, humitat i il·luminació ambiental. A la foto es pot apreciar el canvi de color, com tirant a color sèpia. A simple vista el color groguenc es veu molt millor.

Així, el color groguenc del film del doble mutant K129C/F71C, que en concret era K129C/F71Cred i a pH 10, podria deure's a que la vida mitjana del seu intermediari M en aquestes condicions era suficientment llarga per a veure's a simple vista.

Per estudiar aquest film es van elegir dues estratègies. La primera consistia en obtenir l'espectre d'absorció del film amb l'espectrofotòmetre de UV-Vis i la segona en seguir l'absorbància a 410 nm amb la tècnica de fotòlisi de llampec.

Estudi dels films amb espectroscòpia de UV-Vis.

A l'espectrofotòmetre descrit a Materials i Mètodes es treballa amb mostres en dissolució col·locades en cubetes, ja siguin de plàstic, vidre o quars. Per a poder treballar amb els films, s'ha hagut de construir un suport per al film de manera que es quedi fix perpendicular al feix de llum. En aquest cas, el blanc es fa amb l'aire i la mostra de referència també és l'aire.

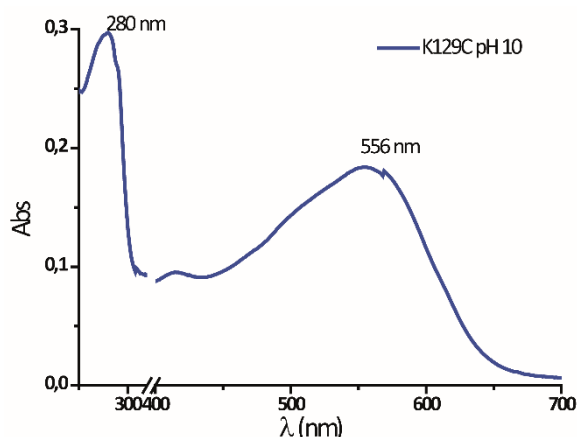


Fig. 145. Si el muntatge es fa bé, s'obtenen espectres d'absorció com aquests molt semblants als que s'obtenen amb mostres de bR en dissolució. Es veu el pic degut a l'absorció dels triptòfans (280 nm) i el degut a l'absorció del retinal unit a la proteïna (556 nm). Aquesta mostra és d'un film del mutant K129C a pH 10 adaptat a la foscor.

Una vegada aconseguit el mètode per a obtenir els espectres d'absorció de mostres en films, es va procedir a il·luminar la mostra amb llum groga per adquirir l'espectre d'absorció del film groguenc

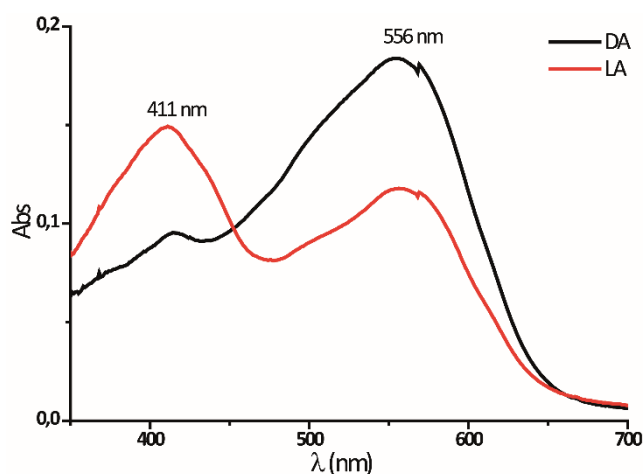


Fig. 146. Espectres d'absorció de films del mutant K129C a pH 10 i humitat i temperatura ambientals. DA indica l'espectre d'absorció de la mostra adaptada a la foscor i LA és l'adaptada a la llum, la il·luminada amb llum groga durant 10 minuts.

A l'espectre d'absorció de la mostra il·luminada es veuen dos pics, un dels quals té el màxim al voltant de 556 nm i correspondria per tant a l'absorció del retinal en bR en estat basal. En 411 nm hi apareix un nou pic, a una longitud d'ona que coincideix amb la de l'intermediari M i la qual és la responsable del color groguenc de la mostra.

Així doncs, es veu que es forma una espècie que absorbeix a 411 nm i té una vida mitjana suficientment llarga per a ser vista a ull nu i per a ser mesurada amb l'espectrofotòmetre, que com ja s'ha comentat s'utilitza per a estudiar estats estacionaris.

El següent pas seria adquirir espectres amb el temps amb la mostra en la foscor després de ser il·luminada. Així s'esperaria poder veure l'estabilitat de l'espècie que absorbeix a 411 nm i en que es converteix.

A la Fig. 147. veiem que amb el temps l'espècie que absorbeix a 411 nm va desapareixent i va formant-se bR en estat basal. En aquest procés sols participen dos espècies tal i com es pot veure pel punt isobèstic de l'espectre de diferència.

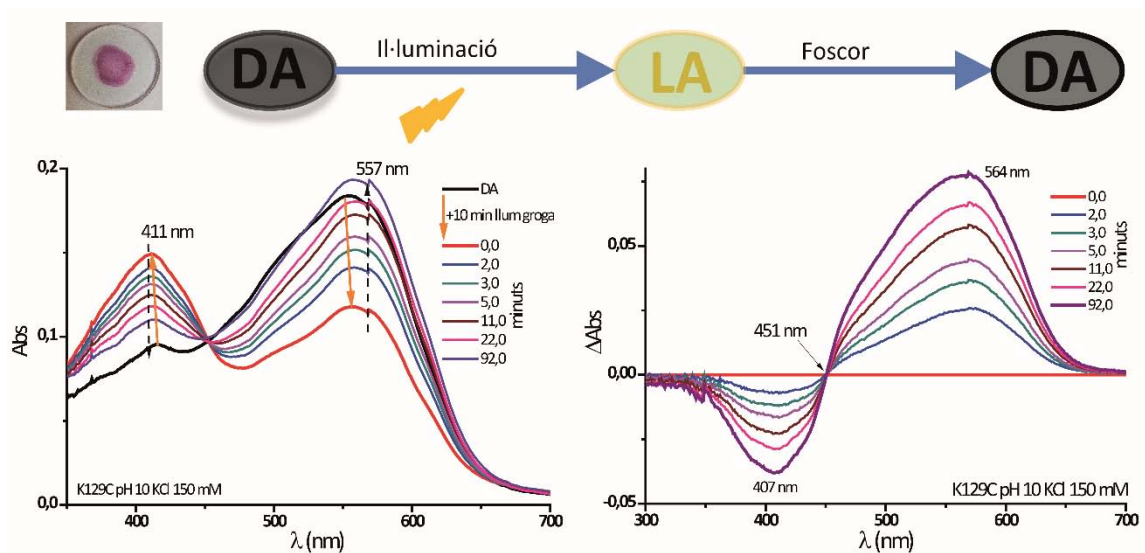


Fig. 147. A dalt, esquema de l'experiment. La mostra adaptada a la foscor (DA) s'il·lumina 10 minuts amb llum groga per formar la mostra adaptada a la llum (LA), que té un pic d'absorció màxima a 411 nm, i després mantenir la mostra en la foscor i anar adquirint espectres d'absorció a diferents temps per seguir l'adaptació a la foscor. Baix i esquerra, espectres d'absorbància representatiu d'una mostra adaptada a la foscor (DA) i a diferents temps (en minuts) d'estar a la foscor després de ser il·luminats. Baix dreta, espectres de diferència a cada temps en la foscor respecte al temps zero després d'il·luminar, per a veure la variació de l'absorbància amb el temps d'adaptació a la foscor.

De moment, s'ha vist que l'espècie que es forma té un màxim d'absorció a 411 nm i que és interconvertible amb la bR en estat basal. Una última comprovació per a assegurar-se de que es tracta de l'intermediari M seria il·luminar amb llum blava la mostra després d'il·luminar-la amb groga. Es pot forçar la conversió de l'intermediari M a l'estat basal mitjançant la llum blava, així que si il·luminem amb llum blava aquesta espècie i es forma de nou la bR en estat basal més ràpidament que simplement deixant en la foscor, seria la comprovació de que en efecte aquest mutant en films presenta un intermediari M de vida mitja molt llarga.

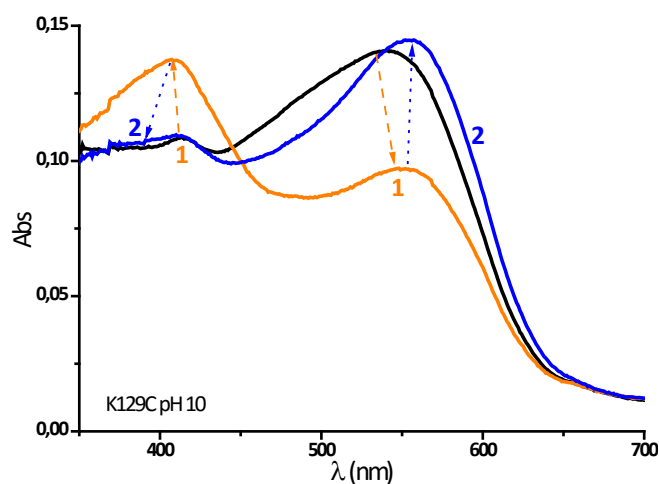


Fig. 148. En negre surt l'espectre d'absorció de la mostra adaptada a la foscor, el groc el de la mostra adaptada a la llum i el blau el de la mostra després d'il·luminar-la 3 minuts amb llum blava.

Amb llum blava s'ha eliminat l'espècie groga, pel qual ja parlarem d'intermediari M. Una vegada establert que el color groguenc es deu a l'intermediari M i que es converteix en bR en estat basal mantenint-lo a la foscor, podem repetir el procés amb el doble mutant i en més condicions, així com calcular la vida mitjana ajustant a una corba exponencial la variació de l'absorbància en el punt on la variació és màxima respecte al temps.

Les condicions dels films que s'han estudiat són pH 7 o pH 10 i amb una humitat alta o humitat ambiental (molt menor a la que es considera alta en els experiments de FTIR).

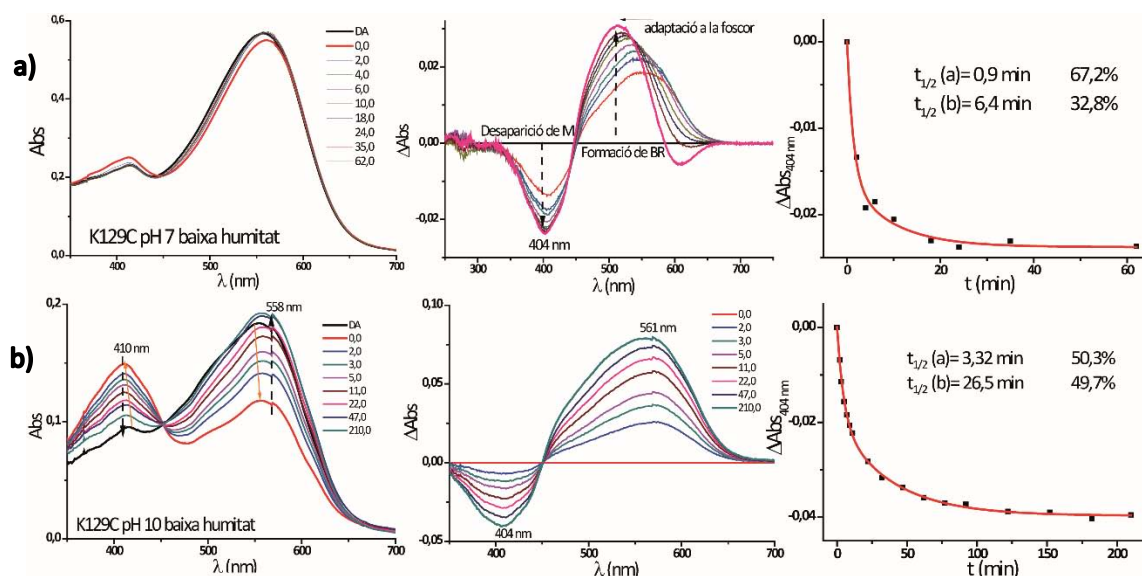


Fig. 149. En aquesta figura veiem els resultats per als films amb baixa humitat del mutant K129C, A l'esquerra veiem l'espectre d'absorció en la foscor i a diferents temps en la foscor després d'il·luminar. Al centre, estan representats els espectres de diferència en els que veiem la variació de l'absorbància a cada temps respecte al primer espectre al deixar d'il·luminar (temps zero en la foscor). A la dreta, es representa la variació d'absorbància de l'intermediari M amb el temps per a calcular el temps de vida mitja d'aquest. El % representa la proporció que representa cada component respecte al total. **a)** Espectres a pH 7. **b)** Espectres a pH 10.

Per a calcular la vida mitjana de l'intermediari M utilitzem el mateix mètode que per a calcular l'estabilitat química del centre actiu. A la figura 143 veiem com són els espectres en el mutant K129C però els dels dobles mutants tenen la mateixa forma però varien els valors.

A la Fig. 149. veiem que a pH 10 s'acumula més intermediari M i que a pH 7 s'ha de recórrer a l'espectre de diferència per a apreciar que es detecta una mínima formació de M de llarga vida. Aquest intermediari M de vida llarga detectat en films de K129C a pH 7 decau amb dos components de vida mitjana de 0,9 i 6,4 minuts.

Humitat	pH	K129C		K129C/F71Cred		K129C/F71Cox	
		t _{1/2} a (%)	t _{1/2} b (%)	t _{1/2} a (%)	t _{1/2} b (%)	t _{1/2} a (%)	t _{1/2} b (%)
Alta	pH 7	DA-LA	-	DA-LA	-	DA-LA	-
	pH 10	DA-LA	-	DA-LA	-	DA-LA	-
Baixa	pH 7	0,9 (67,2)	6,4 (32,8)	1,8	-	7,2	-
	pH 10	3,8 (50,3)	25,7 (49,7)	8,8 (63,9)	116,0 (36,1)	1,7 (26,8)	24,1 (73,2)

Taula 19. En aquesta taula es representen els valors del temps de vida mitjà de l'intermediari M en el mutant K129C, K129C/F71Cred i K129C/F71Cox a les diferents condicions de pH i humitat. a i b indiquen que hi ha més d'un component en la desaparició de M. DA-LA indica que sols s'observa l'adaptació llum-foscor de l'estat basal. El % indica quina part de la variació d'absorbància correspon a cada component. El temps està indicat en minuts.

A pH 10 quan s'il·lumina la mostra el pic que correspon a l'intermediari M es veu molt clarament i el pic de bR en estat basal disminueix fins al 50%. La cinètica de decaïment de M ajusta a dos components que representen la mateixa proporció de variació d'absorbància. El primer té una vida mitjana de 3,8 minuts i el segon de 25,7 minuts. S'ha de notar el canvi respecte a la bR en condicions natives, ja que mentre en la cèl·lula el fotocicle dura en total uns 10 mil·lisegons, amb aquest mutant i en aquestes condicions l'intermediari M dura quasi mitja hora, que és unes $1,6 \times 10^5$ vegades més lent que el fotocicle en condicions natives.

Els mutants dobles a pH 7 també acumulen intermediari M. Hi ha diferències entre el mutant K129C/F71Cred i K129C/F71Cox, però l'alta variabilitat dels experiments, ja vista en anteriors estudis de mutants amb fotointermediari M de vida llarga [307], farà que utilitzem aquests valors com a orientatius, com a tendències i no com a valors absoluts comparables, així que en principi determinar l'efecte de la fixació de les hèlixs no seria possible. La cinètica de decaïment de M en el doble mutant K129C/F71Cred mostra una vida mitjana d'1,8 minuts i de 7,2 en K129C/F71Cox.

A pH 10 ambdós formes del doble mutant ajusten a dos components. El fet de que el doble mutant reduït tingui un component lent amb una vida mitjana de 116 minuts, unes 2 hores, ens fa una idea de com de lent pot arribar a ser el decaïment de M, de com podem allargar la vida mitjana de l'intermediari M modificant les condicions de la mostra. Així, mentre en els dobles mutants en dissolució la cinètica de decaïment de M és molt semblant a la de WT (veure taula 13), modificant el pH i la forma de presentació de la proteïna (passar de dissolució a film) hem aconseguit que el temps de desaparició de M mesurat passi de 54,4 μ s a un valor màxim de 2 hores.

K129C/F71Cred		
$t_{1/2} a$ (%) (min)	$t_{1/2} b$ (%) (min)	
9,9	141,8	Mostra α
7,7	90,2	Mostra β
8,8 \pm 1,1	116,0 \pm 25,8	Mitjana de α i β
0,6	12,7	Mostra α 3 dies després
1,8	15,3	Film del portamostres utilitzat per a fotòlisi de llampec amb un any d'antiguitat.

Taula 20. Valors del temps de vida mitjà de l'intermediari M en el mutant K129C/F71Cred en un film a pH 10 i baixa humitat. a i b indiquen que hi ha més d'un component en la desaparició de M. El temps està indicat en minuts. Després de la barra grisa s'indiquen els temps mitjans de mostres que no han sigut preparades el mateix dia de la mesura.

Un altre factor que afecta la vida mitjana de M és el temps de la mostra. A la taula 20 es mostren els valors del decaïment de M de diferents mostres, les primeres de mostres preparades expressament per a l'experiment i les dues últimes són repeticions amb mostres no acabades de preparar. Es veu que si la mesura es fa en una mostra amb 3 dies d'antiguitat la vida mitjana decreix des de 116 minuts en el cas del component lent, fins a 12,7 minuts. Encara que en poc de temps la vida mitjana ha disminuït molt, mesurar amb una mostra amb un any d'antiguitat mantinguda a la foscor i a temperatura ambient ens dóna uns valors semblants al de la mostra de 3 dies. Un any després el mutant de bR K129C/F71Cred en un film a pH 10 i baixa humitat segueix amb una vida mitjana de l'intermediari M de 15,3 minuts.

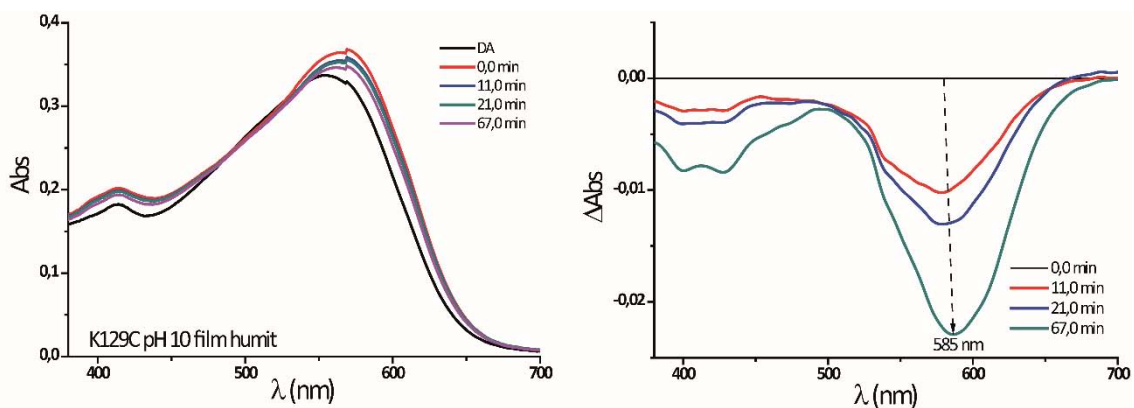


Fig. 150. Als mutants K129C i K129C/F71Cred i K129C/F71Cox en condicions d'alta humitat no es veu acumulació d'intermediari M. L'absorbància al pic de la bR en estat basal augmenta a l'il·luminar però degut a l'efecte de l'adaptació a la llum de la proteïna. Després, durant la incubació en la foscor, es veu com la proteïna es va readaptant a la foscor, tal com es veu a l'espectre de diferència de la dreta, on l'únic canvi és una disminució de l'absorbància amb el temps a 585 nm, sense cap rastre de canvis en el temps al voltant dels 411 nm.

La humitat en els films no afavoreix l'acumulació d'intermediari M. En cap dels tres mutants, ni a pH 7 ni pH 10 en condicions d'alta humitat es detecta intermediari M. Els únics canvis que es veuen són els deguts a l'adaptació de la proteïna de la llum a la foscor, tal i com s'indica a la taula 19.

Estudi dels films per fotòlisi de llampec.

Per estudiar els films mitjançant la tècnica de fotòlisi de llampec, els films s'han preparat sobre portamostres de vidre i s'ha treballat amb films a pH 10 i baixa humitat ja que a l'apartat anterior s'ha determinat que són les millors condicions. La col·locació dels components de l'aparell s'ha hagut de modificar, substituint la cubeta de quars i el portacubetes per un suport per al portamostres, de manera que aquest queda col·locat on coincideixen el feix del làser i el de la làmpada.

Com aquest experiment tal i com està plantejat no s'ha fet abans, primer s'ha d'estudiar el comportament de WT. Als experiments s'ha treballat amb un filtre blau a la làmpada, per tal de filtrar la llum i deixar passar sols la de 411 nm i així eliminar soroll de les mesures i evitar l'excitació de nou de la mostra.

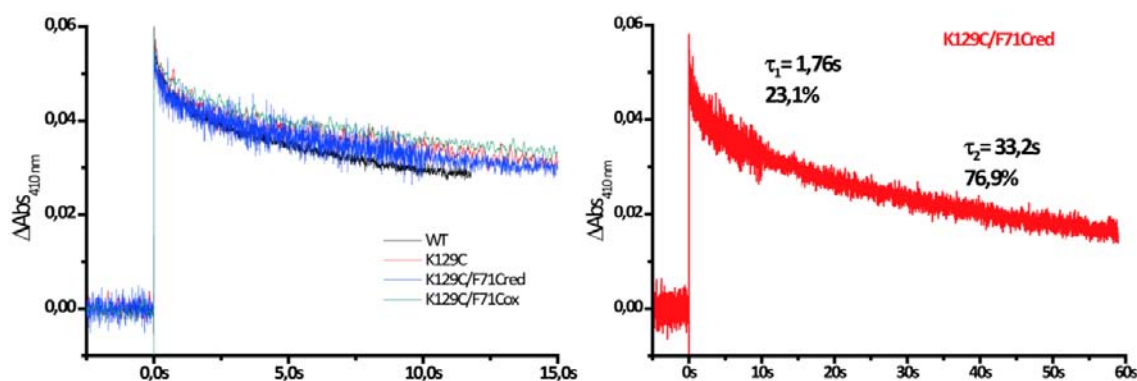


Fig. 151. A l'esquerra es representa l'evolució temporal de l'absorbància de l'intermediari M dels diferents mutants i de WT. Es representa la variació d'absorbància a 410 nm respecte a la mostra sense excitar respecte al temps. A diferència dels experiments en dissolució aquosa, en aquests sols ens interessa la desaparició de l'intermediari M. Açò junt a que l'escala de temps és diferent, no fa necessari treballar amb una escala logarítmica de temps.

A la figura 145 esquerra veiem les cinètiques de l'intermediari M de WT, K129C, K129C/F71Cred i K129C/F71Cox en films secs, pH 10 i temperatura ambient. Es pot veure com aquestes condicions han allargat el temps de decaïment de l'intermediari M per a tots ells, sent necessari treballar en una escala temporal de segons en compte de mil·lisegons. Es pot ajustar la corba de decaïment de M per a calcular el temps de vida mitja tal i com es veu a la figura de la dreta. La resolució màxima de l'aparell de fotòlisi de llampec és de 60 segons i no és suficient per seguir el decaïment de M fins a zero.

Aquesta limitació temporal fa que sigui necessari combinar aquest mètode amb l'anterior per poder seguir la desaparició de M fins a tornar tota la mostra a l'estat basal.

La fotòlisi de l'lampec ens permet doncs estudiar el decaïment de M els primers moments i amb major precisió i l'espectroscòpia de UV-Vis ens permet estudiar aquest decaïment a temps més llargs encara que amb menys resolució temporal.

	WT	K129C		K129C/F71Cred		K129C/F71Cox	
μ_1	2,0 (34,4)	1,45 (22,7)		1,76 (23,1)		2,0 (26,5)	
μ_2	21,2 (65,6)	44,5 (77,3)	x2,1	33,2 (76,9)	x1,6	41,2 (73,5)	x1,9

Taula 21. Valors de τ en segons de la cinètica de desaparició de l'intermediari M en WT i els mutants extracel·lulars a KCl 150 mM pH 10, films humits i temperatura ambient. Entre parèntesi es representen els percentatges que representen cada component respecte del total de la variació d'absorbància durant la desaparició de M.

El primer component té una vida mitjana molt semblant a WT i els mutants i el segon component és més lent als mutants. WT presenta un component lent de decaïment de M en aquestes condicions amb una vida mitjana de 21,2 segons, que encara que és molt més lent que en dissolució aquosa no és possible veure'l a simple vista. Aquest segon component als mutants és entre 1,6 i 2,1 vegades més lent que en WT. Degut a la limitació en la resolució temporal de l'experiment, s'ha pogut veure que el decaïment de M és més lent als mutants que en WT però no es pot apreciar quant més lent pot arribar a ser. Per això, aquest experiment ens serveix per a dos coses:

- Ens permet comparar la cinètica de decaïment de M en solució aquosa i en films amb baixa humitat, mostrant que controlant la presència d'aigua a la mostra podem modular la duració de l'intermediari M.
- Ens aporta una prova de que en aquestes condicions el decaïment de M als mutants també és més lent que en WT.

A més, a l'experiment amb els films i l'espectrofotòmetre de UV-Vis també s'ha pogut veure l'efecte del pH, informació amb la qual es demostra que la duració de l'intermediari M també es pot modular amb el pH.

A la Introducció s'enumeraven una sèrie de característiques de la bR que la feien adient com a material biològic per aplicacions biotecnològiques (punt 11), tals com l'alta resistència a temperatures altes, la seva estabilitat en el temps o que toleri un ampli rang de pHs. A més, es van enumerar possibles aplicacions als diferents esdeveniments moleculars que ocorren durant el funcionament de la bR. Ara concretament, farem referència a la proposta d'utilitzar el fotocromisme de la bR com a base per a construir memòries, com a eina per a emmagatzemar informació.

Per a emmagatzemar informació serien necessaris dos estats estables interconvertibles que funcionessin a mode dels 0 i 1 dels transistors usats habitualment en informàtica. De les dues possibilitats explicades en la introducció, ens centrarem en l'ús de l'estat basal (BR) i l'intermediari M com a 0 i 1, com a estat OFF i estat ON. Els

avantatges d'utilitzar aquest dos estats són l'alt rendiment quàntic (del 64%), la reversibilitat i el gran desplaçament fotocromic (150 nm).

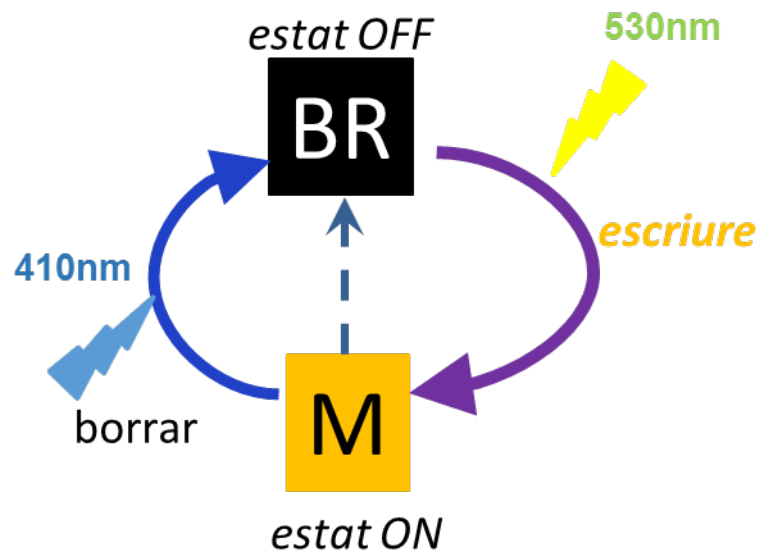


Fig. 152. Esquema bàsic de com funcionaria l'escriptura i eliminació d'informació en un sistema basat en la bR en dos estats estables.

Com vam veure als experiments de fotòlisi de llampec el sistema de la figura 146 en solució aquosa no seria viable ja que la vida mitjana de l'intermediari M és de l'ordre de mil·lisegons i el desitjable seria que fos de l'ordre de segons. Fins ara ja hem vist algunes estratègies per a estabilitzar l'intermediari M i hem demostrat que funcionen. Aquestes estratègies eren treballar amb films de proteïna, la modulació del pH i de la humitat i l'ús de mutants. Altres estratègies serien l'ús d'additius.

Per a fer ús de la bR en aplicacions biotecnològiques també seria necessari poder unir la proteïna a superfícies mitjançant alguna de les següents estratègies ja provades:

- Auto-acoblament a través d'interaccions hidrofòbiques.
- Unió covalent usant tiols com a enllaços.
- Conjugats de biotina-bR.
- Ús de mutants de cisteïna.

En el nostre cas, la última opció és obvia al treballar amb mutants de cisteïna i més quan aquestes mutacions es situen prop de la superfície de la proteïna. Aquesta opció no seria vàlida per al doble mutant K129C/F71Cox i si per al reduït i el mutant simple.

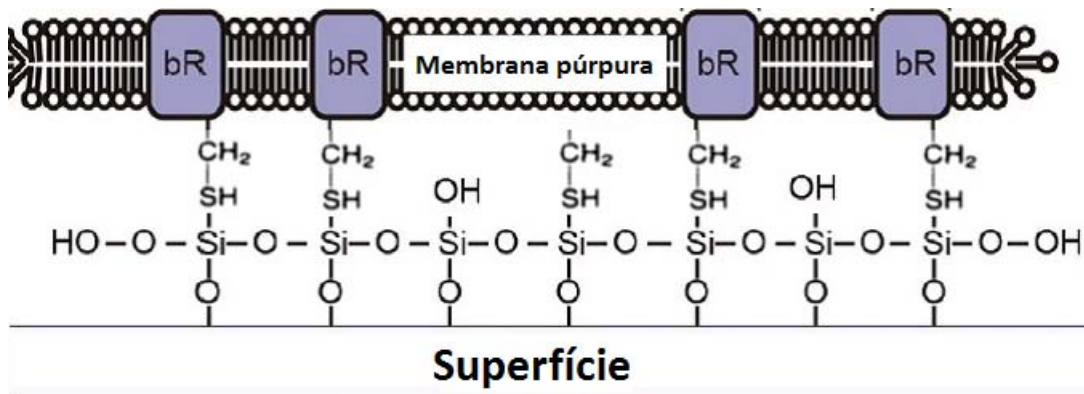


Fig. 153. Esquema d'un fragment de membrana púrpura unida a una superfície a través de cisteïnes.

En un sistema per a emmagatzemar informació basat en intermediari M de vida llarga, els nostres mutants K129C i K129C/F71Cred reuneixen les característiques que hem destacat com a necessàries per a implementar-los com a material biològic en aplicacions biotecnològiques:

- Una alta tolerància a les altes temperatures, sent la temperatura de desnaturalització en solució aquosa superior als 80 °C.
- Molt estables en el temps.
- Resistència a digestió enzimàtica.
- Tolerància a un ampli marge de pH.
- Gran desplaçament fotocromic (150 nm).
- Reversibilitat entre els dos estats.
- La vida mitjana mesurada del component lent de l'intermediari M en films amb baixa humitat i pH 10 arriba a ser de 2 hores en el cas del doble mutant, $1,6 \cdot 10^6$ vegades més lent que en WT en solució aquosa.

L'objectiu d'estudi inicial era esbrinar el paper de la mobilitat de les hèlixs per al correcte funcionament de la bR. Però com hem vist, aquests mutants extracel·lulars a més han aportat informació sobre l'efecte a llarga distància de la superfície extracel·lular de la bR i a més sota certes condicions de preparació, pH i humitat els mutants reuneixen moltes característiques que els fan idonis per a construir dispositius d'emmagatzematge d'informació basats en bR.

Discussió general

1. Visió general.

L'aproximació utilitzada en aquest treball per a l'estudi del paper del moviment de les hèlixs ha sigut el disseny de dobles mutants de cisteïna amb cada mutació situada en hèlixs diferents i la posterior immobilització del moviment mitjançant la formació de ponts disulfur. En anteriors treballs ja es va utilitzar aquesta aproximació amb bons resultats, sobretot en l'estudi del moviment de l'hèlix F i la G. Per a l'estudi del moviment de l'hèlix E i F es va dissenyar el doble mutant F153C/R175C però les mutacions simples alteraven el funcionament normal de la bR [251]. En algunes situacions, com en la cinètica dels intermediaris, l'oxidació de les cisteïnes recuperava parcialment el comportament natiu de la proteïna i en altres, com el transport de protons, ho afectava encara més.

En una situació ideal, la mutació simple del residu natiu per la cisteïna no hauria d'afectar a la bR, però aquest no fou el cas. Per continuar definint el rol del moviment relatiu de les hèlixs E i F en aquest treball s'han dissenyat i estudiat dos dobles mutants, el T157C/K172C i el A160C/A168C.

Amb el doble mutant E166C/A228C es fixaven les hèlixs F i G, es determinava que era necessari el moviment coordinat d'aquestes hèlixs actuant com a estructures rígides per a un transport de protons eficient i s'aportaven proves per a recolzar la hipòtesi del comportament tipus palanca en les proteïnes de la família de les 7TM [222]. A més d'actuar com a estructures rígides, calia un mecanisme per a separar el moviment a la part citoplasmàtica de les hèlixs del de la part extracel·lular, cosa que en el cas de l'hèlix F ho permetria la Pro186.

Per tal de continuar amb l'estudi dels moviments de les hèlixs durant el fotocicle al costat citoplasmàtic, s'ha dissenyat el mutant V101C/M163C per a connectar mitjançant pont disulfur l'hèlix C amb el bucle EF. Segons treballs previs, l'hèlix F durant el seu desplaçament cap a fora arrastraria a l'hèlix E fent-la girar [141], mentre que l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix C romandria inalterat [147, 200]. Aquest doble mutant ha de permetre estudiar què passava si ancorem el bucle EF a l'hèlix C.

Aquests moviments de les hèlixs al costat citoplasmàtic durant els intermediaris M i N del fotocicle havien de contrarestar-se amb moviments de les hèlixs A, B, D i E pel costat extracel·lular [208], moviment que faria la funció de mecanisme de *switch*, canviant l'accessibilitat del dissolvent del costat citoplasmàtic a l'extracel·lular per a assegurar la vectorialitat del transport de protons. En aquest sentit, el doble mutant extracel·lular L13C/L61C s'ha dissenyat per a estudiar el moviment de les hèlixs A i B. A més podria aportar informació sobre el moviment de A respecte a G, les quals tenen cadenes laterals que interaccionen participant en l'acumulació de l'intermediari M [211].

Discussió general

El mutant F71C/K129C s'ha dissenyat per a estudiar el moviment del bucle DE respecte al BC. Les hèlixs D i E no contenen prolines, residu que és disruptor d'hèlix α i com s'ha dit abans en alguns casos podria permetre el moviment independent dels dos extrems d'una hèlix. Degut a l'absència de prolines que poguessin funcionar com a frontissa (bisagra) s'esperaria que el moviment de l'hèlix E al costat citoplasmàtic es traslladés cap al costat extracel·lular, moviment que es dificultaria amb la formació del pont disulfur en aquest doble mutant. Com aquests moviments de les hèlix A, B, D i E farien de mecanisme de *switch*, s'esperaria que aquest fos afectat per la restricció del moviment.

2. Mutants citoplasmàtics.

Una vegada s'ha fet un repàs general al moviment de les hèlixs durant el fotocicle i als mutants estudiats en aquest treball, es pot discutir sobre la base dels resultats obtinguts si l'efecte dels mutats ha sigut l'esperat i si es confirmen o no les propostes sobre el moviment de les hèlixs i el seu paper al fotocicle de la bR. A més, fins ara al treball s'havien estudiat els diferents dobles mutants per separat i ara cal relacionar aquests resultats en comú per a intentar extreure idees i conclusions generals.

a. Restricció del moviment de les hèlix E i F.

Com ja s'ha dit abans, l'elecció de les mutacions per continuar l'estudi de la flexibilitat de les hèlixs s'ha fet d'acord amb la proximitat de les mutacions i amb l'absència d'algun rol important a la proteïna descrit anteriorment. Així s'esperava aconseguir que els dobles mutants fossin el més semblants possibles a WT funcional i estructuralment. Anteriorment ja es va veure que mutar residus d'aquesta regió citoplasmàtica afectava a la proteïna, com per exemple s'havia vist que el mutant A168C tenia un decaïment de M un 50% més lent que WT [283], l'A160C tenia una cinètica de l'intermediari M i d'alliberament dels protons molt similar a WT [201], T157C també tenia una cinètica de M molt semblant a WT [283] i del K172C sols es sabia que no pertorbava la formació de l'intermediari O [211]. El mateix ha passat amb els dobles mutants T157C/K172C i A160C/A168C.

Però els dobles mutants reduïts presenten més diferències a més de les mencionades. En el doble mutant reduït T157C/K172C s'ha vist que la mutació d'aquests residus ha afectat lleugerament a l'adaptació llum-fosc de la proteïna i el canvi en la deslocalització electrònica del retinal degut a l'adaptació a la llum, el que s'ha plasmat amb un lleuger desplaçament en la longitud d'absorció màxima i el un menor augment del coeficient d'absorció del retinal degut a la seva adaptació a la llum [veure Taula 5]. Aquest menor augment del coeficient d'extinció molar és molt semblant a l'observat a l'altre doble mutant reduït de la zona, l'A160C/A168C. Aquests canvis menors són molt semblants en les formes oxidades d'aquests dos dobles mutants.

Més importants són els canvis en l'accessibilitat del dissolvent al RBP que es veu augmentada degut a alguna de les mutacions de T157C/K172C, l'estabilitat tèrmica disminueix uns 4 °C i el pK_a del Asp85 és lleugerament superior. La formació del pont disulfur no canvia l'accessibilitat del RBP però sí que disminueix el pK_a del Asp85 i recupera l'estabilitat tèrmica normal. En l'altre doble mutant de les hèlixs E i F, les mutacions no afecten ni a l'accessibilitat del RBP, ni al pK_a ni a l'estabilitat tèrmica però l'oxidació sí que afecta. Al mutant T157C/K172C, ja que les mutacions han afectat a la proteïna l'efecte de la restricció del moviment pot quedar parcialment emmascarada. En el cas del A160C/A168C es pot veure que a l'augmentar la rigidesa de l'extrem citoplasmàtic de les hèlixs E i F el RBP es torna més accessible al dissolvent, el centre actiu té una menor estabilitat tèrmica i el pK_a del Asp85 es veu lleugerament incrementat.

Les mutacions afecten de manera més important a la cinètica de l'intermediari M, retardant la seva formació i fent aparèixer un segon component en el decaïment d'aquest. La formació de l'intermediari M es deu a la protonació del Asp85 per part de la Base de Schiff i va acompanyada per l'alliberament d'un protó al costat extracel·lular. Aquests esdeveniments no tenen lloc a la zona de les mutacions però els resultats suggereixen que els residus de la zona serien importants ja que alterar-los dificulta lleugerament la desprotonació de la BS i de forma més important dificultarien la reprotonació del Asp96.

Com a pH 10 el segon component en el decaïment de M en WT es deu a un retorn de N a M degut a una acumulació de N pel bloqueig del pas de N a O, les mutacions han dificultat el pas de N a O a pH 7, potser degut en part a la formació de ponts d'hidrogen per part de les cisteïnes afectant a la captació del nou protó pel costat citoplasmàtic. En el cas del doble mutant A160C/A168C la formació del pont disulfur accelera el decaïment de M però no recupera els nivells de WT, mentre que al T157C/K172C el pont disulfur no modifica l'efecte de les mutacions [Taula 8]. En el primer cas la formació dels ponts d'hidrogen per part de les cisteïnes explicarien el canvi, però en el segon el canvi es deu a que els residus nadius ja no poden fer la seva funció en la captació del nou protó. Açò també es pot veure a la cinètica del transport de protons mesurat amb piranina. És en el pas de N a O quan un nou protó és captat del medi citoplasmàtic i per tant és quan la piranina recupera la seva absorbància inicial. Al mutant T157C/K172C tant l'alliberament del protó com la captació del nou es veuen endarrerits i l'oxidació no canvia els temps [veure Fig. 79]. En canvi, a l'A160C/A168C l'oxidació accelera la captació del nou protó [Fig. 81].

La formació de M i el decaïment en l'absorbància de la piranina mostren el mateix procés: la BS es desprotona per a protonar el Asp85 i aleshores el PRG allibera el protó al medi extracel·lular. Si el fotocicle és el que es veu afectat l'efecte deuria ser el mateix a ambdós experiments. Al mutant A160C/A168Cox la cinètica de M està lleugerament

Discussió general

endarrerida respecte a WT [Taula 8] però l'expulsió del protó mesurada amb piranina es veu accelerada, cosa que es deurà a que el protó difon més ràpidament i arriba abans a les molècules de piranina. Aquest alliberament ocorre al costat extracel·lular, el costat contrari on se situen les mutacions pel qual l'efecte de la formació del pont disulfur hauria de transmetre's a llarga distància per exemple a través de l'hèlix E funcionant com a un cos rígid, possiblement facilitat per l'absència de prolines que facin de disruptores d'hèlixs. En aquest mutant, A160C/A168Cox, el transport de protons mesurat amb liposomes [Taula 10] i amb piranina disminueix i la BS i el Asp96 es reprotonen abans (M decau més ràpid i l'absorbància de la piranina es recupera abans) que al mutant reduït [Taula 8, Fig. 81]. Sobretot és el component M^s el que s'accelera, el qual prové del retorn de N a M degut a que el pas de N a O es veu dificultat. Aquest pas de N a O consisteix en la reprotonació del Asp96 i en la reisomerització del retinal de *13-cis* a *tot-trans*. Aquest esdeveniment si que ocorre al costat citoplasmàtic.

Quins canvis en la caracterització estructural s'han observat en el mutant A160C/A168Cox respecte a A160C/A168Cred? Hi ha canvis en l'accessibilitat de la BS al dissolvent i en el pK_a del Asp85, concretament la BS es torna més accessible al dissolvent i el Asp85 té més facilitat per a protonar-se (el seu pK_a ha augmentat) [Taula 5]. Com podem relacionar totes aquestes observacions? Una possible explicació seria que amb la fixació de l'hèlix E a l'hèlix F en un punt proper al bucle EF el que fem no és impedir el moviment de les hèlixs, sinó que el moviment de l'hèlix F durant l'intermediari M₂ arrastraria encara més a l'hèlix E, augmentant el seu moviment total. A l'augmentar el moviment de l'hèlix E la cavitat s'obriria més explicant la major accessibilitat al dissolvent observada al mutant A160C/A168Cox. A més, la major facilitat per a l'entrada de molècules d'aigua afavoriria la reprotonació del Asp96 (acceleració del pas de N a O), potser fent que el Asp96 estigui més accessible als aspàrtics de la superfície citoplasmàtica que farien d'antena captadora de protons o inclús afavorint que el protó vagi directament dels aspàrtics 102 o 104 al Asp96 en compte de fer-ho via Asp36 [159].

Als mutants de la zona citoplasmàtica de les hèlixs E i F s'observa que un major pK_a implica una menor eficiència en el transport, tal com es mesura amb piranina, però no es veu la mateixa correlació als mutants que afecten també a altres hèlixs (V101C/M163C).

Amb FTIR, en les condicions per atrapar l'intermediari M₂ es veu que les bandes que corresponen a canvis en les hèlixs sofreixen canvis més grans als mutants A160C/A168C en forma oxidada que a la reduïda, les variacions de les bandes respecte a la línia base són lleugerament majors als mutants A160C/A168Cox que als A160C/A168Cred, sobretot s'observa a la banda negativa situada en 1.657 cm⁻¹ [Fig. 109]. Encara que els canvis són petits, serien coherents amb la proposta de que al mutant oxidat l'hèlix F arrastra a l'hèlix E quan es mou a la segona meitat del fotocicle.

La segona meitat del fotocicle estaria afectada no pel moviment d'una sola hèlix, sinó pel desplaçament de la zona citoplasmàtica de l'hèlix F i de l'hèlix E, aquesta probablement desplaçant-se tota com a una peça. Aquests dos dobles mutants mostren la sensibilitat d'aquesta regió als canvis en els aminoàcids i la seva importància en l'estabilitat del centre actiu, afectant a paràmetres estructurals i funcionals de la bR. Per això tenir dos dobles mutants ajuda a poder separar l'efecte de les mutacions a la zona de l'efecte de la restricció del moviment de les hèlixs. Així, encara que amb T157C/K172C molts dels canvis han de ser atribuïts a les mutacions, A160C/A168C ha permès veure que la fixació de l'extrem citoplasmàtic de les hèlix E i F disminueixen l'eficiència, el transport total de protons i la velocitat inicial de transport. Aquest últim també es veu disminuït al fixar les hèlixs amb el mutant T157C/K172C.

b. Restricció del moviment de l'hèlix C i el bucle EF.

L'altre doble mutant citoplasmàtic s'ha dissenyat per a fixar el bucle EF a l'hèlix C. La forma reduïda ha mostrat efectes estructurals similars als dels mutants anteriors i l'oxidació no causa quasi canvis respecte al reduït. L'alteració més important es detecta en les proves funcionals on V101C/M163Cred mostra una formació i decaïment més lent de l'intermediari M [Taula 8]. La formació del pont disulfur no altera quasi la cinètica de l'intermediari M el que suggereix que els residus mutats són els causants. Estudis previs del mutant V101C mostraven una formació de M com en WT i un alliberament del protó lleugerament retardat [201]. En canvi el mutant M163, situat al bucle EF i damunt del Asp96 mostrava un decaïment de M un 50% més lent que el de WT [283] i es trobava en mutants amb la formació de l'intermediari O defectuosa [143]. La mutació de M163 explica part de la cinètica de M mesurada al doble mutant reduït i a més se sembla a la dels anteriors dobles mutants, confirmant de nou la importància dels residus de la zona del bucle EF.

Les mutacions introduïdes al doble mutant V101C/M163C, sobretot la M163C, causen els petits canvis estructurals que afecten al RBP i modifiquen la cinètica de l'intermediari M. A més causen una disminució en el rendiment del bombeig de protons, que disminueix un 50% el transport màxim de protons mesurat amb liposomes [Taula 10]. Ja en el mutant reduït es veu que el canvi de conformació del retinal de *13-cis:tot-trans* (2:1) a 100% *tot-trans* està afectat, com es pot veure pel desplaçament batocròmic de la forma adaptada a la foscor i la disminució de la variació de la longitud d'absorció màxima entre la forma adaptada a la foscor i l'adaptada a la llum (disminueix de 10 nm en WT a 3 nm als dobles mutats). L'alteració de la proporció de conformacions del retinal en l'estat basal pot ser una de les causes de la disminució del bombeig de protons, ja que l'eficiència de l'absorció dels fotons es veu disminuïda.

Una altra característica que podria contribuir a la disminució del bombeig de protons és la disminució del pK_a del Asp85 en estat basal, suggerint que el pK_a d'aquest podria

Discussió general

estar també afectat durant el fotocicle dificultant la protonació del Asp85 per part de la BS durant la formació de l'intermediari M, cosa que concorda amb que la formació de M₁ mesurada amb fotòlisi de llumpec a pH 7 sigui 6 vegades més lenta al mutant V101C/M163Cred respecte a WT i 7 vegades en el cas de V101C/M163Cox [veure Taula 8].

A pesar de la gran alteració causada per la mutació de M163, l'efecte de la fixació de l'hèlix C i el bucle EF és suficientment gran per a no quedar emmascarada. El mutant V101C/M163Cox presenta un transport màxim en liposomes de tan sols el 15% de WT [Taula 10], una eficiència d'alliberament del protó mesurat amb piranina d'un 25% de WT [Fig. 77] i una velocitat inicial de bombeig un 70% inferior a la de WT i un 75% a la del mutant reduït. Així, la mobilitat del bucle EF es mostra important per al transport dels protons i per al correcte funcionament del fotocicle. Les mutacions introduïdes donen lloc a una proteïna quasi defectiva en bombeig de protons i que, tal com es veu per FTIR en condicions per a atrapar l'intermediari N en WT i V101C/M163Cred, l'oxidada manté el Asp96 protonat i la Base de Schiff desprotonada, com en l'intermediari M. A més, en FTIR en condicions per a atrapar M₂ al mutant V101C/M163Cox les bandes corresponents a canvis en les hèlixs estan fortament disminuïdes [Fig. 90 i Fig. 96], fet que és coherent amb el paper proposat abans per a la zona citoplasmàtica de les hèlixs E i F. Fixant l'hèlix E a la F s'augmenta lleugerament el moviment total de hèlixs i fixant el bucle EF a l'hèlix C es disminueix.

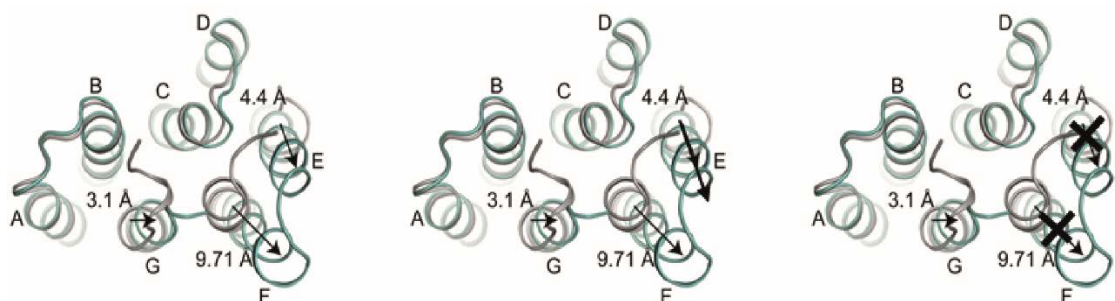


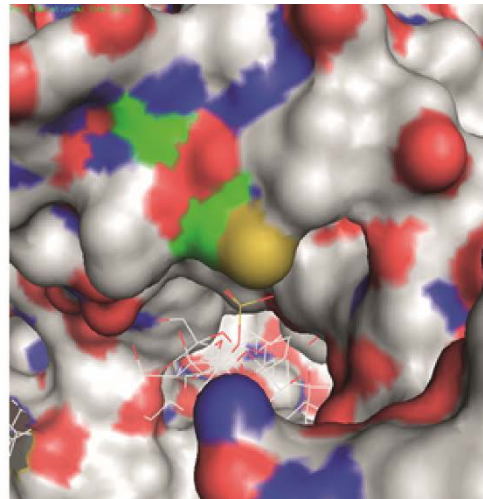
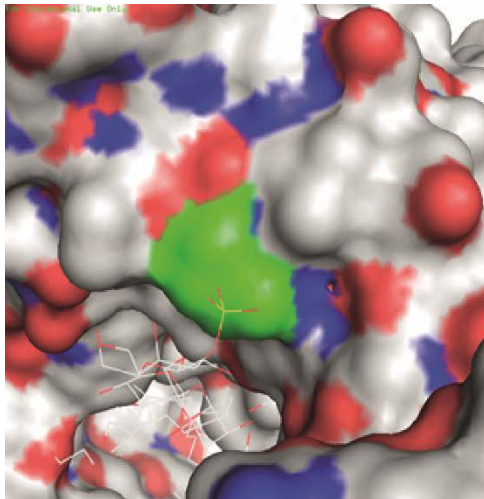
Fig. 154. Tres possibles situacions: **Esquerra)** Moviment de les hèlixs proposat per a WT. **Mig)** Moviment al fixar l'hèlix E a la F. El moviment de l'hèlix E s'accentua, obrint més l'espai entre les hèlixs. **Dreta)** Al fixar el bucle EF a l'hèlix C el bucle no es desplaça, afectant a la reprotonació de la BS, la desprotonació del Asp96 i al bombeig de protons [195].

A la figura 148 es representa el model suggerit pels resultats, segons els quals la fixació de les hèlixs E i F augmentaria el desplaçament de la primera i amb el mutant V101C/M163Cox s'impediria el moviment del bucle EF respecte a l'hèlix C, amb els efectes descrits.

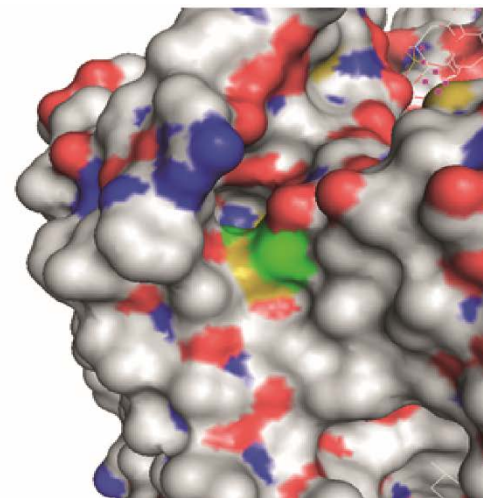
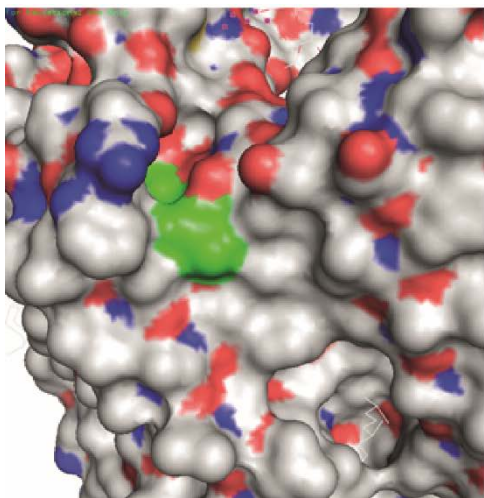
3. Mutants extracel·lulars.

Els resultats mostren que les mutacions dels residus de la superfície extracel·lular han afectat molt a l'estabilitat química, a l'accessibilitat del dissolvent a la butxaca

d'unió del retinal (RBP) [Taula 15]. Com es pot veure a la Fig. 153, a l'introduir les mutacions la zona perd volum, s'exposen més grups polars i residus interns al dissolvent. Es veu certa correlació entre l'exposició del RBP al dissolvent (mesurat com a estabilitat química) i l'alteració del pK_a aparent del Asp85, la variació del coeficient d'absorció molar ($\Delta\epsilon$) en l'adaptació llum-fosc [Taula 12], el transport mesurat amb liposomes [Taula 18] i l'acumulació de l'intermediari N en fotòlisi de llampec [Fig. 122 – 122]. O sigui, que a menor $t_{1/2}$ de l'estabilitat química veiem pK_a majors, menor $\Delta\epsilon$ i menor transport total de protons.



K129C/F71C



L13C/L61C

Fig. 155. Representació de la superfície de la bR. En blau s'indiquen els nitrògens, en vermell els oxígens, en gris els carbonis, en vermell els sofres i el verd els carbonis dels residus seleccionats. A l'esquerra es mostra com és en WT i a la dreta la dels mutants.

En comparació amb els mutants citoplasmàtics, els residus mutats al costat extracel·lular són més importants en quant al seu paper en l'estabilitat estructural,

Discussió general

entesa aquesta com al conjunt de l'estabilitat tèrmica i química i al correcte funcionament del RBP en estat basal.

L'augment en l'accessibilitat del RBP al dissolvent junt a la certa correlació que hem explicat que s'observa entre l'alteració de l'accessibilitat i l'afectació de la proteïna, suggereix que és la major accessibilitat de les molècules d'aigua al RBP el que causaria l'afectació del pK_a aparent del Asp85 i de l'adaptació llum-fosc. Aquestes molècules d'aigua amb major llibertat per a entrar i sortir de l'interior de la proteïna afectaria a les xarxes de molècules internes alterant el RBP amb els següents efectes:

- El Asp85 tindria una major facilitat per a protonar-se (pK_a més elevat).
- La deslocalització electrònica del retinal es veu afectada disminuït la $\Delta\epsilon$ i afectant lleugerament la $\Delta\lambda_{m\grave{a}x}$.

Com el pK_a del Asp85 s'ha vist afectat afavorint la seva protonació, el grup alliberador del protó (PRG) també veuria pertorbat el seu pK_a , ja que ambdós grups tenen acoblats els seus pK_a [165]. Açò explicaria la més ràpida formació de M a pH 7 mesurada amb fotòlisi de llampec, tant que sembla una cinètica obtinguda a pH 10. Tant el fotocicle com l'eficiència de l'absorció de protons es veuria afectada, quedant reflectit en el baix transport de protons mesurat.

a. Restricció del moviment dels bucles BC i DE.

En fotòlisi de llampec si la variació d'absorció màxima a 410 nm (longitud d'ona on absorbeix l'intermediari M) és igual en el mutant i en WT, però la variació a 570 nm (on absorbeix BR i N) és menor en el mutant, suggereix que el fotocicle tornaria a l'estat basal directament des de l'intermediari M sense passar per N/O, almenys en part de les molècules. Al mutant K129C/F71C tant a pH 7 com a pH 10 la relació entre $\Delta Abs_{410\text{nm}}$ i $\Delta Abs_{570\text{nm}}$ és menor que a WT i no es detecta acumulació de l'intermediari O [Fig. 122], indicant que almenys part de les molècules tindrien un fotocicle amb la forma BR \rightarrow M \rightarrow BR. La formació del pont disulfur al doble mutant K129C/F71C retorna certa estabilitat química a la proteïna (és un 32% de la de WT però el doble que la del mutant reduït) el que repercuteix en que el fotocicle es pugui completar millor, ja que la proporció entre la variació d'absorbència a les dues longituds d'ona és quasi com la de WT i es veu una mica d'acumulació de l'intermediari O, indicant que el fotocicle tindria la forma BR \rightarrow M \rightarrow N/O \rightarrow BR.

A més treballant amb FTIR en condicions per atrapar M₂ en WT el mutant K129C/F71C roman en N [Fig. 135], sembla que la formació del pont disulfur afavoriria la formació de l'intermediari N. En estat basal la distància entre K129C i F71C és d'uns 4 Å mentre que si es forma el pont disulfur la distància es reduiria a 2 Å. Degut a l'absència de prolines a l'hèlix E, aquesta hèlix no tindria residus disruptors d'hèlix α i es

comportaria com una estructura rígida. Al formar el pont disulfur i apropar el bucle DE al bucle BC l'extrem citoplasmàtic de l'hèlix E es mouria cap a fora, allunyant-se de l'hèlix C i acompanyant l'hèlix F en el seu moviment, facilitant l'obertura de la cavitat afavorint la formació de l'intermediari N, intermediari en el qual la BS és protonada pel Asp96. Aquest efecte seria el contrari al causat per la fixació del bucle EF a l'hèlix C pel costat citoplasmàtic (V101C/M163Cox).

La reacció de la hidroxilamina amb la BS es veu accelerada sota condicions d'il·luminació ja que la obertura de les hèlixs de la bR durant l'intermediari L afavoriria l'entrada de les molècules de HA [85]. En aquests mutants K129C/F71C i K129C hem vist que la reacció de la hidroxilamina ocorre molt més ràpidament que a WT [Taula 15]. Aquest fet junt a l'observació de que en FTIR en algunes condicions els mutants no presenten quasi canvis en la regió de l'Amida I [Fig. 134-133, Fig. 138-136] indicaria que aquests mutants manquen de moviments de les hèlixs degut a que aquestes ja estarien en posició oberta a l'estat basal. Açò faria que la HA sigui capaç d'hidrolitzar la BS durant més fases del fotocicle i no sols durant l'intermediari L i explicaria que no s'observessin canvis en la regió de l'Amida I entre l'intermediari M i l'estat basal mitjançant FTIR.

En el mutant simple K129C, amb el qual s'expliquen parcialment les característiques dels dobles mutants, es segueix un fotocicle normal $BR \rightarrow M \rightarrow N/O \rightarrow BR$, però en FTIR en condicions d'atrapar l'intermediari N en WT amb K129C s'atrapa l'intermediari M [Fig. 139], suggerint que els residus del bucle DE serien importants per a que l'hèlix E pogués sofrir els moviments necessaris per a la formació de l'intermediari N.

Els experiments a pH 10 es fan per a que la bR no disposi de protons que captar del medi i dificultar la desprotonació i reprotonació del Asp96, esdeveniments que marquen la formació de l'intermediari N i O respectivament. Quan en FTIR es treballa amb films amb baixa humitat és per a disminuir el nombre de molècules d'aigua disponibles per a que entrin en les cavitats de la bR durant el fotocicle.

Els mutants K129C/F71Cred, K129C/F71Cox i K129C són especialment sensibles a aquestes dues condicions, primer perquè tenen els pK_a del Asp85 molt alterats i segon perquè al tenir el RBP més accessible al dissolvent, aquesta major presència de molècules d'aigua que hem proposat serien les condicions «normals», dins del seu ja deficient comportament. Al treballar en condicions de baixa humitat s'afectaria molt més severament al fotocicle, el que ha dificultat l'estudi d'aquests mutants per FTIR però a la vegada ha permès estudiar els films per espectroscòpia de UV-Vis mostrant que en aquestes condicions posseeixen un intermediari M de vida mitjana molt llarga.

És doncs el paper dels residus dels bucles BC i DE en l'accessibilitat del dissolvent al RBP el que, en última instància, atorgarien als mutants les característiques idònies per a ser usats en la construcció de dispositius bioelectrònics d'emmagatzemament d'informació utilitzant un sistema binari basat en l'intermediari M i l'estat basal (BR).

b. Restricció del moviment de les hèlixs A i B.

Amb els mutants L61C i L13C/L61Cred i ox també s'ha augmentat l'accessibilitat del dissolvent al RBP amb els efectes ja descrits. S'ha proposat que el moviment de les hèlixs A i B seria important per a la recuperació de l'estat basal al final del fotocicle [208]. El que hem vist és que ja la sola mutació de L61C fa que part de les molècules vagin directament de M a BR durant el fotocicle [Fig. 128] i que l'efecte és encara més gran amb el doble mutant. La formació del pont disulfur fa que part de les molècules recuperin el fotocicle normal [Fig. 127.b].

Als mutants L13C/L61C hem substituït residus apolars rodejats d'altres residus apolars per uns polars. A més, Leu13 té a prop el Glu9 i diversos triptòfans amb una important funció d'ancoratge de la proteïna a la membrana, estabilització i control de l'estructura de la bR [304] i per a l'estabilitat del trímer [305]. Amb aquesta abundància de residus apolars, la formació del pont disulfur eliminaria els grups formadors de ponts d'hidrogen i retornaria part de la rigidesa conferida pels residus apolars interaccionant amb altres residus apolars en un ambient hidrofòbic, el que explicaria la parcial recuperació del fotocicle normal (BR → M → N/O → BR).

El desenvolupament dels diferents intermediaris seria més semblant a la de WT en el mutant L13C/L61Cox, però la transferència de protons no ho és. Tal com es veu amb la mesura de la cinètica de transport amb piranina [Fig. 132], L13C/L61Cox sembla que té invertit l'ordre d'alliberament i captació dels protons.

En L61C és mesura transport, encara que menys que a WT [Taula 18 i Fig. 133]. Amb L13C/L61Cred en liposomes es mesura una mica de transport total però no amb la piranina, segurament perquè la captació i alliberament dels protons se solapen temporalment [Fig. 132]. Amb L13C/L61Cox l'alliberament es produeix després de la captació.

El que queda clar és que l'extrem extracel·lular de les hèlixs A i B és molt sensible a les mutacions, produint-se desregulacions temporals dels intermediaris del fotocicle i canvis en l'estabilitat química que afecten al pK_a i a l'adaptació llum-fosc. La mobilitat relativa de les hèlix A i B (mobilitat d'una respecte a l'altra) sembla tenir certa importància per a la formació dels darrers intermediaris del fotocicle, ja que es forma més N i O en L13C/L61Cox que en L13C/L61Cred. A més, els residus d'aquesta zona afectarien el grup alliberador del protó (PRG) possiblement per la proximitat del residu Glu9.

Proposàvem que la fixació de les hèlixs A i B recuperava parcialment la capacitat de la proteïna per a fer el fotocicle complet però altera l'ordre d'alliberament i captació dels protons, segurament perquè el desplaçament relatiu de l'hèlix A respecte a la B no és important per al transport de protons però si la seva reorientació, que quedaria

alterada en L13C/L61C i impedida en L13C/L61Cox. Aquesta reorientació dels extrems extracel·lulars de les hèlixs A i B seria important en la regulació de l'alliberament del protó per part del PRG i el moviment conjunt d'A i B per a la correcta formació dels darrers fotointermediari. Amb FTIR hem vist que les bandes de la regió de l'Amida I corresponents a moviments de les hèlixs s'han vist reduïdes respecte a WT i més en el mutant L13C/L61Cred que en el L13C/L61Cox [Fig. 140-138] el que recolza la idea de que la mutació de les leucines per cisteïnes atenuarien els canvis estructurals d'hèlixs i la formació del pont disulfur recuperaria parcialment aquests moviments facilitant la realització del fotocicle.

Aquests resultats recolzen el model de tipus palanca i estructures rígides per a la funció de les proteïnes de membrana de la família de les 7TM. La rigidesa de les estructures seria major a la part extracel·lular, regió que seria especialment sensible a la mutació dels residus nadius, mentre que la part citoplasmàtica amb una major flexibilitat es veuria afectada per les mutacions puntuals però en menor grau.

Conclusions

- La mutació dels residus del costat citoplasmàtic Val101, Met163, Thr157, Lys172, Ala160 i Ala168 per cisteïnes i la formació dels ponts disulfur entre els residus dels mutants dobles V101C/M163C, T157C/K172C i A160C/A168C no afecten significativament l'estructura de la butxaca d'unió del retinal, el pK_a del Asp85 i l'estabilitat tèrmica de la proteïna.
- Els dobles mutants citoplasmàtics V101C/M63C i T157C/K172C tenen una menor estabilitat química del RBP però les alteracions observades es deuen més bé a les mutacions puntuals dels residus Val101, Met163, Thr157 i Lys172 que a la formació dels ponts disulfur dels mutants V101C/M163Cox i T157C/K172Cox.
- El moviment del bucle EF respecte a l'hèlix C és important per al transport de protons tal i com es veu per la restricció del moviment d'aquestes zones amb el mutant V101C/M163Cox.
- Les mutacions del costat extracel·lular K129C/F71C i L13C/L61C incrementen considerablement el pK_a aparent del Asp85, sent entre 1,6 i 2,7 unitats superior respecte a WT.
- La mutació dels residus de la superfície extracel·lular Leu13, Leu61, Phe71 i Lys129 per cisteïnes augmenten molt l'accessibilitat del dissolvent a la butxaca d'unió del retinal sent la t_{1/2} del doble mutant K129C/F71Cred 5,5 vegades més ràpida que WT i 17,5 vegades en el cas de L13C/L61Cred.
- La mutació dels residus Leu13, Leu61, Phe71 i Lys129 per cisteïnes tenen efectes a llarga distància ja que produeixen un canvi dramàtic en l'accessibilitat de la hidroxilamina a la BS i a més acceleren i estableixen l'intermediari M, la formació i desaparició del qual es deu a la desprotonació i reprotonació de la BS, esdeveniments que ocorren a la meitat citoplasmàtica de la bR.
- Els residus Leu13, Leu61, Phe71 i Lys129 del costat extracel·lular són importants en el transport de protons i la seva mutació l'afecta greument disminuint en transport total de protons fins a ser un 10% del de WT en el cas del doble mutant K129C/F71Cred i de tan sols un 6,5% del de WT en el mutant L13C/L61Cred.
- Els extrems extracel·lulars de les hèlixs A i B són importants en regular el moment de l'alliberament del protó. La fixació d'aquestes hèlixs en el mutant L13C/L61Cox canvia l'ordre d'alliberament i captació dels protons.
- La combinació de treballar amb films, baixa humitat i pH bàsic i les mutacions K129C i K129C/F71C són condicions per a que la bR tingui unes característiques adients per al seu ús com a material biològic per aplicacions biotecnològiques.

Bibliografia

1. Ventosa, A., et al., *The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments*. *Extremophiles*, 2014. **18**(5): p. 811-24.
2. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, *Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*, 1971. **233**(39): p. 149-52.
3. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, *Functions of a new photoreceptor membrane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(10): p. 2853-7.
4. Henderson, R. and P.N. Unwin, *Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy*. *Nature*, 1975. **257**(5521): p. 28-32.
5. Unwin, P.N. and R. Henderson, *Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens*. *J Mol Biol*, 1975. **94**(3): p. 425-40.
6. Ovchinnikov, Y.A., et al., *The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview*. *FEBS Lett*, 1979. **100**(2): p. 219-24.
7. Pebay-Peyroula, E., et al., *X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases*. *Science*, 1997. **277**(5332): p. 1676-81.
8. Hoflack, J., S. Trumpp-Kallmeyer, and M. Hibert, *Re-evaluation of bacteriorhodopsin as a model for G protein-coupled receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1994. **15**(1): p. 7-9.
9. Neumuller, M. and F. Jahnig, *Modeling of halorhodopsin and rhodopsin based on bacteriorhodopsin*. *Proteins*, 1996. **26**(2): p. 146-56.
10. Riek, R.P., et al., *Non-alpha-helical elements modulate polytopic membrane protein architecture*. *J Mol Biol*, 2001. **306**(2): p. 349-62.
11. Brzezinski, P. and R.B. Gennis, *Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries*. *J Bioenerg Biomembr*, 2008. **40**(5): p. 521-31.
12. Walker, J.E., *The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown*. *Biochem Soc Trans*, 2013. **41**(1): p. 1-16.
13. Saidijam, M., et al., *Active membrane transport and receptor proteins from bacteria*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 4): p. 867-72.
14. Hampp, N., C. Brauchle, and D. Oesterhelt, *Bacteriorhodopsin wildtype and variant aspartate-96 --> asparagine as reversible holographic media*. *Biophys J*, 1990. **58**(1): p. 83-93.
15. Kusnetzow, A., et al., *Nature of the chromophore binding site of bacteriorhodopsin: the potential role of Arg82 as a principal counterion*. *Biophys J*, 1999. **76**(5): p. 2370-89.
16. Hampp, N., *Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories*. *Chem Rev*, 2000. **100**(5): p. 1755-1776.
17. Oesterhelt, D., *Bacteriorhodopsin as a light-driven ion exchanger?* *FEBS Lett*, 1976. **64**(1): p. 20-2.
18. Padrós, E., C. Sanz, T. Lazarova, M. Márquez, F. Sepulcre, X. Trapote, F. X. Muñoz, R. Gonzalez-Moreno, J. L. Bourdelande and E. Querol, *Extracellular mutants of Bacteriorhodopsin as possible materials for bioelectronic applications*. *NATO Sciences Series*, 2001. **335**: p. 16.
19. Lanyi, J.K. and A. Pohorille, *Proton pumps: mechanism of action and applications*. *Trends Biotechnol*, 2001. **19**(4): p. 140-4.
20. Pohorille, A. and D. Deamer, *Artificial cells: prospects for biotechnology*. *Trends Biotechnol*, 2002. **20**(3): p. 123-8.
21. Birge, R.R., *Ordenadores de base proteómica*. Mayo, 1995: p. 5.
22. Bernado, P., et al., *Lanthanide modulation of the orientation of macromolecules induced by purple membrane*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(3): p. 374-5.
23. Schafmeister, C.E., L.J. Miercke, and R.M. Stroud, *Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins*. *Science*, 1993. **262**(5134): p. 734-8.
24. Heymann, J.B., et al., *Conformations of the rhodopsin third cytoplasmic loop grafted onto bacteriorhodopsin*. *Structure*, 2000. **8**(6): p. 643-53.

Bibliografia

25. Oesterhelt, D., L. Schuhmann, and H. Gruber, *Light-dependent reaction of bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of Halobacterium halobium: demonstration of an apo-membrane*. FEBS Lett, 1974. **44**(3): p. 257-61.
26. Drachev, L.A., et al., *Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin*. Nature, 1974. **249**(455): p. 321-4.
27. Kayushin, L.P. and V.P. Skulachev, *Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH*. FEBS Lett, 1974. **39**(1): p. 39-42.
28. Mendelsohn, R., *Thermal denaturation and photochemistry of bacteriorhodopsin from Halobacterium cutirubrum as monitored by resonance Raman spectroscopy*. Biochim Biophys Acta, 1976. **427**(1): p. 295-301.
29. Gerber, G.E., et al., *Partial primary structure of bacteriorhodopsin: sequencing methods for membrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 227-31.
30. Bayley, H., et al., *Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2225-9.
31. Engelman, D.M., et al., *Path of the polypeptide in bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2023-7.
32. King, G.I., et al., *Location of the chromophore in bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(8): p. 4726-30.
33. Mogi, T., et al., *Bacteriorhodopsin mutants containing single tyrosine to phenylalanine substitutions are all active in proton translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5595-9.
34. Butt, H.J., et al., *Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump*. Embo J, 1989. **8**(6): p. 1657-63.
35. Marinetti, T., et al., *Replacement of aspartic residues 85, 96, 115, or 212 affects the quantum yield and kinetics of proton release and uptake by bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 529-33.
36. Jubb, J.S., et al., *Retinal location in purple membrane of Halobacterium halobium: a neutron diffraction study of membranes labelled in vivo with deuterated retinal*. Embo J, 1984. **3**(7): p. 1455-61.
37. Stoeckenius, W., *The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaeobacterium*. Trends Biochem Sci, 1985. **10**(12): p. 483-6.
38. Henderson, R., et al., *Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy*. J Mol Biol, 1990. **213**(4): p. 899-929.
39. Varo, G. and J.K. Lanyi, *Kinetic and spectroscopic evidence for an irreversible step between deprotonation and reprotonation of the Schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry, 1991. **30**(20): p. 5008-15.
40. Varo, G. and J.K. Lanyi, *Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry, 1991. **30**(20): p. 5016-22.
41. Liu, D.X., et al., *Molecular modeling on kappa opioid receptor and its interaction with nonpeptide kappa opioid agonists*. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1999. **20**(2): p. 131-6.
42. ter Laak, A.M. and R. Kuhne, *Bacteriorhodopsin in a periodic boundary water-vacuum-water box as an example towards stable molecular dynamics simulations of G-protein coupled receptors*. Receptors Channels, 1999. **6**(4): p. 295-308.
43. Abdulaev, N.G., et al., *Grafting segments from the extracellular surface of CCR5 onto a bacteriorhodopsin transmembrane scaffold confers HIV-1 coreceptor activity*. Structure, 2002. **10**(4): p. 515-25.
44. Geiser, A.H., et al., *Bacteriorhodopsin chimeras containing the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin activate transducin for GTP/GDP exchange*. Protein Sci, 2006. **15**(7): p. 1679-90.
45. Scheuring, S., et al., *Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM*. Eur Biophys J, 2002. **31**(3): p. 172-8.

46. Kuhn, M., et al., *Automated alignment and pattern recognition of single-molecule force spectroscopy data*. J Microsc, 2005. **218**(Pt 2): p. 125-32.
47. de Groot, B.L., et al., *The fold of human aquaporin 1*. J Mol Biol, 2000. **300**(4): p. 987-94.
48. Grudinin, S., et al., *Water molecules and hydrogen-bonded networks in bacteriorhodopsin--molecular dynamics simulations of the ground state and the M-intermediate*. Biophys J, 2005. **88**(5): p. 3252-61.
49. Garczarek, F. and K. Gerwert, *Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy*. Nature, 2006. **439**(7072): p. 109-12.
50. Lorenz-Fonfria, V.A., Y. Furutani, and H. Kandori, *Active internal waters in the bacteriorhodopsin photocycle. A comparative study of the L and M intermediates at room and cryogenic temperatures by infrared spectroscopy*. Biochemistry, 2008. **47**(13): p. 4071-81.
51. Gerwert, K., E. Freier, and S. Wolf, *The role of protein-bound water molecules in microbial rhodopsins*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(5): p. 606-13.
52. Furutani, Y. and H. Kandori, *Hydrogen-bonding changes of internal water molecules upon the actions of microbial rhodopsins studied by FTIR spectroscopy*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(5): p. 598-605.
53. Bondar, A.N., S. Fischer, and J.C. Smith, *Water pathways in the bacteriorhodopsin proton pump*. J Membr Biol, 2011. **239**(1-2): p. 73-84.
54. Freier, E., S. Wolf, and K. Gerwert, *Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in a membrane protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11435-9.
55. Zhang, J., et al., *Crystal structure of deltarhodopsin-3 from haloterrigena thermotolerans*. Proteins, 2013.
56. Vogt, A., J. Wietek, and P. Hegemann, *Gloeobacter rhodopsin, limitation of proton pumping at high electrochemical load*. Biophys J, 2013. **105**(9): p. 2055-63.
57. Sineshchekov, O.A., et al., *Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins*. Biophys J, 2013. **104**(4): p. 807-17.
58. Schapiro, I. and S. Ruhman, *Ultrafast photochemistry of Anabaena Sensory Rhodopsin: Experiment and theory*. Biochim Biophys Acta, 2013.
59. Krause, N., et al., *Structural differences between the closed and open states of channelrhodopsin-2 as observed by EPR spectroscopy*. FEBS Lett, 2013. **587**(20): p. 3309-13.
60. Cao, Z., et al., *Novel expression and characterization of a light driven proton pump archaerhodopsin 4 in a Halobacterium salinarum strain*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1847**(4-5): p. 390-398.
61. Zhao, Z., et al., *Bacteriorhodopsin/Ag nanoparticle-based hybrid nano-bio electrocatalyst for efficient and robust h2 evolution from water*. J Am Chem Soc, 2015. **137**(8): p. 2840-3.
62. Tunuguntla, R.H., et al., *Transistors: bioelectronic light-gated transistors with biologically tunable performance (adv. Mater. 5/2015)*. Adv Mater, 2015. **27**(5): p. 773.
63. Dutta, S., et al., *Engineered-membranes and engineered-micelles as efficient tools for purification of halorhodopsin and bacteriorhodopsin*. Analyst, 2015. **140**(1): p. 204-12.
64. Renugopalakrishnan, V., et al., *Engineering a Robust Photovoltaic Device with Quantum Dots and Bacteriorhodopsin*. J Phys Chem C Nanomater Interfaces, 2014. **118**(30): p. 16710-16717.
65. Ihara, K., et al., *Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 163-74.
66. Ventosa, A.O., A., *Halobacterium salinarum nom. corrig., a Name To Replace Halobacterium salinarium (Elazari-Volcani) and To Include Halobacterium halobium and Halobacterium cutirubrum*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996. **46**(1): p. 1.

Bibliografia

67. Lanyi, J.K., *The role of Na⁺ in transport processes of bacterial membranes*. Biochim Biophys Acta, 1979. **559**(4): p. 377-97.
68. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, *Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane*. Methods Enzymol, 1974. **31**: p. 667-78.
69. van de Vossenberg, J.L., et al., *Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration*. Extremophiles, 1999. **3**(4): p. 253-7.
70. Stoeckenius, W. and R. Rowen, *A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration*. J Cell Biol, 1967. **34**(1): p. 365-93.
71. Houwink, A.L., *Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in Halobacterium halobium; an electron microscope study*. J Gen Microbiol, 1956. **15**(1): p. 146-50.
72. Dunn, R., et al., *The bacteriorhodopsin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6744-8.
73. Kates, M., *Structure, physical properties, and function of archaeobacterial lipids*. Prog Clin Biol Res, 1988. **282**: p. 357-84.
74. Stoeckenius, W. and R.A. Bogomolni, *Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 587-616.
75. Shahmohammadi, H.R., et al., *Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents*. J Radiat Res, 1998. **39**(4): p. 251-62.
76. Kolbe, M., et al., *Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1390-6.
77. Spudich, J.L. and R.A. Bogomolni, *Sensory rhodopsins of halobacteria*. Annu Rev Biophys Chem, 1988. **17**: p. 193-215.
78. Spudich, J.L., *Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor*. Cell, 1994. **79**(5): p. 747-50.
79. Blaurock, A.E. and W. Stoeckenius, *Structure of the purple membrane*. Nat New Biol, 1971. **233**(39): p. 152-5.
80. Yokoyama, Y., et al., *Dependence of purple membrane bump curvature on pH and ionic strength analyzed using atomic force microscopy combined with solvent exchange*. J Phys Chem B, 2014. **118**(31): p. 9322-8.
81. Grigorieff, N., et al., *Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin*. J Mol Biol, 1996. **259**(3): p. 393-421.
82. Fujiyoshi, Y., *Molecular structure of proton pump revealed with electron crystallography*. Faseb J, 1999. **13 Suppl 2**: p. S191-4.
83. Dencher, N.A. and M.P. Heyn, *Bacteriorhodopsin monomers pump protons*. FEBS Lett, 1979. **108**(2): p. 307-10.
84. Brouillette, C.G., D.D. Muccio, and T.K. Finney, *pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding*. Biochemistry, 1987. **26**(23): p. 7431-8.
85. Subramaniam, S., et al., *The reaction of hydroxylamine with bacteriorhodopsin studied with mutants that have altered photocycles: selective reactivity of different photointermediates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2583-7.
86. Scherrer, P., et al., *Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers*. Biochemistry, 1989. **28**(2): p. 829-34.
87. Peck, R.F., et al., *brp and blh are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in Halobacterium salinarum*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5739-44.
88. Xu, Z.J., et al., *The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of bacteriorhodopsin*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24858-63.
89. Sumper, M. and G. Herrmann, *Biogenesis of purple membrane: regulation of bacteriorhodopsin synthesis*. FEBS Lett, 1976. **69**(1): p. 149-52.

90. Krimm, S. and A.M. Dwivedi, *Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism?* Science, 1982. **216**(4544): p. 407-8.
91. Seiff, F., et al., *A neutron diffraction study on the location of the polyene chain of retinal in bacteriorhodopsin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3227-31.
92. Heyn, M.P., R.J. Cherry, and U. Muller, *Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore.* J Mol Biol, 1977. **117**(3): p. 607-20.
93. Lasogga, L., et al., *Model systems for the investigation of the opsin shift in bacteriorhodopsin.* J Phys Chem A, 2010. **114**(5): p. 2179-88.
94. Kimura, Y., et al., *Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography.* Nature, 1997. **389**(6647): p. 206-11.
95. Luecke, H., H.T. Richter, and J.K. Lanyi, *Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution.* Science, 1998. **280**(5371): p. 1934-7.
96. Edman, K., et al., *High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle.* Nature, 1999. **401**(6755): p. 822-6.
97. Mitsuoka, K., et al., *The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution.* J Mol Biol, 1999. **286**(3): p. 861-82.
98. Muthyala, R., et al., *The nature of the delocalized cations in azulenic bacteriorhodopsin analogs.* Photochem Photobiol, 2001. **74**(6): p. 837-45.
99. Marco Garcia, G., *Reconstitució de bacteriorhodopsina mitjançant anàlegs merocianínic del retinal.* Master Thesis UAB, 2011: p. 30.
100. Cladera, J., J. Torres, and E. Padros, *Analysis of conformational changes in bacteriorhodopsin upon retinal removal.* Biophys J, 1996. **70**(6): p. 2882-7.
101. Ludlam, G.J. and K.J. Rothschild, *Similarity of bacteriorhodopsin structural changes triggered by chromophore removal and light-driven proton transport.* FEBS Lett, 1997. **407**(3): p. 285-8.
102. Oesterhelt, D., M. Meentzen, and L. Schuhmann, *Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores.* Eur J Biochem, 1973. **40**(2): p. 453-63.
103. Ohno, K., Y. Takeuchi, and M. Yoshida, *Effect of light-adaptation on the photoreaction of bacteriorhodopsin from Halobacterium halobium.* Biochim Biophys Acta, 1977. **462**(3): p. 575-82.
104. Ebrey, T.G., et al., *Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane.* J Mol Biol, 1977. **112**(3): p. 377-97.
105. Rehorek, M. and M.P. Heyn, *Binding of all-trans-retinal to the purple membrane. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient.* Biochemistry, 1979. **18**(22): p. 4977-83.
106. Balashov, S.P., et al., *Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release.* Biophys J, 1996. **70**(1): p. 473-81.
107. Lozier, R.H., R.A. Bogomolni, and W. Stoeckenius, *Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in Halobacterium Halobium.* Biophys J, 1975. **15**(9): p. 955-62.
108. Edmonds, B.W. and H. Luecke, *Atomic resolution structures and the mechanism of ion pumping in bacteriorhodopsin.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 1556-66.
109. Siebert, F. and W. Mantele, *Investigation of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin by low-temperature Fourier-transform infrared spectroscopy.* Eur J Biochem, 1983. **130**(3): p. 565-73.
110. Earnest, T.N., et al., *Orientation of the bacteriorhodopsin chromophore probed by polarized Fourier transform infrared difference spectroscopy.* Biochemistry, 1986. **25**(24): p. 7793-8.
111. Mathies, R.A., et al., *From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump.* Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1991. **20**: p. 491-518.

Bibliografia

112. Weidlich, O., et al., *Nanosecond retinal structure changes in K-590 during the room-temperature bacteriorhodopsin photocycle: picosecond time-resolved coherent anti-stokes Raman spectroscopy*. Biophys J, 1997. **72**(5): p. 2329-41.
113. Schobert, B., et al., *Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal*. J Mol Biol, 2002. **321**(4): p. 715-26.
114. Rothschild, K.J., *FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model*. J Bioenerg Biomembr, 1992. **24**(2): p. 147-67.
115. Maeda, A., et al., *Structures of aspartic acid-96 in the L and N intermediates of bacteriorhodopsin: analysis by Fourier transform infrared spectroscopy*. Biochemistry, 1992. **31**(19): p. 4684-90.
116. Le Coutre, J., et al., *Experimental evidence for hydrogen-bonded network proton transfer in bacteriorhodopsin shown by Fourier-transform infrared spectroscopy using azide as catalyst*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4962-6.
117. Braiman, M.S., et al., *Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212*. Biochemistry, 1988. **27**(23): p. 8516-20.
118. Braiman, M.S., O. Bousche, and K.J. Rothschild, *Protein dynamics in the bacteriorhodopsin photocycle: submillisecond Fourier transform infrared spectra of the L, M, and N photointermediates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2388-92.
119. Ormos, P., K. Chu, and J. Mourant, *Infrared study of the L, M, and N intermediates of bacteriorhodopsin using the photoreaction of M*. Biochemistry, 1992. **31**(30): p. 6933-7.
120. Yamazaki, Y., et al., *Water structural changes at the proton uptake site (the Thr46-Asp96 domain) in the L intermediate of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1995. **34**(21): p. 7088-93.
121. Hayashi, S., E. Tajkhorshid, and K. Schulten, *Structural changes during the formation of early intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle*. Biophys J, 2002. **83**(3): p. 1281-97.
122. Rothschild, K.J. and N.A. Clark, *Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane*. Biophys J, 1979. **25**(3): p. 473-87.
123. Braiman, M.S., P.L. Ahl, and K.J. Rothschild, *Millisecond Fourier-transform infrared difference spectra of bacteriorhodopsin's M412 photoproduct*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5221-5.
124. Dollinger, G., et al., *Bacteriorhodopsin: fourier transform infrared methods for studies of protonation of carboxyl groups*. Methods Enzymol, 1986. **127**: p. 649-62.
125. Stern, L.J., et al., *Substitution of membrane-embedded aspartic acids in bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle*. Biochemistry, 1989. **28**(26): p. 10035-42.
126. Metz, G., F. Siebert, and M. Engelhard, *Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. A solid-state ¹³C CP-MAS NMR investigation*. FEBS Lett, 1992. **303**(2-3): p. 237-41.
127. Bousche, O., et al., *Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the bacteriorhodopsin mutant Tyr-185-->Phe: Asp-96 reprotonates during O formation; Asp-85 and Asp-212 deprotonate during O decay*. Photochem Photobiol, 1992. **56**(6): p. 1085-95.
128. Wolf, S., et al., *Directional proton transfer in membrane proteins achieved through protonated protein-bound water molecules: a proton diode*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(38): p. 6889-93.
129. Varo, G. and J.K. Lanyi, *Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1990. **29**(9): p. 2241-50.

130. Zimanyi, L., et al., *The two consecutive M substates in the photocycle of bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue replacements.* Photochem Photobiol, 1992. **56**(6): p. 1049-55.
131. Subramaniam, S., et al., *Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle.* J Mol Biol, 1999. **287**(1): p. 145-61.
132. Fodor, S.P., et al., *Chromophore structure in bacteriorhodopsin's N intermediate: implications for the proton-pumping mechanism.* Biochemistry, 1988. **27**(18): p. 7097-101.
133. Dencher, N.A., et al., *Structural changes in bacteriorhodopsin during proton translocation revealed by neutron diffraction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7876-9.
134. Koch, M.H., et al., *Time-resolved X-ray diffraction study of structural changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin.* EMBO J, 1991. **10**(3): p. 521-6.
135. Rothschild, K.J., et al., *Asp96 deprotonation and transmembrane alpha-helical structural changes in bacteriorhodopsin.* J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27046-52.
136. Lazarova, T. and E. Padros, *Helical and reverse turn changes in the BR->N transition of bacteriorhodopsin.* Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8354-8.
137. Radionov, A.N. and A.D. Kaulen, *Two bacteriorhodopsin M intermediates differing in accessibility of the Schiff base for azide.* FEBS Lett, 1996. **387**(2-3): p. 122-6.
138. Kamikubo, H., et al., *The last phase of the reprotonation switch in bacteriorhodopsin: the transition between the M-type and the N-type protein conformation depends on hydration.* Biochemistry, 1997. **36**(40): p. 12282-7.
139. Radionov, A.N. and A.D. Kaulen, *Inhibition of the M1-->M2 (M(closed) --> M(open)) transition in the D96N mutant photocycle and its relation to the corresponding transition in wild-type bacteriorhodopsin.* FEBS Lett, 1997. **409**(2): p. 137-40.
140. Oka, T., et al., *Time-resolved x-ray diffraction reveals multiple conformations in the M-N transition of the bacteriorhodopsin photocycle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14278-82.
141. Vonck, J., *Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography.* Embo J, 2000. **19**(10): p. 2152-60.
142. Steinhoff, H.J., et al., *Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin.* Science, 1994. **266**(5182): p. 105-7.
143. Thorgeirsson, T.E., et al., *Transient channel-opening in bacteriorhodopsin: an EPR study.* J Mol Biol, 1997. **273**(5): p. 951-7.
144. Luecke, H., et al., *Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution.* J Mol Biol, 1999. **291**(4): p. 899-911.
145. Sass, H.J., et al., *Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin.* Nature, 2000. **406**(6796): p. 649-53.
146. Oka, T., et al., *Time-resolved X-ray diffraction reveals movement of F helix of D96N bacteriorhodopsin during M-MN transition at neutral pH.* Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2610-6.
147. Xiao, W., et al., *Light-induced rotation of a transmembrane alpha-helix in bacteriorhodopsin.* J Mol Biol, 2000. **304**(5): p. 715-21.
148. Lanyi, J. and B. Schobert, *Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the Schiff base: the switch in the bacteriorhodopsin photocycle.* J Mol Biol, 2002. **321**(4): p. 727-37.
149. Butt, H.J., E. Bamberg, and D. Oesterhelt, *Absorption- and photocurrent-measurements of two aspartat mutants of bacteriorhodopsin.* J Protein Chem, 1989. **8**(3): p. 347-9.
150. Holz, M., et al., *Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2167-71.

Bibliografia

151. Otto, H., et al., *Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9228-32.
152. Bousche, O., et al., *Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants. Evidence that ASP-96 deprotonates during the M---N transition*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11063-7.
153. Cao, Y., et al., *Water is required for proton transfer from aspartate-96 to the bacteriorhodopsin Schiff base*. Biochemistry, 1991. **30**(45): p. 10972-9.
154. Schobert, B., L.S. Brown, and J.K. Lanyi, *Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp-96 and the retinal Schiff base*. J Mol Biol, 2003. **330**(3): p. 553-70.
155. Ames, J.B. and R.A. Mathies, *The role of back-reactions and proton uptake during the N---O transition in bacteriorhodopsin's photocycle: a kinetic resonance Raman study*. Biochemistry, 1990. **29**(31): p. 7181-90.
156. Maeda, A., et al., *Relocation of water molecules between the Schiff base and the Thr46-Asp96 region during light-driven unidirectional proton transport by bacteriorhodopsin: an FTIR study of the N intermediate*. Biochemistry, 2005. **44**(16): p. 5960-8.
157. Chen, D. and J.K. Lanyi, *Structural changes in the N and N' states of the bacteriorhodopsin photocycle*. Biophys J, 2009. **96**(7): p. 2779-88.
158. Riesle, J., et al., *D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6635-43.
159. Brown, L.S., R. Needleman, and J.K. Lanyi, *Functional roles of aspartic acid residues at the cytoplasmic surface of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1999. **38**(21): p. 6855-61.
160. Turner, G.J., et al., *The bacteriorhodopsin carboxyl-terminus contributes to proton recruitment and protein stability*. Biochemistry, 2009. **48**(5): p. 1112-22.
161. Friedman, N., et al., *On the heterogeneity of the M population in the photocycle of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1994. **33**(49): p. 14758-67.
162. Mowery, P.C., et al., *Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1979. **18**(19): p. 4100-7.
163. Muccio, D.D. and J.Y. Cassim, *Interpretations of the effects of pH on the spectra of purple membrane*. J Mol Biol, 1979. **135**(3): p. 595-609.
164. Druckmann, S., et al., *Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1982. **21**(20): p. 4953-9.
165. Balashov, S.P., et al., *The two pKa's of aspartate-85 and control of thermal isomerization and proton release in the arginine-82 to lysine mutant of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1995. **34**(27): p. 8820-34.
166. Zimanyi, L., et al., *Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry, 1992. **31**(36): p. 8535-43.
167. Papadopoulos, G., et al., *Water molecules and exchangeable hydrogen ions at the active centre of bacteriorhodopsin localized by neutron diffraction. Elements of the proton pathway?* J Mol Biol, 1990. **214**(1): p. 15-9.
168. Fischer, W.B., et al., *Detection of a water molecule in the active-site of bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction*. Biochemistry, 1994. **33**(43): p. 12757-62.
169. Luecke, H., et al., *Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution*. Science, 1999. **286**(5438): p. 255-61.
170. Belrhali, H., et al., *Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 A resolution*. Structure, 1999. **7**(8): p. 909-17.
171. Gennis, R.B. and T.G. Ebrey, *Proton pump caught in the act*. Science, 1999. **286**(5438): p. 252-3.

172. Govindjee, R., et al., *Arginine-82 regulates the pKa of the group responsible for the light-driven proton release in bacteriorhodopsin*. *Biophys J*, 1996. **71**(2): p. 1011-23.
173. Balashov, S.P., et al., *Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle*. *Biochemistry*, 1993. **32**(39): p. 10331-43.
174. Brown, L.S., et al., *Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27122-6.
175. Richter, H.T., et al., *A linkage of the pKa's of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin*. *Biochemistry*, 1996. **35**(13): p. 4054-62.
176. Dioumaev, A.K., et al., *Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface*. *Biochemistry*, 1998. **37**(8): p. 2496-506.
177. Rammelsberg, R., et al., *Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network*. *Biochemistry*, 1998. **37**(14): p. 5001-9.
178. Zscherp, C., et al., *In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5498-503.
179. Spassov, V.Z., et al., *pK(a) Calculations suggest storage of an excess proton in a hydrogen-bonded water network in bacteriorhodopsin*. *J Mol Biol*, 2001. **312**(1): p. 203-19.
180. Tanio, M., et al., *Conformational changes of bacteriorhodopsin along the proton-conduction chain as studied with (13)C NMR of [3-(13)C]Ala-labeled protein: arg(82) may function as an information mediator*. *Biophys J*, 1999. **77**(3): p. 1577-84.
181. Zscherp, C. and J. Heberle, *Infrared Difference Spectra of the Intermediates L, M, N, and O of the Bacteriorhodopsin Photoreaction Obtained by Time-Resolved Attenuated Total Reflection Spectroscopy*. *J Phys Chem B*, 1997. **101**(49): p. 5.
182. Dioumaev, A.K., et al., *Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212*. *Biochemistry*, 1999. **38**(31): p. 10070-8.
183. Zscherp, C., R. Schlesinger, and J. Heberle, *Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(1): p. 57-63.
184. Lazarova, T., et al., *Specific effects of chloride on the photocycle of E194Q and E204Q mutants of bacteriorhodopsin as measured by FTIR spectroscopy*. *Biochemistry*, 2002. **41**(25): p. 8176-83.
185. Garczarek, F., et al., *Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(10): p. 3633-8.
186. Eigen, M., *Proton Transfer Acid-Base Catalysis + Enzymatic Hydrolysis .I. Elementary Processes*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1964. **3**(1): p. 1-&.
187. Schuster, P.P., G. Zundel, and C. Sandorfy, *The Hydrogen bond : recent developments in theory and experiments*. 1976: North-Holland Pub. Co. ; New York : distributor, American Elsevier Pub. Co.
188. Marx, D., et al., *The nature of the hydrated excess proton in water*. *Nature*, 1999. **397**(6720): p. 601-604.
189. Hayashi, S., et al., *Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump revealed by ab initio normal-mode analysis*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(34): p. 10516-7.
190. Wolf, S., E. Freier, and K. Gerwert, *How does a membrane protein achieve a vectorial proton transfer via water molecules?* *Chemphyschem*, 2008. **9**(18): p. 2772-8.
191. Luecke, H., et al., *Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin*. *J Mol Biol*, 2000. **300**(5): p. 1237-55.

Bibliografia

192. Schatzler, B., et al., *Subsecond proton-hole propagation in bacteriorhodopsin*. Biophys J, 2003. **84**(1): p. 671-86.
193. Maeda, A., et al., *Water as a cofactor in the unidirectional light-driven proton transfer steps in bacteriorhodopsin*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(6): p. 1398-405.
194. Morgan, J.E., et al., *Water structural changes in the L and M photocycle intermediates of bacteriorhodopsin as revealed by time-resolved step-scan Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. Biochemistry, 2007. **46**(10): p. 2787-96.
195. Wang, T., et al., *Deprotonation of d96 in bacteriorhodopsin opens the proton uptake pathway*. Structure, 2013. **21**(2): p. 290-7.
196. Agmon, N., *The Grotthuss Mechanism*. Chemical Physics Letters, 1995. **244**(5-6): p. 456-462.
197. Oesterhelt, D., *The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(4): p. 489-500.
198. Haupts, U., J. Tittor, and D. Oesterhelt, *Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999. **28**: p. 367-99.
199. Lanyi, J.K., *Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, bacteriorhodopsin*. FEBS Lett, 1999. **464**(3): p. 103-7.
200. Steinhoff, H.J., et al., *Site directed spin labeling studies of structure and dynamics in bacteriorhodopsin*. Biophys Chem, 1995. **56**(1-2): p. 89-94.
201. Alexiev, U., et al., *Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 372-6.
202. Alexiev, U., et al., *Time-resolved surface charge change on the cytoplasmic side of bacteriorhodopsin*. FEBS Lett, 1995. **373**(1): p. 81-4.
203. Brown, L.S., et al., *Functional significance of a protein conformation change at the cytoplasmic end of helix F during the bacteriorhodopsin photocycle*. Biophys J, 1995. **69**(5): p. 2103-11.
204. Essen, L., et al., *Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11673-8.
205. Brown, L.S., R. Needleman, and J.K. Lanyi, *Conformational change of the E-F interhelical loop in the M photointermediate of bacteriorhodopsin*. J Mol Biol, 2002. **317**(3): p. 471-8.
206. Subramaniam, S., et al., *Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin*. EMBO J, 1993. **12**(1): p. 1-8.
207. Kamikubo, H., et al., *Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1386-90.
208. Rouhani, S., et al., *Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: model of an O-like photocycle intermediate*. J Mol Biol, 2001. **313**(3): p. 615-28.
209. Steinhoff, H., et al., *High-field EPR studies of the structure and conformational changes of site-directed spin labeled bacteriorhodopsin*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1457**(3): p. 253-62.
210. Radzwill, N., K. Gerwert, and H.J. Steinhoff, *Time-resolved detection of transient movement of helices F and G in doubly spin-labeled bacteriorhodopsin*. Biophys J, 2001. **80**(6): p. 2856-66.
211. Martinez, L.C., et al., *Subdomains in the F and G helices of bacteriorhodopsin regulate the conformational transitions of the reprotonation mechanism*. Proteins, 2002. **48**(2): p. 269-82.
212. Valluru, N., et al., *Transmembrane helix-helix association: relative stabilities at low pH*. Biochemistry, 2006. **45**(14): p. 4371-7.
213. Alexiev, U., I. Rimke, and T. Pohlmann, *Elucidation of the nature of the conformational changes of the EF-interhelical loop in bacteriorhodopsin and of the helix VIII on the*

- cytoplasmic surface of bovine rhodopsin: a time-resolved fluorescence depolarization study.* J Mol Biol, 2003. **328**(3): p. 705-19.
214. Tittor, J., et al., *Proton translocation by bacteriorhodopsin in the absence of substantial conformational changes.* J Mol Biol, 2002. **319**(2): p. 555-65.
215. Wang, T., et al., *Stable closure of the cytoplasmic half-channel is required for efficient proton transport at physiological membrane potentials in the bacteriorhodopsin catalytic cycle.* Biochemistry, 2014. **53**(14): p. 2380-90.
216. Hirai, T. and S. Subramaniam, *Structural insights into the mechanism of proton pumping by bacteriorhodopsin.* FEBS Lett, 2003. **545**(1): p. 2-8.
217. Sass, H.J., et al., *The tertiary structural changes in bacteriorhodopsin occur between M states: X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy.* EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1484-91.
218. Subramaniam, S. and R. Henderson, *Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin.* Nature, 2000. **406**(6796): p. 653-7.
219. Bondar, A.N., et al., *Suppression of the back proton-transfer from Asp85 to the retinal Schiff base in bacteriorhodopsin: a theoretical analysis of structural elements.* J Struct Biol, 2007. **157**(3): p. 454-69.
220. Tanimoto, T., Y. Furutani, and H. Kandori, *Structural changes of water in the Schiff base region of bacteriorhodopsin: proposal of a hydration switch model.* Biochemistry, 2003. **42**(8): p. 2300-6.
221. Lanyi, J.K., *Bacteriorhodopsin.* Annu Rev Physiol, 2004. **66**: p. 665-88.
222. Simon-Vazquez, R., et al., *Cross-linking of transmembrane helices reveals a rigid-body mechanism in bacteriorhodopsin transport.* Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(45): p. 8523-5.
223. Eling, C.E., et al., *Metal ion site engineering indicates a global toggle switch model for seven-transmembrane receptor activation.* J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17337-46.
224. Moore, G.E. *Progress in digital integrated electronics.* in *Electron Devices Meeting, 1975 International.* 1975.
225. Lloyd, S., *Ultimate physical limits to computation.* Nature, 2000. **406**(6799): p. 1047-1054.
226. Robert, R.B., *Introduction to Molecular and Biomolecular Electronics,* in *Molecular and Biomolecular Electronics.* 1994, American Chemical Society. p. 1-14.
227. Waldrop, M.M., *The chips are down for Moore's law.* Nature, 2016. **530**(7589): p. 144-7.
228. Greenbaum, E., *Vectorial photocurrents and photoconductivity in metalized chloroplasts.* The Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**(16): p. 6151-6153.
229. Lee, I., J.W. Lee, and E. Greenbaum, *Biomolecular Electronics: Vectorial Arrays of Photosynthetic Reaction Centers.* Physical Review Letters, 1997. **79**(17): p. 3294-3297.
230. Birge, R.R., *Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins.* Annual Review of Physical Chemistry, 1990. **41**(1): p. 683-733.
231. Vilanova, C., et al., *Aequorin-expressing yeast emits light under electric control.* Journal of Biotechnology, 2011. **152**(3): p. 93-95.
232. Competition, I.G.E.M.i., https://www.igem.org/Main_Page.
233. Shen, Y., et al., *Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 [deg]C in two-dimensional films.* Nature, 1993. **366**(6450): p. 48-50.
234. Bamberg, E., et al., *Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**(12): p. 7502-7506.
235. Wagner, N.L., J.A. Greco, and R.R. Birge, *Visual Restoration using Microbial Rhodopsins.* Bionanotechnology: Biological Self-Assembly and Its Applications, 2013: p. 205-240.
236. Chen, Z. and R.R. Birge, *Protein-based artificial retinas.* Trends in Biotechnology, 1993. **11**(7): p. 292-300.

Bibliografía

237. Eisenbach, M., et al., *Bacteriorhodopsin-loaded charged synthetic membranes utilization of light energy to generate electrical current*. FEBS Letters, 1977. **81**(1): p. 77-80.
238. Singh, K. and S.R. Caplan, *The purple membrane and solar energy conversion*. Trends in Biochemical Sciences, 1980. **5**(3): p. 62-64.
239. Hong, F.T., *Retinal Proteins in Photovoltaic Devices*. Molecular and Biomolecular Electronics, 1994. **240**: p. 527-559.
240. Hong, F.T., *Interfacial photochemistry of retinal proteins*. Progress in Surface Science, 1999. **62**(1-6): p. 1-237.
241. Xu, J., et al., *Direct measurement of the photoelectric response time of bacteriorhodopsin via electro-optic sampling*. Biophysical Journal, 2003. **85**(2): p. 1128-1134.
242. Gillespie, N.B., et al., *Characterization of the branched-photocycle intermediates P and Q of bacteriorhodopsin*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2002. **224**: p. U175-U175.
243. Popp, A., et al., *Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing products in bacteriorhodopsin films*. Biophys J, 1993. **65**(4): p. 1449-59.
244. Birge, R.R., et al., *Biomolecular electronics: Protein-based associative processors and volumetric memories*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(49): p. 10746-10766.
245. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, *Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane*. Methods Enzymol, 1974. **31**(Pt A): p. 667-78.
246. Pfeifer, F., et al., *Characterization of insertions affecting the expression of the bacteriorhodopsin gene in Halobacterium halobium*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(5): p. 2489-97.
247. Peck, R.F., S. DasSarma, and M.P. Krebs, *Homologous gene knockout in the archaeon Halobacterium salinarum with ura3 as a counterselectable marker*. Mol Microbiol, 2000. **35**(3): p. 667-76.
248. Ferrando, E., U. Schweiger, and D. Oesterhelt, *Homologous bacterio-opsin-encoding gene expression via site-specific vector integration*. Gene, 1993. **125**(1): p. 41-7.
249. Landt, O., H.P. Grunert, and U. Hahn, *A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction*. Gene, 1990. **96**(1): p. 125-8.
250. Juncosa-Ginesta, M., et al., *Improved efficiency in site-directed mutagenesis by PCR using a Pyrococcus sp. GB-D polymerase*. Biotechniques, 1994. **16**(5): p. 820-3.
251. Simón Vázquez, R., *Influencia de la movilidad de las hélices en la función de la bacteriorodopsina*. 2008.
252. Klock, H.E. and S.A. Lesley, *The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis*. Methods Mol Biol, 2009. **498**: p. 91-103.
253. Olsen, D.B. and F. Eckstein, *Incomplete primer extension during in vitro DNA amplification catalyzed by Taq polymerase; exploitation for DNA sequencing*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(23): p. 9613-20.
254. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
255. Evans, G.A., *Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2*. Cell. **61**(1): p. 17-18.
256. Yan, B., et al., *Transformation of a bop-hop-sop-I-sop-II-Halobacterium halobium mutant to bop+ : effects of bacteriorhodopsin photoactivation on cellular proton fluxes and swimming behavior*. Photochem Photobiol, 1992. **56**(4): p. 553-61.
257. Ni, B.F., et al., *An efficient system for the synthesis of bacteriorhodopsin in Halobacterium halobium*. Gene, 1990. **90**(1): p. 169-72.
258. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
259. Stephen Thomson, J.S., *Foundations of spectroscopy*.

260. Govindjee, R., et al., *Mutation of a surface residue, lysine-129, reverses the order of proton release and uptake in bacteriorhodopsin; guanidine hydrochloride restores it*. *Biophys J*, 1997. **72**(2 Pt 1): p. 886-98.
261. Barnadas Rodriguez, R. and M. Sabes Xamani, *Liposomes prepared by high-pressure homogenizers*. *Methods Enzymol*, 2003. **367**: p. 28-46.
262. Peralvarez, A., et al., *Thr90 is a key residue of the bacteriorhodopsin proton pumping mechanism*. *FEBS Lett*, 2001. **508**(3): p. 399-402.
263. Kano, K. and J.H. Fendler, *Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles*. *Biochim Biophys Acta*, 1978. **509**(2): p. 289-99.
264. Spragg, R.A., *IR Spectrometers A2 - Lindon, John C*, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*. 2010, Academic Press: Oxford. p. 1199-1209.
265. Michelson, A.A. and E.W. Morley, *On the relative motion of the Earth and the luminiferous ether*. *American Journal of Science*, 1887. **Series 3 Vol. 34**(203): p. 333-345.
266. Lazarova, T., et al., *Fourier transform infrared evidence for early deprotonation of Asp(85) at alkaline pH in the photocycle of bacteriorhodopsin mutants containing E194Q*. *Biophys J*, 2000. **78**(4): p. 2022-30.
267. Warshel, A. and M. Ottolenighi, *Kinetic and spectroscopic effects of protein-chromophore electrostatic interactions in bacteriorhodopsin*. *Photochem Photobiol*, 1979. **30**(2): p. 291-3.
268. Subramaniam, S., T. Marti, and H.G. Khorana, *Protonation state of Asp (Glu)-85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82----Ala and Asp-85----Glu: the blue form is inactive in proton translocation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(3): p. 1013-7.
269. Peralvarez-Marin, A., et al., *Influence of proline on the thermostability of the active site and membrane arrangement of transmembrane proteins*. *Biophys J*, 2008. **95**(9): p. 4384-95.
270. Rouso, I., et al., *Effective light-induced hydroxylamine reactions occur with C13 = C14 nonisomerizable bacteriorhodopsin pigments*. *Biophys J*, 1998. **75**(1): p. 413-7.
271. Moller, C., et al., *Reversible loss of crystallinity on photobleaching purple membrane in the presence of hydroxylamine*. *J Mol Biol*, 2000. **301**(4): p. 869-79.
272. Ohno, K., Y. Takeuchi, and M. Yoshida, *On the 2 Forms of Intermediate-M of Bacteriorhodopsin*. *Photochemistry and Photobiology*, 1981. **33**(4): p. 573-578.
273. Fukuda, K. and T. Kouyama, *Photoreaction of bacteriorhodopsin at high pH: origins of the slow decay component of M*. *Biochemistry*, 1992. **31**(47): p. 11740-7.
274. Kouyama, T., et al., *Bacteriorhodopsin photoreaction: identification of a long-lived intermediate N (P,R350) at high pH and its M-like photoproduct*. *Biochemistry*, 1988. **27**(16): p. 5855-63.
275. Ames, J.B., et al., *Bacteriorhodopsin's M412 intermediate contains a 13-cis, 14-s-trans, 15-anti-retinal Schiff base chromophore*. *Biochemistry*, 1989. **28**(9): p. 3681-7.
276. Szaraz, S., D. Oesterhelt, and P. Ormos, *pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Biophys J*, 1994. **67**(4): p. 1706-12.
277. Cao, Y., et al., *Proton transfer from Asp-96 to the bacteriorhodopsin Schiff base is caused by a decrease of the pKa of Asp-96 which follows a protein backbone conformational change*. *Biochemistry*, 1993. **32**(8): p. 1981-90.
278. Balashov, S.P., R. Govindjee, and T.G. Ebrey, *Redshift of the purple membrane absorption band and the deprotonation of tyrosine residues at high pH: Origin of the parallel photocycles of trans-bacteriorhodopsin*. *Biophys J*, 1991. **60**(2): p. 475-90.
279. Tittor, J., et al., *A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96----Asn is fully reactivated by azide*. *EMBO J*, 1989. **8**(11): p. 3477-82.

Bibliografia

280. Kono, M., S. Misra, and T.G. Ebrey, *pH dependence of light-induced proton release by bacteriorhodopsin*. FEBS Lett, 1993. **331**(1-2): p. 31-4.
281. Balashov, S.P., et al., *The proton release group of bacteriorhodopsin controls the rate of the final step of its photocycle at low pH*. Biochemistry, 1999. **38**(7): p. 2026-39.
282. Mollaaghababa, R., et al., *Time-resolved site-directed spin-labeling studies of bacteriorhodopsin: loop-specific conformational changes in M*. Biochemistry, 2000. **39**(5): p. 1120-7.
283. Pfeiffer, M., et al., *Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin*. J Mol Biol, 1999. **287**(1): p. 163-71.
284. P.W.M. Van Dijck, K.V.D., *Bacteriorhodopsin in phospholipid vesicles*. Methods in Enzymology, 1982. **88**: p. 9.
285. Cladera, J., et al., *Liposome solubilization and membrane protein reconstitution using Chaps and Chapso*. Eur J Biochem, 1997. **243**(3): p. 798-804.
286. Happe, M., et al., *Direction of proton translocation in proteoliposomes formed from purple membrane and acidic lipids depends on the pH during reconstitution*. Biochim Biophys Acta, 1977. **465**(2): p. 415-20.
287. Huang, K.S., H. Bayley, and H.G. Khorana, *Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 323-7.
288. Rigaud, J.L., A. Bluzat, and S. Buschlen, *Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **111**(2): p. 373-82.
289. Lozier, R.H., et al., *Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, Halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane*. Biochim Biophys Acta, 1976. **440**(3): p. 545-56.
290. Varo, G. and J.K. Lanyi, *Protonation and deprotonation of the M, N, and O intermediates during the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry, 1990. **29**(29): p. 6858-65.
291. Drachev, L.A., A.D. Kaulen, and V.P. Skulachev, *Correlation of Photochemical Cycle, H⁺ Release and Uptake, and Electric Events in Bacteriorhodopsin*. Febs Letters, 1984. **178**(2): p. 331-335.
292. Grzesiek, S. and N.A. Dencher, *Time-Course and Stoichiometry of Light-Induced Proton Release and Uptake during the Photocycle of Bacteriorhodopsin*. Febs Letters, 1986. **208**(2): p. 337-342.
293. Seigneuret, M. and J.L. Rigaud, *Use of the Fluorescent Ph Probe Pyranine to Detect Heterogeneous Directions of Proton Movement in Bacteriorhodopsin Reconstituted Large Liposomes*. Febs Letters, 1985. **188**(1): p. 101-106.
294. Kotting, C. and K. Gerwert, *Proteins in action monitored by time-resolved FTIR spectroscopy*. Chemphyschem, 2005. **6**(5): p. 881-8.
295. Terpugov, E.L. and O.V. Degtyareva, *FTIR emission spectra of bacteriorhodopsin in a vibrational excited state*. Biochemistry (Mosc), 2001. **66**(11): p. 1315-22.
296. Rodig, C., et al., *Time-resolved step-scan Fourier transform infrared spectroscopy reveals differences between early and late M intermediates of bacteriorhodopsin*. Biophys J, 1999. **76**(5): p. 2687-701.
297. Lorenz-Fonfria, V.A. and H. Kandori, *Spectroscopic and kinetic evidence on how bacteriorhodopsin accomplishes vectorial proton transport under functional conditions*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(16): p. 5891-901.
298. Mayorga, O.L.
299. Nielsen, J.E. and G. Vriend, *Optimizing the hydrogen-bond network in Poisson-Boltzmann equation-based pKa calculations*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2001. **43**(4): p. 403-412.

300. Li, H., A.D. Robertson, and J.H. Jensen, *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2005. **61**(4): p. 704-721.
301. Chang, C.H., et al., *Mechanism and role of divalent cation binding of bacteriorhodopsin*. Biophys J, 1986. **49**(3): p. 731-9.
302. Altenbach, C., et al., *Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants*. Science, 1990. **248**(4959): p. 1088-92.
303. Alexiev, U., et al., *Covalently bound pH-indicator dyes at selected extracellular or cytoplasmic sites in bacteriorhodopsin. 2. Rotational orientation of helices D and E and kinetic correlation between M formation and proton release in bacteriorhodopsin micelles*. Biochemistry, 1994. **33**(46): p. 13693-9.
304. Voitkovsky, K., S.A. Contera, and J.F. Ryan, *Electrostatic and steric interactions determine bacteriorhodopsin single-molecule biomechanics*. Biophys J, 2007. **93**(6): p. 2024-37.
305. Yamashita, H., et al., *Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by optical spectroscopy and high-speed atomic force microscopy*. J Struct Biol, 2013.
306. Pfefferle, J.M., et al., *Fourier transform infrared study of the N intermediate of bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 1991. **30**(26): p. 6548-56.
307. Seitz, A. and N. Hampp, *Kinetic optimization of bacteriorhodopsin films for holographic interferometry*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(30): p. 7183-7192.

Agraïments

Per començar, és impossible no agrair al meu director de la tesi, Esteve Padrós, la oportunitat de treballar amb la bR, l'ajuda i els consells rebuts, l'amabilitat i la paciència amb mi i que hagi continuat ajudant-me a pesar d'estar jubilat.

A Tzvetana, la persona que més que una directora de tesi sembla una companya, treballant dia a dia amb mi i compartint despatx. Amb ella mai m'ha faltat ajuda, consells, ànims i estirades d'orella quan han fet falta. No m'han faltat tampoc muntanyes d'articles (literalment) quan ha calgut estudiar algun aspecte teòric o pràctic de la tesi.

He d'agrair a Jordi Hernando la seva ajuda amb l'aparell de Flash Photolysis, que a pesar de fer-nos passar tanta calor permet obtenir uns resultats fantàstics i bonics.

A Judith per absolutament tot, per fer-me feliç. Amb ella res me falta i res me sobra. Ets fantàstica. T'estimo. A Ludo i a Dokyo per ser tan carinyosos, adorables i suaus.

Als pares (va, i al germà :P) per recolzar-me sempre i en tot i voler-me tal com sóc.

A tots els companys i companyes de laboratori, els que estan i els que ja se n'han anat a altres laboratoris. La veritat és que en un laboratori es viuen massa despedides.

A tots els companys i companyes de Primark, especialment al *equipo Probas*, per ser tots tan genials.

Gràcies a tots els del grup de *Quedadas barceluninas*, pels bons moments passats (i per passar), per ser els meus amics.

També es mereixen un agraïment tots els professors del departament, Neus i Elodia, Mateu i David, per ser imprescindibles i haver-me cuidat tant.

Després de tant de treball i esforç escrivint la tesi, el que m'està costant més és escriure els agraïments XD. Agrair a tots els aparells que han aguantat sense espatllar-se per a que pugui acabar, especialment a la microultra i al l'espectrofotòmetre. Al demés, va fer tant com va poder.

A Barcelona que, a pesar de ser bona si la bossa sona, mola.

A tots els amics i amigues de Massanassa, que a pesar de veure'ls ben poc és com si no passara el temps.

A tots els que em pugui haver deixat però que han aportat el seu gra d'arena en fer-me com sóc.