

IV.3. Estudi de les mutacions P8G, P8W, P77G, P200G i 3PG

IV.3.1 Objectiu de les mutacions

Gràcies a la configuració del seu grup radical, les prolines tenen la propietat de produir torsions a les hèlices, mantenint la rigidesa de l'enllaç. La substitució d'aquests grups per un altre aminoàcid donaria lloc a la pèrdua d'aquesta propietat, la qual cosa es podria traduir en una diferent localització des residus veïns. S'ha elegit substituir les Pro extracel·lulars per Gly per tal d'eliminar la rigidesa del enllaç, ja que aquest aminoàcid, en no posseir cadena lateral, proporciona una gran flexibilitat. Per altra banda la mutació P8W s'ha realitzat per tal de comprovar si l'addició d'un grup amb una gran cadena lateral en aquesta posició podia desplaçar les aigües allotjades al voltant d'aquesta prolina i determinar així les alteracions corresponents.

La triple mutació P8G/P77G/P200G es va realitzar amb posterioritat un cop coneguts els efectes de la mutació P8W. Com que la introducció del triptòfan en aquesta posició va provocar moltes alteracions a la bR (veure més endavant), es va dissenyar el triple mutant per tal de determinar si les alteracions observades al mutant P8W eren degudes a que el triptòfan desplaçava les aigües. Si era així la triple mutació hauria de produir un efecte similar, ja que la supressió de les tres prolines a l'hora segurament hauria de produir una alteració important en la unió de les molècules d'aigua.

IV.3.2. ESTUDI ESTRUCTURAL

IV.3.2.1. Espectre d'absorbància i adaptació llum-fosc

Tots els mutants estudiats tenen un espectre d'absorbància normal excepte per al mutant P8W i el triple mutant 3PG on es pot observar un important desplaçament del màxim d'absorbància tant de la forma adaptada a la foscor com l'adaptada a la llum cap al blau (taula IV.12).

L'espectre d'absorbància i diferència de les formes DA i LA del mutant P8W en 150 mM de KCl i pH 7,0 (figura IV.40), mostren no solament un desplaçament en el màxim d'absorbància sinó també una menor diferència del coeficient d'extinció molar entre ambdues formes, (al voltant d'un 1 %; figura IV.40), comparat amb la bR silvestre (10 %; figura IV.12).

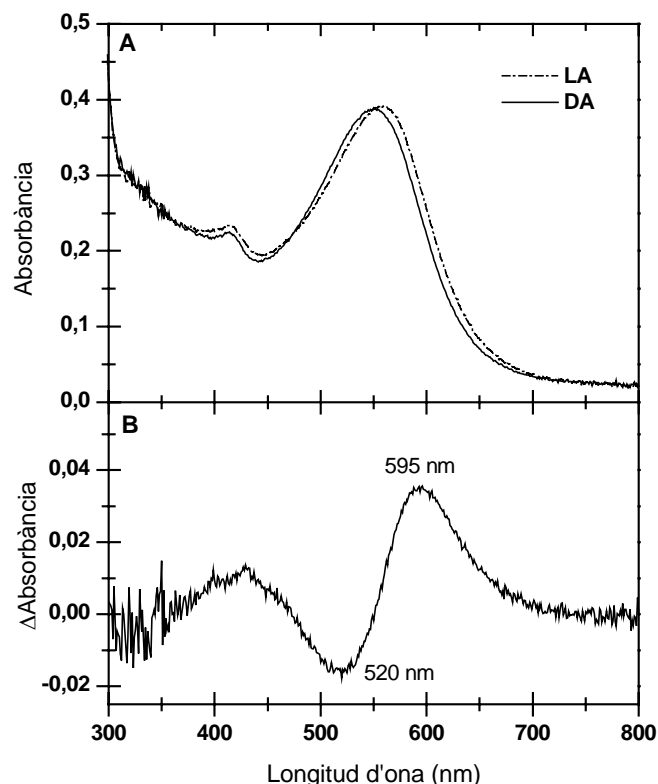


Figura IV.40. (A) Espectres d'absorció del mutant P8W en la seva forma adaptada a la llum (LA) i a la foscor (DA) en 150 mM KCl, pH 7 i temperatura ambient. (B) Espectre de diferència entre la forma LA i DA.

Taula IV.11. Màxim d'absorbància en nm de mostres de bR en 150 mM KCl, pH 7,0 i temperatura ambient per a les formes LA i DA. Els valor indicats amb un asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | Adaptat a la llum | Adaptat a la foscor |
|----------------|-------------------|---------------------|
| bR silvestre | 568 | 558 |
| P8G | 568 | 560 |
| P8W | 558* | 550* |
| P77G | 568 | 559 |
| P200G | 569 | 560 |
| P8G/P77G/P200G | 550* | 538* |

El fet de que el mutant P8W presenti un canvi en el màxim d'absorbància comparat amb la bR silvestre podria ser degut a dos motius. El primer seria que aquesta mutació alterés l'entorn del retinal produint-se un canvi en la seva absorbància, o bé que

la substitució de la prolina 8 per un triptòfan canviés la proporció de *13-cis/tot-trans* cap a major quantitat de *13-cis* que a la bR silvestre (3:1).

Aquest mutant a més presenta una dependència de les formes LA i DA respecte de la força iònica del medi (taula IV.12), ja que a 2 M de KCl la forma DA té un màxim d'absorbància a 557 nm i la LA a 565 nm, molt similar a la bR silvestre. Aquesta recuperació del màxim d'absorbància no ve acompanyat, però, per un augment del coeficient d'extinció molar de la forma adaptada a la llum. Sorprenentment, les formes DA i LA d'aquest mutant en H₂O presenten uns màxims d'absorbància semblants a les condicions de força iònica 1 M. El fet de que el màxim d'absorbància en aquest mutant sigui tant dependent de la força iònica podria ser degut a un possible menor afinitat dels cations.

Taula IV.12. Valors dels màxim d'absorbància en nm de la forma DA i LA del mutant P8W en diferents condicions de força iònica.

| Forma | H ₂ O | 150 mM KCl | 1 M KCl | 2 M KCl | 3M KCl |
|-------|------------------|------------|---------|---------|--------|
| DA | 554 | 550 | 554 | 557 | 557 |
| LA | 563 | 558 | 564 | 565 | 565 |

IV.3.2.2. Comportament de la bR front l'acidificació del medi

A la figura IV.41 es mostren les corbes corresponents a la transició púrpura-blau de la bR silvestre i els mutants de les prolines. Aquestes titracions ens proporcionen els valors del pK_a aparent de l'Asp85, i s'adverteix clarament un increment important del pK_a de l'aspàrtic 85 en els mutants P8G, P8W, P77G i 3PG.

D'acord amb els valors de la taula IV.13, el mutant P8G presenta un augment de 0,5 unitats de pH en el pK_a de l'Asp 85 en les tres condicions estudiades. Aquest fet deu ser degut a un lleuger canvi que es produeix en l'entorn del retinal quan es muta la prolina 8 per glicina.

Quan aquesta prolina però, es muta per triptòfan, els canvis observats són més importants. En les tres condicions estudiades hi ha un augment força important del pK_a de l'Asp 85, de l'ordre de dues unitats de pH, comparat amb la bR silvestre. La corba de titració d'aquest mutant (figura IV.41) és sis vegades més ampla que la de la bR silvestre. Una possible explicació és que en la transició púrpura-blau del mutant P8W hi estigui involucrat al menys un altre grup a part de l'Asp 85 probablement amb un pK_a

diferent. Així doncs la formació de bR blava en aquest mutant podria implicar la protonació de diversos grups. Aquest efecte es veu també al mutant 3PG i menys accentuant al mutant P77G.

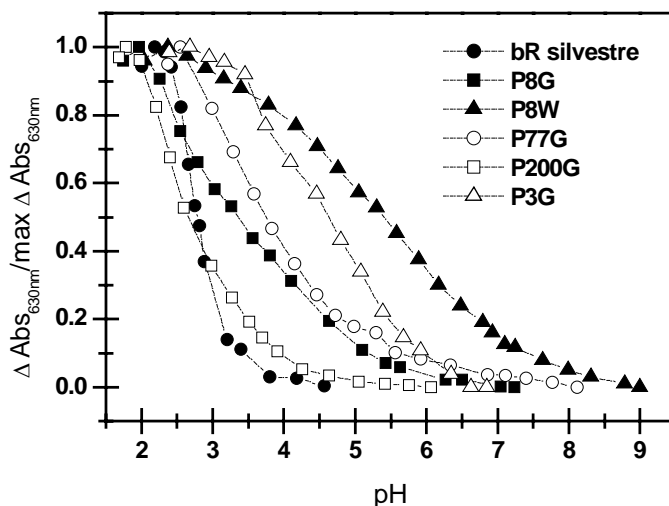


Figura IV.41 Representació de l'increment d'absorbància a 630 nm en funció del pH per la bR silvestre i els mutants P8G, P8W, P77G, P200G i 3PG en 150 mM KCl i temperatura ambient. Les dades han estat normalitzades entre 0 i 1.

El canvi tant important del pK_a de l'Asp 85 al mutant P8W es deu principalment als canvis que la mutació produeix en l'entorn de l'Asp 85, com es dedueix de l'increment d'1,6 unitats de pH en la condició de bR desionitzada comparat amb la bR silvestre.

Taula IV.13. pK_a de la transició púrpura-blau en diferents condicions per la bR silvestre i bR mutants. Amb asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre. Els valors que no tenen especificat l'error es deu a que aquest és inferior a 0,1.

| Mostra | 150 mM KCl | H ₂ O | Desionitzat |
|--------------|------------|------------------|-------------|
| bR silvestre | 2,7 | 3,2 | 5,5 |
| P8G | 3,2* | 4,7* | 5,9* |
| P8W | 5,4 ± 0,2* | 5,4 ± 0,2* | 7,1* |
| P77G | 3,7 ± 0,2* | 4,9* | 5,7 ± 0,2 |
| P200G | 2,9 ± 0,3 | 4,3 ± 0,2* | 5,6 ± 0,2 |
| 3PG | 4,6* | 4,7* | - |

Per altra banda, la gran diferència obtinguda entre el pK_a de l'asp 85 al mutant P8G i P8W fa pensar que en introduir un aminoàcid tan gran com és el triptòfan pot causar un desplaçament de les aigües i les altres prolines produint un efecte major que quan es muta per una glicina. El mutant 3PG es va construir com a resultat d'aquestes dades, per tal d'esbrinar si la substitució de les tres prolines al mateix temps produiria un efecte similar a la mutació P8W. En el triple mutant es pot observar un increment important del pK_a respecte a la bR silvestre, però una disminució comparat amb el mutant P8W. Aquestes dades indiquen per una banda que el fet de mutar les tres prolines produeix un canvi més important que cada mutant individual, i per altra que la mutació P8W produeix canvis addicionals.

Observant la corba de la bR silvestre de la figura IV.41 en 150 mM KCl es pot apreciar que quan es baixa el pH del medi per sota de 2,5, hi comença a haver una disminució de l'absorbància a 630 nm com a conseqüència de la reaparició de membrana púrpura a pH molt àcids (secció I.9.1). Aquesta forma és l'anomenada púrpura àcida i es produeix com a conseqüència de la introducció dels ions Cl^- provinents del KCl dintre de la proteïna allotjant-se en l'entorn del retinal i permetent així la protonació de l'Asp 212 (Kelemen et al., 1999). La conjunció d'aquest dos factors, la localització de la càrrega negativa de l'ió clor prop del retinal junt amb la protonació de l'Asp 212 produirien la restauració parcial de l'entorn original del retinal, obtenint-se una espècie amb un màxim d'absorbància a 585 nm. Quan es fa la titració en presència de 75 mM de Na_2SO_4 , on hi ha absència total de Cl^- en el medi, l'Asp 212 no es pot protonar ja que els ions SO_4^{2-} són massa grans i no poden penetrar dintre de la proteïna, i per tant no es forma l'espècie púrpura-àcida. Així doncs les titracions fetes en H_2O (on s'acidifica el medi amb H_2SO_4) o condicions desionitzades (on es comença la titració a pH àcid i s'afegeix NaOH per alcalinitzar el medi) no presenten aquesta espècie a pH àcids.

En cap mutant estudiat fins ara hem observat cap contradicció en aquest fet excepte pel mutant P8W. A la figura IV.42 es troben representades les corbes de titració del mutant P8W i bR silvestre en 150 mM de KCl i 75 mM de Na_2SO_4 . En aquest cas es troben representats els canvis del màxim d'absorbància en funció del pH en comptes de l'increment d'absorbància a 630 nm, per tal d'observar millor l'efecte d'aparició de la forma púrpura-àcida. Per la bR silvestre es pot observar clarament que quan es fa la titració en absència de ions Cl^- (en SO_4^{2-}), a pH per sota de 2, el màxim

d'absorbància es manté al voltant de 600 nm ja que en no haver-hi ions clor la forma púrpura-àcida no es pot formar. En condicions de 150 mM de KCl però, es veu un clar desplaçament cap al blau del màxim d'absorbància en disminuir el pH per sota de 2,5 com a conseqüència de la formació de la bR púrpura-àcida. En el cas del mutant P8W es fa evident que no seria necessària la presència d'ions clor per obtenir aquesta forma, ja que tant en presència com absència de Cl^- es forma bR púrpura àcida (figura IV.42). Així doncs, semblaria ser que en aquest mutant, l'Asp 212 es podria protonar restaurant l'entorn del retinal sense la necessitat del clor. Es podria pensar que una estructura més oberta de les hèlices en aquest mutant podria permetre l'entrada d'ions SO_4^- fent el mateix efecte que el Cl^- . El fet però, de que aquest mutant també formi bR púrpura àcida en el seu estat desionitzat sense presència de cap ió al medi (figura IV.43) indica que no seria degut a l'entrada dels ions sofre, sinó que definitivament la formació d'aquesta espècie seria totalment independent dels ions.

Aquest fet també és present al mutant P8G encara que no de manera tan evident, mostrant que quan la prolina 8 és absent en la bR no seria necessària l'entrada de Cl^- per a que l'aspàrtic 212 es protoni.

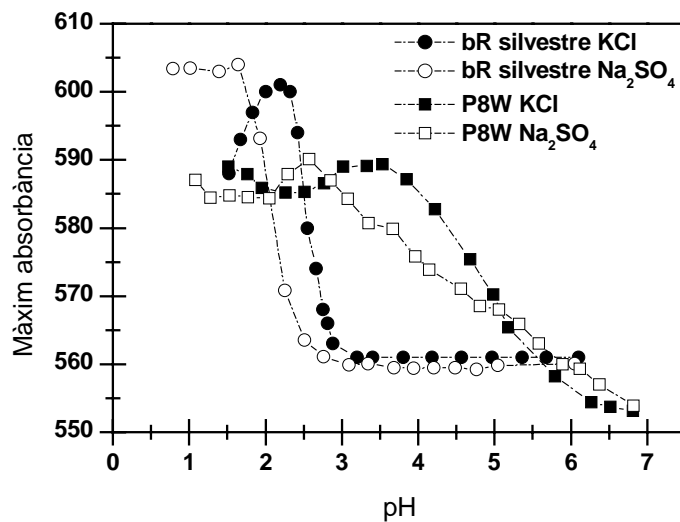


Figura IV.42. Representació del màxim d'absorbància del mutant P8W i bR silvestre en funció del pH en presència (150 mM KCl) i absència d'ions Cl^- (75 mM Na_2SO_4). Mostres adaptades a la foscor i temperatura ambient.

La comparació de les titracions de pH fetes en absència o en presència de clor no solament indiquen un comportament diferent en l'aparició de bR púrpura àcida, sinó que a més mostra que el valor de pK_a de l'Asp 85 és diferent dependent de la sal

utilitzada. En absència de clor el valor de pK_a obtingut és menor comparat amb la seva presència, indicant que el Cl^- d'alguna manera ja interacciona amb la proteïna a pH neutre canviant l'entorn del retinal, tant en la bR silvestre com en el mutant.

Els valors del pK_a extrets de l'ajust de les corbes de la figura IV.42 en presència de clor, donen uns valors que es troben lleugerament per sota dels obtinguts de l'ajust de les corbes de la gràfica IV.41 on s'expressa els canvis d'absorbància a 630 nm en funció del pH en comptes d'utilitzar el màxim d'absorbància. Aquest fet es deu a que petits canvis en la formació de membrana blava no són suficients per produir un canvi en el màxim d'absorbància de la proteïna. Es per tant més correcte utilitzar la representació de la figura IV.41 (o sigui, utilitzar els canvis d'absorbància) per determinar el pK_a aparent de l'Asp 85.

Les titracions de la bR silvestre a concentracions iòniques per sobre de 150 mM de KCl no presenten gaires canvis en el pK_a de l'Asp 85. El mutant P8W, però, presenta un valor menor de pK_a a mesura que es va incrementant la força iònica del medi des de 150 mM a 2 M de KCl. A la gràfica IV.43 es troben representats els canvis d'absorbància a 630 nm en funció del pH del mutant P8W en diferents condicions de força iònica del medi.

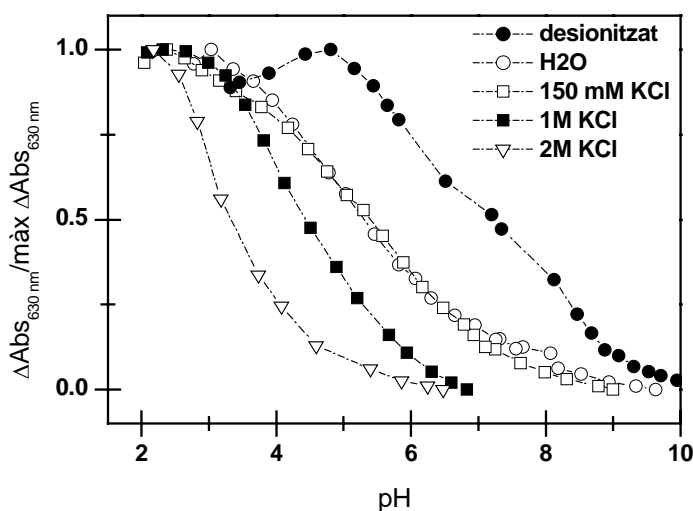


Figura IV.43. Representació de l'increment d'absorbància a 630 nm en funció del pH per al mutant P8W desionitzat, en H₂O, 150 mM, 1 M i 2 M de KCl, adaptat a la foscor i temperatura ambient. Les dades per a cada condició han estat normalitzades entre 0 i 1.

En condicions de 150 mM KCl el pK_a obtingut és 5,4, però en augmentar la concentració de KCl a 1M el pK_a obtingut és 4,3 i en 2 M de 3,3. Igual que en l'anàlisi

dels espectres de diferència entre les formes adaptades a la llum i a la foscor, ens tornem a trobar canvis depenent de la força iònica del medi. L'increment de la força iònica del medi, a més, produeix una menor amplada de la corba indicant que l'apantallament de les càrregues elèctriques superficials de la proteïna pot eliminar la protonació d'altres grups diferents de l'aspàrtic 85 per produir la forma blava.

IV.3.2.3. Comportament de la bR front l'alcalinització del medi

A la figura IV.44 es troben representats els espectres de diferència del procés d'alcalinització del medi de la bR silvestre i dels mutants P8W, P77G i P200G. Es pot apreciar que, a pH més neutres, tots tres mutants presenten una major proporció de membrana vermella (banda a 470 nm) que la bR silvestre.

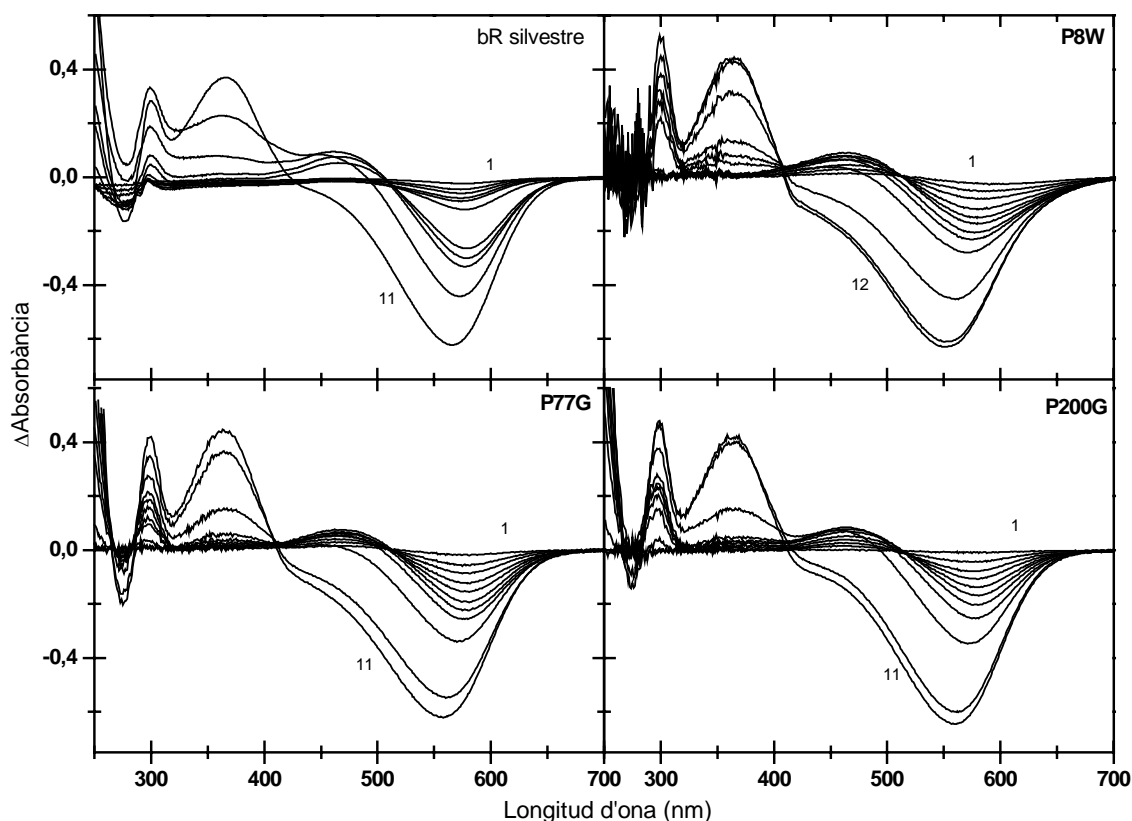


Figura IV.44. Espectres de diferència entre pH_i , indicats a sota, i pH neutre. Els espectres d'absorció es varen obtenir a partir de mostres resuspeses en 150 mM de KCl i adaptades a la foscor de la bR silvestre i dels mutants P8W, P77G i P200G. On: bR silvestre amb pH_i (de l'1 a l'11) 6,0; 7,7; 9,2; 9,7; 10,5; 11,0; 11,7; 12,1; 12,2; 12,4; 12,7 i 12,8. P8W amb pH_i (de l'1 al 12): 7,1; 7,4; 7,7; 8,1; 8,6; 9,3; 11,5; 11,9; 12,1; 12,4; 12,7 i 13,0. P77G amb pH_i (de l'1 a l'11): 8,7; 9,2; 10,0; 11,0; 11,8; 12,2; 12,4; 12,7; 12,9 i 13,3. i el mutant P200G amb pH_i (de l'1 a l'11): 6,9; 8,5; 9,8; 11,0; 11,6; 11,9; 12,0; 12,3; 12,6; 12,9 i 13,1.

La representació de l'evolució de cadascuna de les espècies obtingudes en alcalinitzar el medi (figura IV.45) mostra com efectivament a tots tres mutants la forma vermella apareix a valors de pH menors que a la bR silvestre, indicant una desprotonació prematura de la BS, sent el mutant P8W on es produeix la desprotonació a pH més baixos. S'observa a més que en el mutant P8W el màxim de forma vermella obtingut s'assoleix a pH 9 en comptes de a pH 12 com succeeix en la bR silvestre i els altres mutants, i que aquest màxim es manté constant fins a pH 12, moment en el que es comença a observar una disminució en la quantitat de forma vermella com a conseqüència de la desnaturalització de la proteïna. L'increment de forma vermella en funció del pH de la figura IV.45 mostra que el percentatge de molècules de bR que estan en aquesta forma en mutant P8W presenten un pK_a de la BS aproximat de 7,5.

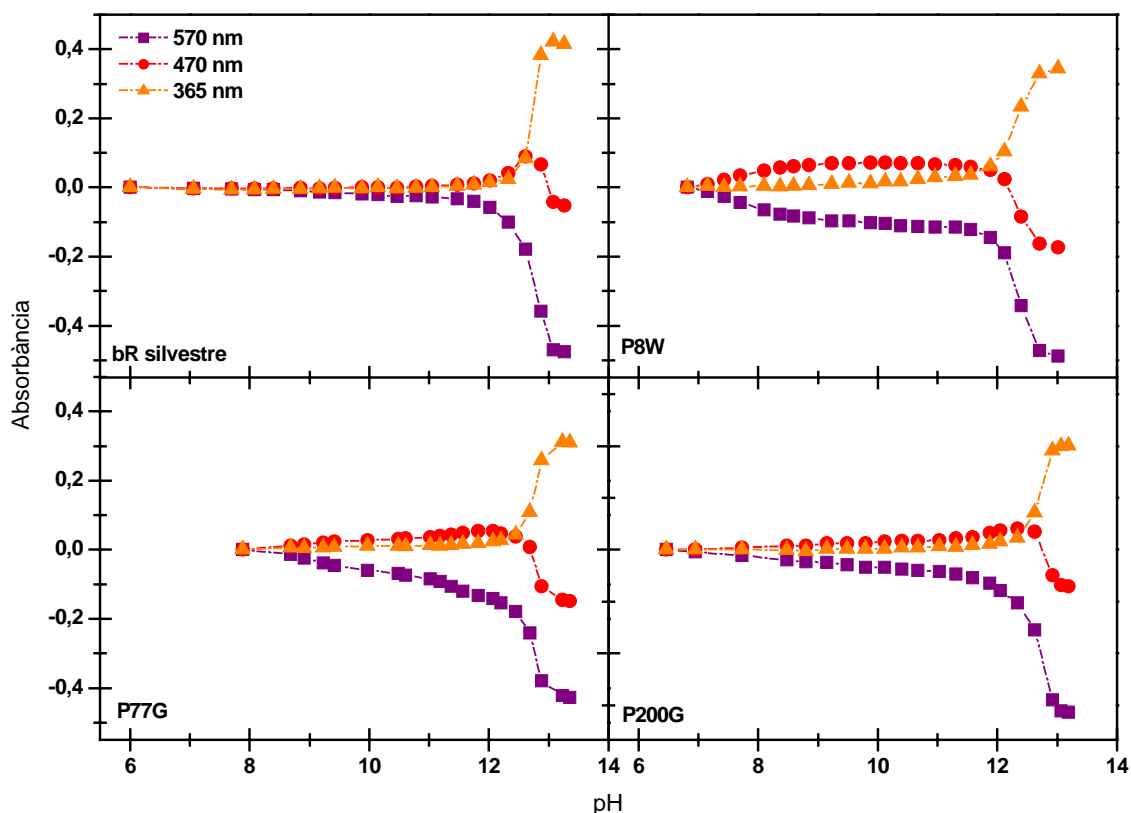


Figura IV.45. Representació del canvi d'absorbància a 570 nm, 470 nm i 365 nm en funció del pH per a la bR silvestre i els mutants P8W, P77G i P200G en 150 mM KCl, temperatura ambient i adaptats a la foscor. Els valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV.44.

La formació de bR vermella en el mutant P8W de fet es troba solapada amb la transició púrpura-blau. A la figura IV.46 A es pot apreciar que en incrementar-se el pH del medi des de 2 a 9 es produeixen dues transicions, una primera (en blau) on es passa

des de la forma blava (594 nm) a la forma més púrpura (555 nm) on hi ha una barreja de bR blava i púrpura, i una segona (en vermell) on es passa de la barreja blava-púrpura a una barreja púrpura-vermella. L'evolució de les dues transicions es troben representades a les figures IV.46.B i C on s'ha pres com a espectre de referència l'espectre en negre on encara no ha acabat la transició blau-púrpura i no ha començat l'aparició de forma vermella. Així doncs al mutant P8W es comença a observar clarament l'aparició de membrana vermella a partir de pH 6, cinc unitats de pH per sota de la bR silvestre (figura IV.45).

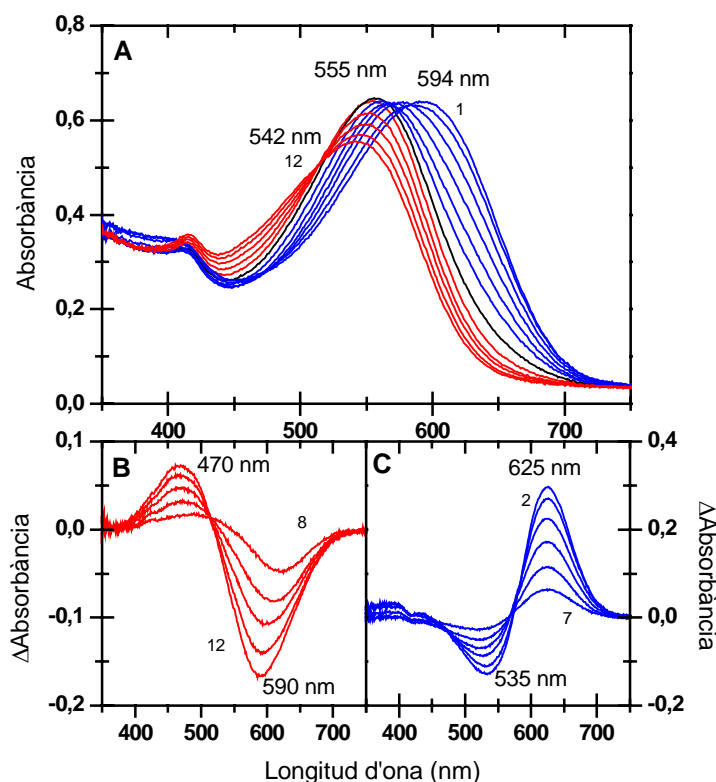


Figura IV.46. (A) Espectres d'absorbància del mutant P8W en 150 mM KCl, adaptat a la foscor i temperatura ambient en disminuir el pH del medi. (De l'1 al 12) 2,4; 2,9; 3,8; 4,5; 5,1; 5,6; 6,2; 6,8; 7,2; 7,6; 8,3; 9,0. (B) Espectres de diferència dels espectres a pH per sobre de l'espectre de referència pH 6,2. (C) Espectres de diferència dels espectres a pH per sota de l'espectre de referència pH 6,2. En blau estan representats els espectres de la transició blau-púrpura, en vermell els de la transició púrpura-vermell i en negre es troba indicat l'espectre de referència.

En els mutants P77G i P200G s'observa també una aparició avançada de la forma vermella, tenint a pH 10 un 51 % i 35 % respectivament del total de la forma vermella formada. En el mutant P8W a aquest pH s'obté el 100 % de l'aparició d'aquesta forma, comparat amb l'1 % de la bR silvestre. El pK_a de desnaturalització dels mutants P77G i P200G, tot i presentar una aparició avançada de forma vermella és

el mateix que l'obtingut a la bR silvestre (taula IV.14), indicant que l'estabilitat d'aquests mutants front al pH alcalí no varia tot i que la BS es comença a desprotonar abans. El mutant P8W però, presenta un pK_a de desnaturalització 0,4 unitats de pH per sota de la bR silvestre indicant en aquest cas una quasi inapreciable menor estabilitat de la proteïna front l'alcalinització del medi. Aquí tenim un exemple més de que no sempre hi ha un acoblament entre la desprotonació de la BS i l'aparició de la forma absorbint a 365 nm.

Taula IV.14. Valors de pK_a de desnaturalització alcalina de la bR silvestre i bR mutants adaptats a la foscor en 150 mM KCl i temperatura ambient.

| Mostra | pK_a desnaturalització |
|--------------|--------------------------|
| bR silvestre | $12,8 \pm 0,1$ |
| P8W | $12,4 \pm 0,2$ |
| P77G | 12,7 |
| P200G | $12,7 \pm 0,1$ |

A la figura IV.47 es veu clarament que hi ha una important disminució de l'absorbància a 570 nm a partir de pH més baixos en aquests mutants que a la bR silvestre, com a conseqüència de la formació de la forma vermella. La corba del mutant P8W mostra clarament la ràpida aparició d'aquesta forma.

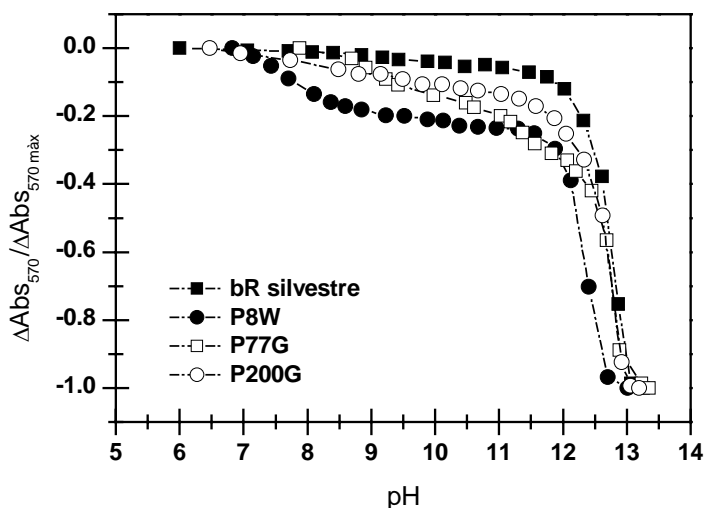


Figura IV.47. Increment d'absorbància a 570 nm en funció del pH per la bR silvestre i els mutants P8W, P77G i P200G en 150 mM KCl, adaptats a la foscor i temperatura ambient. Aquests valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV.44. Els valors han estat normalitzats entre 0 i -1.

IV.3.2.4. Reacció de la hidroxilamina amb la Base de Schiff

D'entre tots els mutants estudiats l'únic que sembla presentar un comportament normal versus la incubació amb hidroxilamina és el mutant P8G (figura IV.48), encara que per qüestió de falta de material no s'ha pogut estudiar l'accessibilitat en condicions de no il·luminació. Semblaria doncs que la substitució de la prolina 8 per una glicina no produiria cap canvi estructural de la proteïna en termes d'obertura de les hèlices, al menys durant el fotocicle.

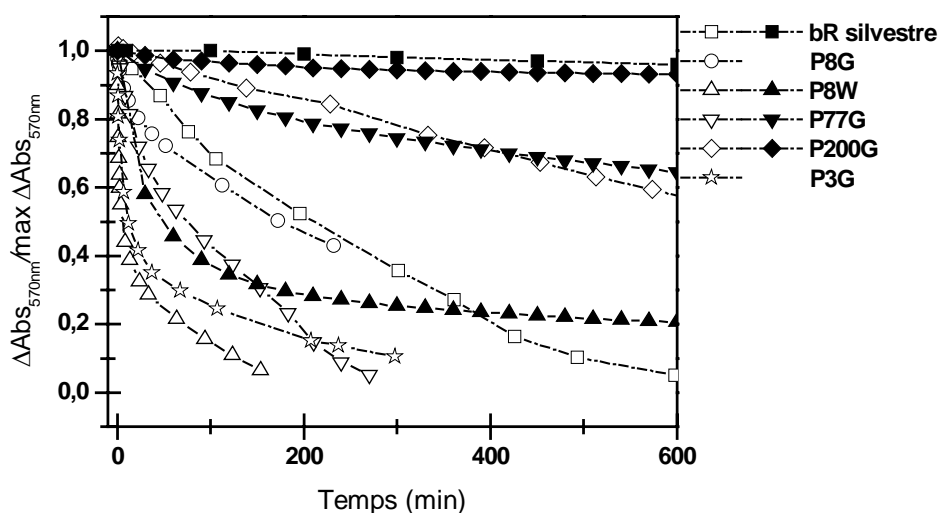


Figura.IV.48. Cinètiques de desaparició de la banda a 570 nm en presència d'1 M d'hidroxilamina, 150 mM tampó fosfat, pH 7,0 i temperatura ambient. Els símbols en negre es corresponen a l'incubació realitzada sota condicions de foscor i els símbols buits en condicions d'il·luminació a 300 lux. Per a la bR silvestre i els mutants P8G, P8W, P77G, P200G i 3PG.

Quan la prolina 8 però, es substituïda per un triptòfan es produeix un dràstic descens en el temps mitjà necessari tant per a que la hidroxilamina hidrolitzi el retinal en absència com en presència d'il·luminació (taula IV.15). A més en aquest mutant la cinètica d'hidròlisi del retinal passa de ser monoexponencial a ser biexponencial. Així doncs semblaria que la hidròlisi del retinal en el mutant P8W tindria dos components diferents, un més ràpid i majoritari (65 % DA i 52 % LA) i un més lent i minoritari (35 % DA i 48 % LA). L'elevada velocitat de reacció de la hidroxilamina en els mutants P8W i 3PG corrobora la idea d'una menor compactació de la proteïna en termes d'obertura de les hèlices, al menys en la regió extracel·lular.

El mutant P77G presenta una major accessibilitat per la hidroxilamina que la bR silvestre en l'estat basal de la proteïna, de manera que aquesta prolina sembla important pel manteniment de la compactació de la bR. La compactació durant el fotocicle també

és menor en aquest cas, encara que la velocitat de reacció de la hidroxilamina només es veu incrementada unes dues vegades comparat amb la bR silvestre.

El més sorprenent és el resultat obtingut en el cas de la mutació P200G on s'observa que en substituir aquesta prolina per una glicina s'incrementa el temps de reacció de la hidroxilamina durant el fotocicle comparat amb la bR silvestre. Aquest fet indicaria que la prolina 200 no participaria en el manteniment de la compactació de les hèlices en la regió extracel·lular com és el cas de la prolina 77, sinó que podria participar en facilitar l'obertura de la part final de les hèlices durant el fotocicle potser per afavorir l'expulsió del protó a la part extracel·lular.

Taula IV.15. Valors de $t_{1/2}$ per la bR silvestre i mutants del procés de reacció amb la hidroxilamina sota condicions d'il·luminació i fosc. A partir dels ajustos a exponencials de primer ordre s'han obtingut els valors de τ . El valor de $t_{1/2}$ s'obté multiplicant el valor de la τ per $\ln 2$. En el cas del mutant P8W i 3PG l'ajust ha estat biexponencial. Els valors marcats amb asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | $t_{1/2}$ (min) llum | $t_{1/2}$ (min) fosc |
|--------------|------------------------------|---------------------------|
| BR silvestre | 180 ± 17 | 10540 ± 600 |
| P8G | 179 ± 15 | - |
| P8W | $1,7 \pm 0,2 / 62 \pm 7^*$ | $24 \pm 3 / 792 \pm 57^*$ |
| P77G | $73 \pm 9^*$ | $1163 \pm 46^*$ |
| P200G | $557 \pm 100^*$ | 10720 ± 950 |
| 3PG | $3,4 \pm 0,5 / 127 \pm 14^*$ | - |

IV.3.2.5. Estabilitat tèrmica de la bR

IV.3.2.5.1. Espectroscòpia UV-Vis

L'estudi de l'estabilitat tèrmica dels diferents mutants mostra que a pH 7 (figura IV.49 i IV.51) els mutants P77G i P200G presenten una pràctica normalitat respecte a la bR silvestre. El mutant P8W però, no solament presenta una absència absoluta de forma blava en augmentar la temperatura sinó que també produeix una major proporció de forma vermella comparat amb la bR silvestre. El càlcul de la proporció de cadascuna de les espècies respecte al 100 % de la forma púrpura absorbent a 570 nm (taula IV.16), mostra que en tots tres mutants hi ha una menor formació de bR blava.

Aquest fet no es pot explicar com un efecte de l'elevat pK_a de l'Asp 85 en aigua en aquests mutants, ja que en el mutant P8W en aquestes condicions presenta un valor de pK_a de 5,4; i a pH 7,0 solament presenta un 15 % de membrana blava, així doncs l'absència d'aquesta forma no es deu a que a aquest pH ja hi hagi una elevada proporció de forma blava. Com que a la bR silvestre aquest percentatge és de pràcticament del 0 % el que cal esperar es que al mutant P8W la proporció de forma blava formada en augmentar la temperatura sigui menor que a la bR silvestre però no absent. El fet de que aquest mutant pugui presentar un menor contingut en cations, podria explicar aquest fenomen, ja que en no desplaçar-se els cations units en augmentar la temperatura, no es produiria la forma blava.

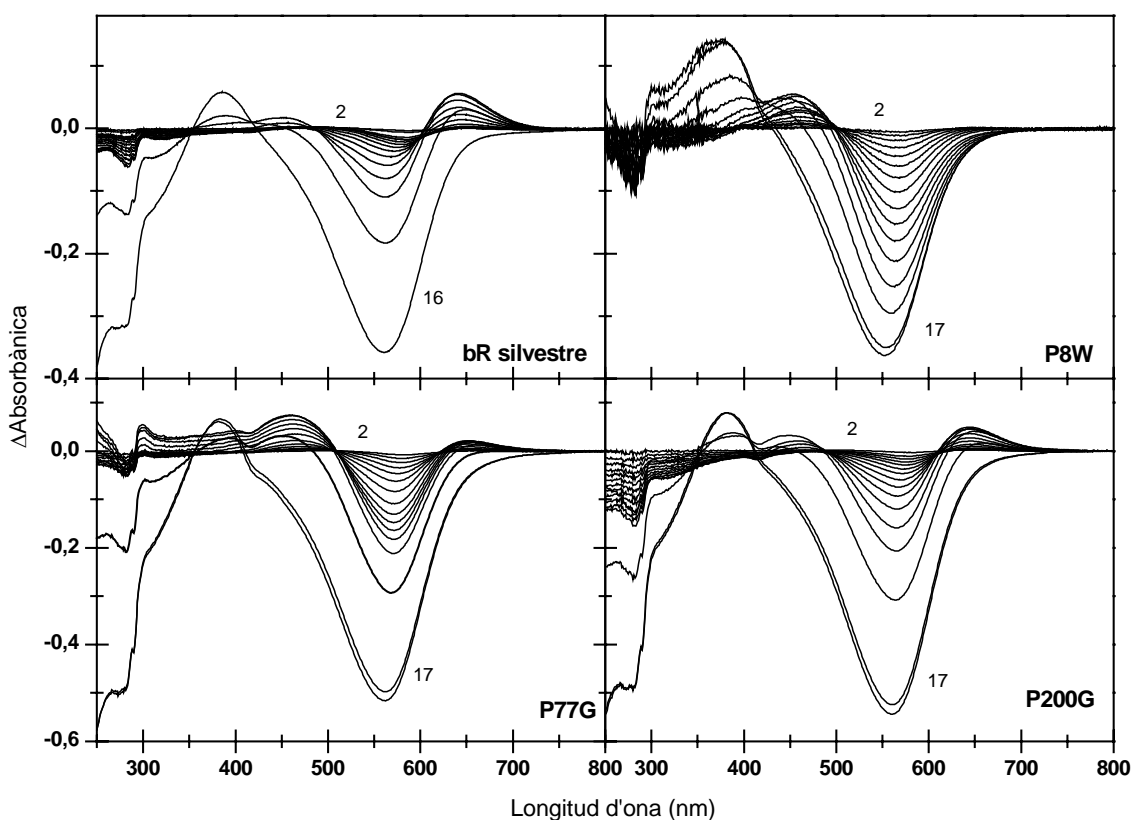


Figura IV.49. Espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants P8W, P77G i P200G en funció de la temperatura a pH 7,0, aigua i adaptats a la foscor. Del 2 al 17 increment de temperatura de 5° C des de 25 a 100° C.

L'absència de forma blava en el mutant P8W comporta la formació directa de bR vermella i retinal lliure sense passar prèviament per la forma blava. Per altra banda, els espectres de diferència de la figura IV.49 semblen mostrar una major proporció de la banda de retinal lliure al mutant P8W. Aquest fet és un artefacte, ja que mentre que a la

bR silvestre (figura IV.50.A) i altres mutants a mesura que s'augmenta la temperatura es produeix una major agregació de la mostra, en el cas del mutant P8W no es produeix aquest efecte (figura IV.50.B).

Taula IV.16. Valors en % de cadascuna de les espècies representades a la figura IV.49. en relació al 100 % de la forma púrpura de la bR silvestre i mutants. En asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | Forma blava | Forma vermella |
|--------------|-------------|----------------|
| bR silvestre | 16 | 5 |
| P8W | 0* | 15* |
| P77G | 4* | 15* |
| P200G | 9* | 6 |

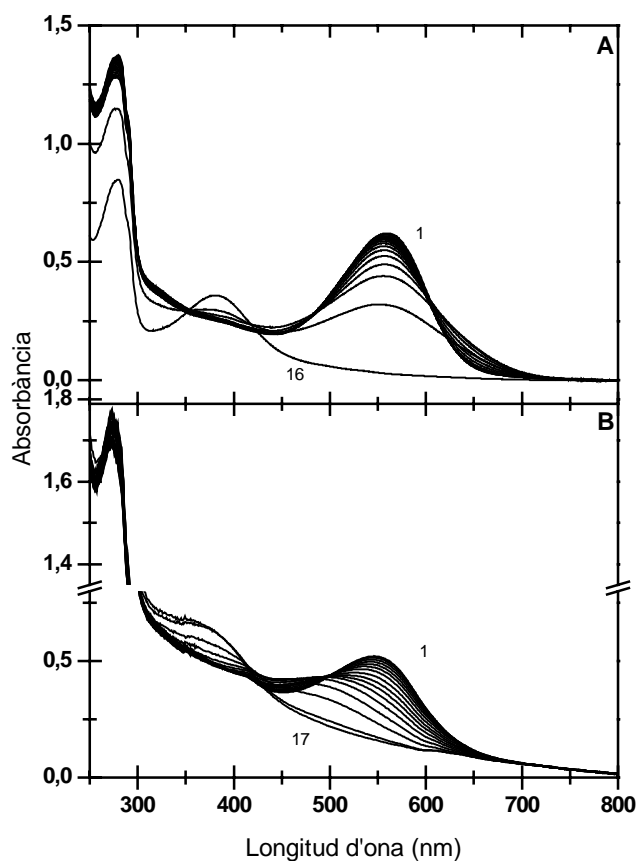


Figura IV.50. Espectres d'absorbància en funció de la temperatura de la bR silvestre (A) i mutant P8W (B), en 150 mM KCl i mostres adaptades a la foscor. De l'1 al 17 espectres a temperatures creixents de 5° C des de 20 a 100° C.

En el cas del mutant P77G es produeix una certa proporció de forma blava encara molt menor que a la bR silvestre. Aquesta menor proporció de forma blava obtinguda podria ser deguda a una major proporció de membrana vermella. El mutant P200G també presenta una menor proporció de forma blava però, en aquest cas no queda compensat amb un major augment de forma vermella (figura IV.49 i taula IV.16).

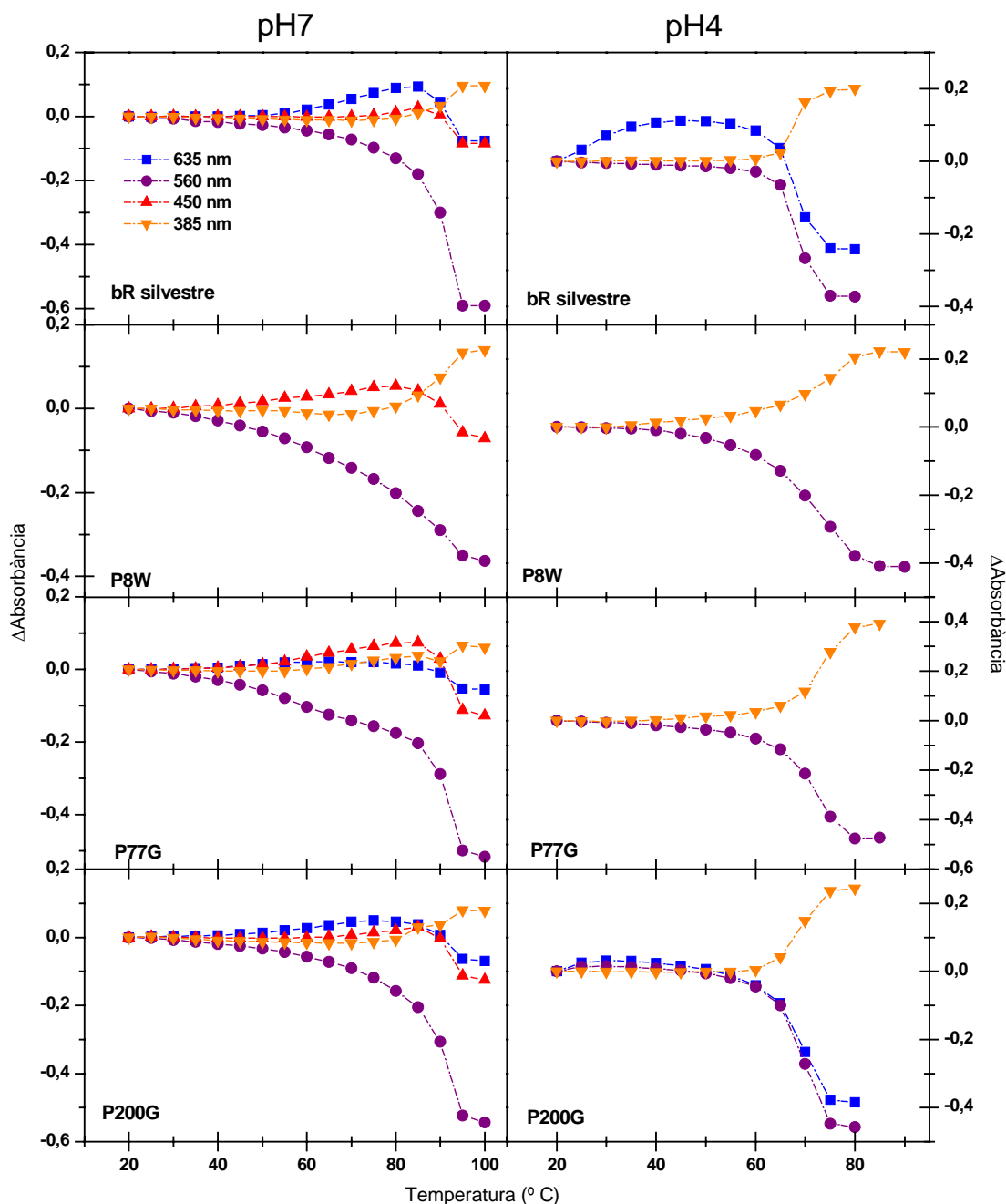


Figura IV.51. Representació dels canvis d'absorbància a les longitud d'ona 635, 560, 450 i 385 nm en funció de la temperatura de la bR silvestre i mutants P8W, P77G i P200G a pH 7 i 4 adaptats a la foscor. En el cas dels tres mutants la corba representada en púrpura a pH 4, es correspon amb un màxim d'absorbància desplaçat a 600 nm.

Taula IV.17. Valors de T_m de desnaturalització de la bR silvestre i mutants en H_2O a pH 7,0 i 4,0. Els valors marcats amb asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | pH7 | pH4 |
|--------------|----------------|------------------|
| bR silvestre | $90,5 \pm 0,2$ | $68,1 \pm 0,3$ |
| P8W | $90,3 \pm 1$ | $71,7 \pm 0,8^*$ |
| P77G | $91,2 \pm 0,4$ | $72,2 \pm 0,8^*$ |
| P200G | $90,9 \pm 1$ | $68,8 \pm 0,3$ |

L'estudi de l'estabilitat tèrmica d'aquests mutants a pH 4,0 (figura IV.51) mostra que hi ha una absència total de formació de forma blava en els mutants P8W i P77G i quasi absent en P200G. Aquest fet és esperable tenint en compte que aquests mutants presenten un pK_a de l'Asp 85 en aigua molt elevat (taula IV.13), de manera que a pH 4,0 ja s'hauria format la bR blava quasi totalment. Així doncs, en escalfar les mostres no es podria produir més forma blava.

Les dades de la taula IV.17 mostren que els mutants estudiats P8W, P77G i P200G presenten una estabilitat tèrmica bastant similar a la bR silvestre a pH 7 encara que a pH 4 sembla que aquestes mutacions produeixen una major estabilitat de la proteïna en front de la temperatura. Aquesta major estabilitat a pH àcid pels mutants P8W i P77G correspon a una menor cooperativitat, ja que la forma desnaturalitzada comença a aparèixer al voltant dels 35° C.

IV.3.2.5.2. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

L'obtenció dels termogrames per DSC mostra que els mutants P8W i P77G tenen una transició principal amb una T_m lleugerament menor, indicant que aquestes mutacions desestabilitzen lleugerament la proteïna en front l'augment de temperatura (figura IV.52 i taula IV.18). La mutació P200G quasi no produeix cap efecte en l'estabilitat de la bR.

La pre-transició però, tant del mutant P8W com del P77G mostra no solament un menor valor de T_m (taula IV.18) sinó que a més aquesta transició és quasi inapreciable (figura IV.52). Aquest fet es trobaria lligat a una ordenació paracristal·lina alterada de la membrana púrpura, segurament degut a un menor contingut en cations en aquests mutants. El mutant P200G sembla no presentar cap alteració en l'estabilitat tèrmica com

ho indica el valor quasi normal de la T_m principal (taula IV.18). L'absorció de calor degut a la desorganització de la membrana púrpura a aquest mutant però, tot i tenir un valor de T_m comparable a l'obtingut a la bR silvestre, té una forma molt diferent. Al termograma de la figura IV.52 es pot apreciar com a partir de 50°C es dóna un increment paulatí d'absorció de calor. Aquest podria indicar la presència de varies transicions consecutives que contribuirien a la desorganització, potser més important, de la xarxa paracristal·lina.

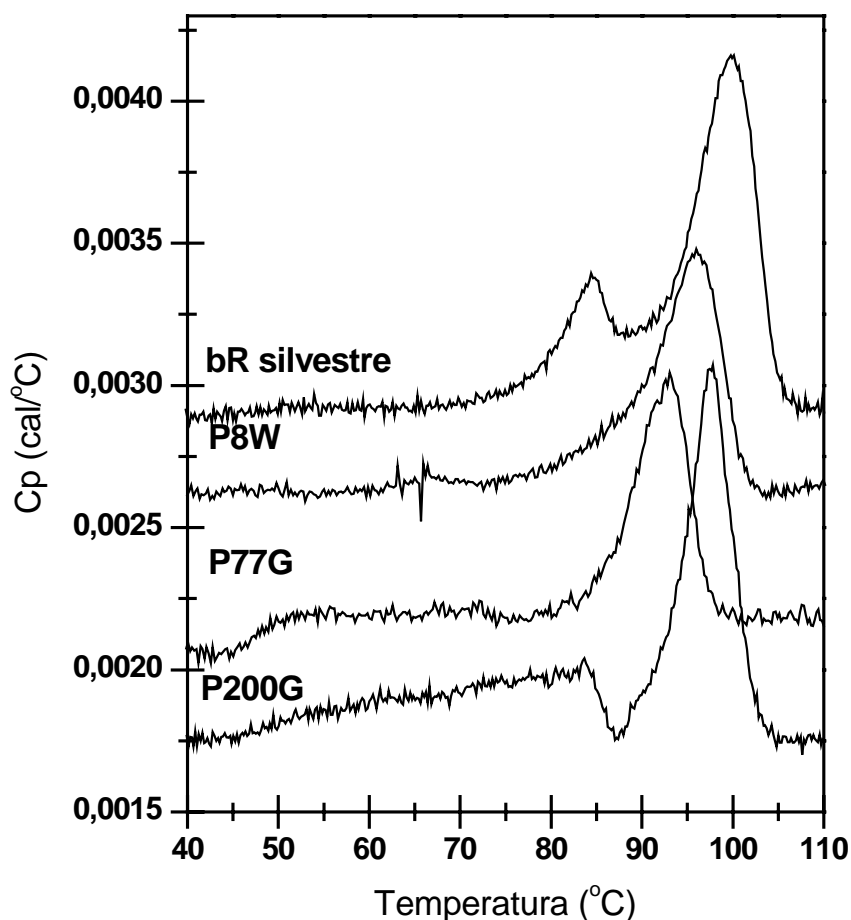


Figura IV.52. Termogrames obtinguts per la bR silvestre i pels mutants en esclafar les mostres des de la temperatura de 25°C a 110°C i una vegada corregits per a la línia base. La velocitat d'escombrat és de $1,5^\circ\text{K/min}$. Les mostres es troben dialitzades front H_2O i a un pH de 6,5.

Cal destacar que les dades obtingudes per UV-Vis i DSC no coincideixen exactament ja que les característiques de cada experiment són diferents tal i com es comenta a la secció IV.2.2.5.2.

Taula IV.18. Valors obtinguts per DSC de les T_m de les transicions tèrmiques que tenen lloc a la bR silvestre i als mutants en aigua i pH 6,5. Els valors marcats amb asterisc es corresponen a aquells que es considera que difereixen amb els obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | T_m pre-transició | T_m transició principal |
|--------------|---------------------|---------------------------|
| bR silvestre | $82,3 \pm 0,6$ | $98,8 \pm 1,5$ |
| P8W | $63,3 \pm 3,1^*$ | $96,3 \pm 0,6^*$ |
| P77G | $72,5 \pm 0,5^*$ | $92,2 \pm 0,5^*$ |
| P200G | $79,3 \pm 3,2$ | $97,0 \pm 1,7$ |

IV.3.3. ESTUDI FUNCIONAL

IV.3.3.1. Cinètica de l'intermediari M

L'estudi de la cinètica de l'intermediari M per fotòlisi de llampec d'aquests mutants revela que cap dels canvis observats anteriorment afecta de manera important aquest intermediari (figura IV.53).

Els valors de la taula IV.19 indiquen uns petits canvis a nivell de formació d'M tant a pH 6,5 com 10,0 en els mutants P77G i P200G, tenint un segon component el doble de ràpid que la bR silvestre. Així doncs, la formació de M_2 és més ràpida indicant una desprotonació més ràpida del CAP o una acceleració en l'accessibilitat de la BS cap al costat citoplasmàtic, en mutar aquestes prolines per glicines. Els únics canvis observables al mutant P8W és una desaparició més ràpida d' M^s a pH 10, indicant una reprotonació de l'Asp 96 més ràpida. Aquest mutant a més presenta una aparició més lenta del primer component d'M a pH 10, es a dir, una desprotonació més lenta de la BS, de fet el mutant P8W presenta una independència de desprotonació de la BS del pH del medi (taula IV.19). Per altra banda, l'únic efecte que en principi produeix la mutació P8G és produir un enlentiment en la desprotonació de la BS a pH neutre.

La substitució de la prolina 8 tant per una glicina o un triptòfan produeix un augment en l'acumulació d' M_1 a pH neutre. Aquest fet pot ser degut a una major acumulació de l'intermediari L, potser degut a una més ràpida aparició d'aquest intermediari, ja que la formació d' M_2 en aquest mutants és comparable a la bR silvestre. Així doncs aquesta acumulació podria ser deguda a un afavoriment en la reisomerització del retinal des de *tot-trans* a *13-cis* (veure secció I.6.2) en substituir la prolina 8.

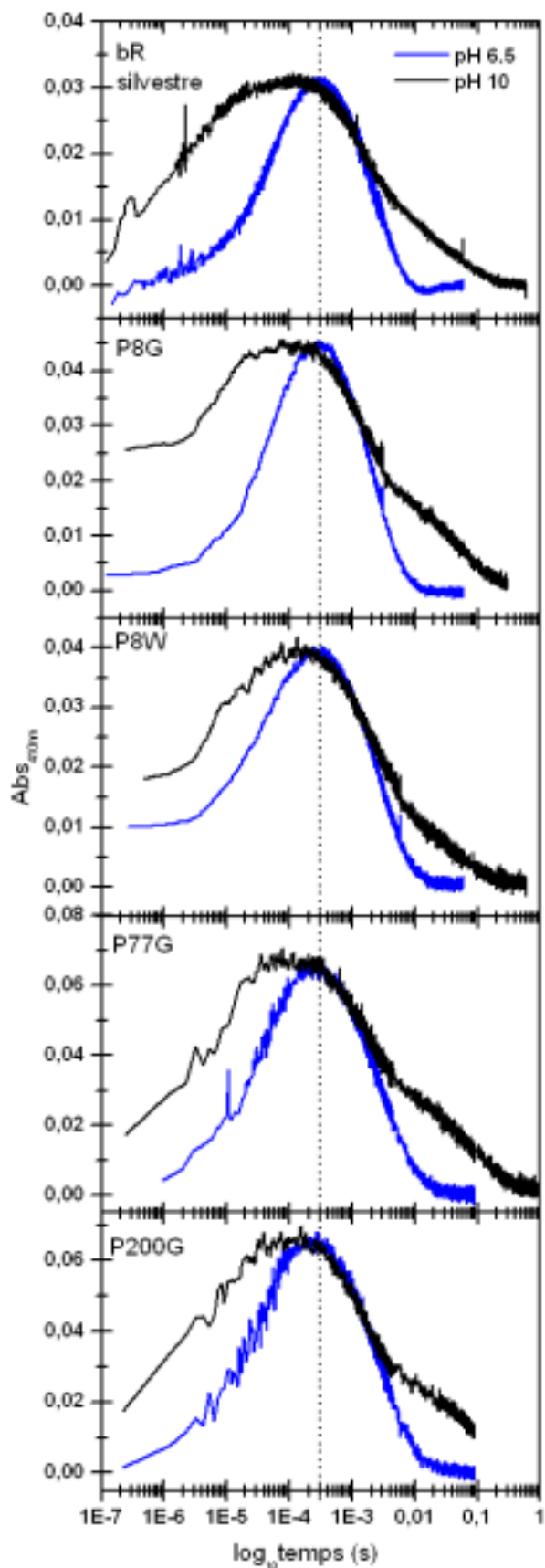


Figura IV.53. Cinètica de l'intermediari M de la bR silvestre i els mutants P8G, P8W, P77G i P200G en 1M de KCl i temperatura ambient a pH 6,5 i 10,0.

Taula IV.19. Valors de τ de la cinètica d'aparició i desaparició de l'intermediari M en 1 M de KCl i temperatura ambient a pH 6,0 i 10,0 per a la bR silvestre i mutants. Els valors indicats amb asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | Formació M (μ s) | | Desaparició M (ms) | |
|-----------|-----------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| | pH 6,5 | pH 10 | pH 6,5 | pH 10 |
| bR | 3,6 \pm 0,7 (10 %) | 2,3 \pm 0,4 (75 %) | 3,5 \pm 0,5 | 1,9 \pm 0,5 (54 %) |
| silvestre | 68 \pm 11 (90 %) | 20 \pm 3 (25 %) | | 67 \pm 18 (46 %) |
| P8G | 5,1 \pm 0,2 (58 %)* | 2,3 \pm 1,1 (73 %) | 3,1 \pm 0,7 | 1,9 \pm 0,1 (62 %) |
| | 58 \pm 3 (32 %) | 21 \pm 1 (27 %) | | 53 \pm 2 (38 %) |
| P8W | 4,7 \pm 1,7 (60 %) | 4,7 \pm 1,1 (74 %)* | 3,6 \pm 0,6 | 2,2 \pm 0,4 (69 %) |
| | 62 \pm 0 (40 %) | 24 \pm 4 (26 %) | | 44 \pm 1 (31 %)* |
| P77G | 2,9 \pm 1,7 (28 %) | 0,8 \pm 0 (55 %)* | 3,5 \pm 1,3 | 2,1 \pm 0,1 (64 %) |
| | 39 \pm 8 (72 %)* | 13 \pm 2 (45 %)* | | 80 \pm 17 (36 %) |
| P200G | 3,1 \pm 0,9 (20 %) | 1,0 \pm 0,6 (53 %)* | 3,0 \pm 0,7 | 1,9 \pm 0,1 (68 %) |
| | 38 \pm 3 (80 %)* | 11 \pm 2 (47 %)* | | 61 \pm 16 (42 %) |

Per altre costat les mutacions P77G i P200G són les que produeixen una major acumulació d' M_2 a pH bàsic però no a pH neutre. Observant els temps de formació d' M_2 a aquest pH en aquest mutants, es detecta que la formació d'aquest intermediari és quasi dues vegades més ràpida en aquests dos mutants que a la bR silvestre, però la seva desaparició no varia. Aquest fet doncs determina que l'acumulació d' M_2 a aquest pH sigui major que a la bR silvestre.

La més ràpida desaparició del component lent (M^s) a pH 10 indicaria una reprotonació de l'Asp 96 més afavorida a pH bàsics al mutant P8W que a la bR silvestre.

La proporció d' M produït a cadascun dels mutants és del 100 % comparat amb la bR silvestre. De manera que a la mateixa concentració de proteïna i intensitat de llum, totes les mostres donen la mateixa intensitat d'absorbància a 410 nm.

IV.3.3.2. Bombeig de protons detectats amb piranina

Els canvis temporals de la cinètica de bombeig de protons per a aquests mutants són molt subtils, amb una petita acceleració en la captació del protó en els mutant P8G, P8W i P77G (figura IV.54).

La intensitat del senyal de la piranina però és diferent en aquests mutants, de manera que per a la mateixa concentració de bR el mutant P8G té un percentatge de bombeig de protons del 100 % comparat amb la bR silvestre, el mutant P8W té una activitat bombejadora del 30 %, el mutant P77G del 50 % i el mutant P200G del 40%. Així doncs si el percentatge de bombeig és menor en alguns d'aquests mutants, vol dir que en no tots els fotocicles es produeix el bombeig de protons. Això vol dir per exemple que només el 30 % de les molècules de P8W que inicien el fotocicle transporten protons. L'altra 70 % podria no completar el fotocicle retornant a l'estat basal mitjançant un fotocicle alternatiu ó directament des de l'intermediari M.

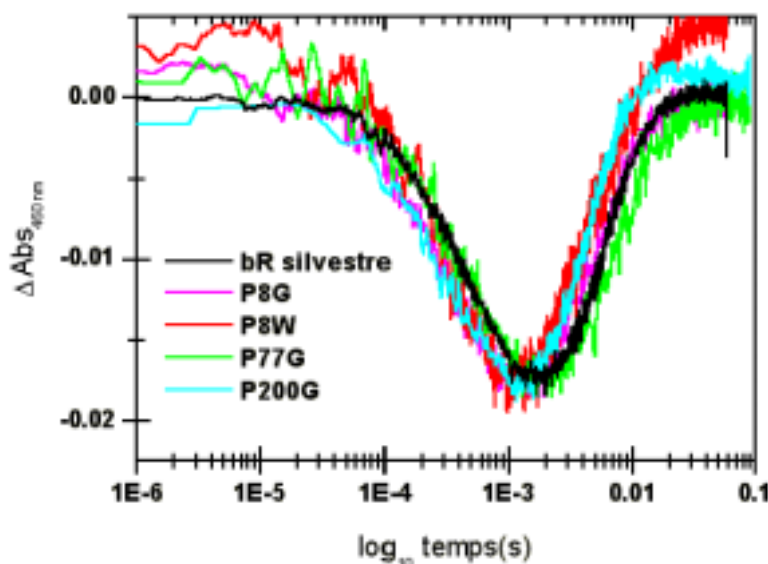


Figura IV.54. Cinètica de bombeig de protons en forma dels canvis d'absorbància a 460 nm de la piranina en funció del temps per bR silvestre i els mutants P8G, P8W, P77G i P200G en 1M de KCl, pH 7,2; 50 μ M de piranina i temperatura ambient. Els espectres han estat normalitzats per a una mateixa intensitat.

Aquests resultats suggereixen que la mutació d'aquestes prolines no produeix cap canvi significatiu en els temps d'expulsió i recaptació del protó, però en canvi l'eficiència de transport de protons de la proteïna quedaria considerablement afectada.

IV.3.3.3. Fotocorrents

L'estudi dels moviments de càrregues elèctriques sobre la bR orientada en gels de poliacrilàmida mostra que els mutants P8G i P200G presenten un pK_a pràcticament normal del CAP a l'estat basal (figura IV.55).

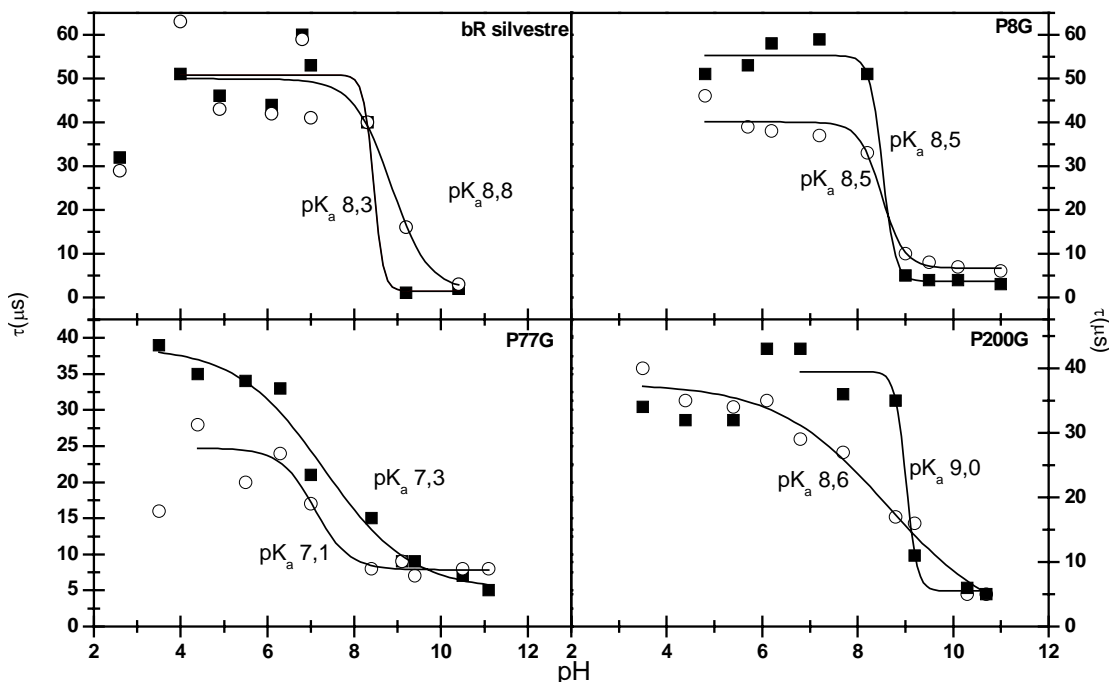


Figura IV.55. Representació de la constant de caiguda del component B2, quadre negre, i de la formació de M, cercle buit, en funció del pH per la bR silvestre i els mutants P8G, P77G i P200G en 100 mM de KCl.

El mutant P77G però presenta un descens d'una unitat de pH d'aquest pK_a indicant que la substitució d'aquesta prolina indueix canvis en l'entorn del CAP. En tots els casos, el pK_a obtingut de les fotocorrents és molt similar a l'obtingut a partir de l'aparició de l'intermediari M.

IV.3.3.4. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)

IV.3.3.4.1. Espectres de diferència de l'intermediari M

Els espectres de diferència corresponents a l'intermediari M obtinguts per FTIR indiquen sobre tot alteracions a nivell de l'amida I als mutants P8W, P77G i P200G, comparats amb la bR silvestre. En els dos darrers mutants sobretot, es poden observar que hi ha pocs canvis a nivell de les hèlices α entre l'estat basal i l'intermediari M (regió al voltant de 1650 cm^{-1} en la figura IV.56). Aquest fet indicaria que o bé en aquests mutants no es produeixen canvis conformationals durant el fotocicle o bé que aquestes hèlices ja es troben suficientment obertes a l'estat basal i que la seva conformació gairebé no canvia en formar-se l'intermediari M.

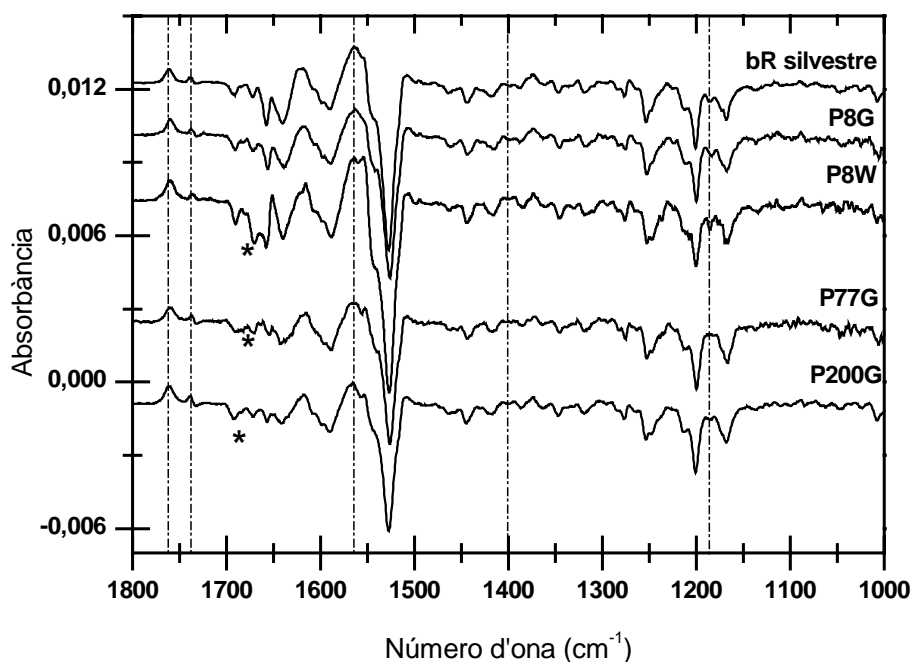


Figura IV.56. Espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants P8G, P8W, P77G i P200G obtinguts a partir de film sec de MP a pH 10, 150 mM KCl i -30°C . L'intermediari atrapat és l'M. * canvis per tenir en compte.

Un canvi important que s'ha observat durant l'obtenció dels espectres d'infraroig en aquests mutants en diferents condicions de temperatura i humitat (taula IV.20) és que tendeixen a acumular l'intermediari N. Als mutants P8G, P8W i 3PG la proporció d'intermediari M que s'aconsegueix atrapar sota aquests condicions és molt baix obtenint-se per tant un senyal molt pobre.

Taula IV.20. Intermediari atrapat a la bR silvestre i diferents mutants en 150 mM de KCl, pH 10,0 en diferents condicions de temperatura i humitat.

| Mostra | 4°C | | -30°C | |
|--------------|---------------------|-------|-----------------------|-----|
| | Humit | Sec | Humit | Sec |
| bR silvestre | N | M | MN | M |
| P8G | N | M | M | M |
| P8W | N | N | N_M | M |
| P77G | N | M | M | M |
| P200G | N | M o N | M o N | M |
| 3PG | - | MN | MN | M |

IV.3.3.4.2. Espectre de diferència de l'intermediari N

L'estudi de l'intermediari N dels diferents mutants mostra també molt poques diferències comparat amb la bR silvestre, algunes de les quals es troben localitzades a la regió de l'amida I indicant també en aquest cas diferències en el moviment de les hèlices en aquests mutants.

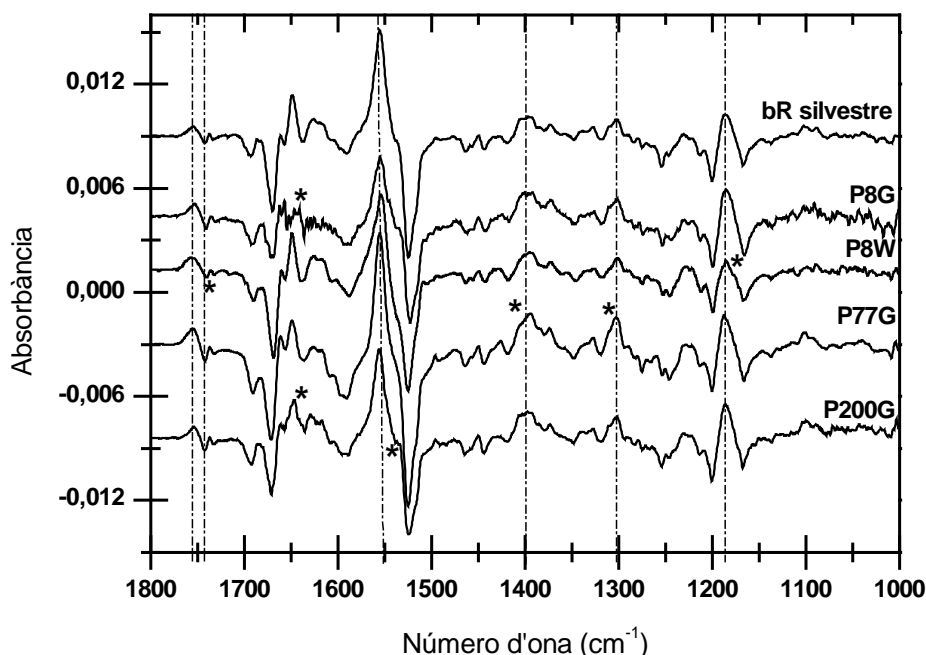


Figura IV.57. Espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants P8G, P8W, P77G i P200G obtinguts a partir de films humits de MP a pH 10, 150 mM KCl i 4° C. L'intermediari atrapat és l'N. * canvis per tenir en consideració. En el cas del mutant P8W l'intermediari N mostrat prové d'un film sec en comptes d'un humit per que sota aquestes condicions l'espectre obtingut és millor.

IV.3.4. Discussió

La disposició de les prolines 8, 77 i 200 en forma de butxaca on s'allotgen diverses molècules d'aigua va despertar l'interès del nostre grup. L'estudi de l'estructura de Luecke et al (1999a) indica unes posicions d'aquestes prolines pròximes a les molècules d'aigua 415, 416, 417 i 418 (figura I.20). Estudis de Chakrabarti et al. (1998) indiquen la possibilitat de les prolines en formar ponts d'hidrogen amb el seu carboni δ . Les distàncies però, entre aquests carbonis i les molècules d'aigua semblen ser massa importants (de l'ordre de 4 Å) com perquè es formin interaccions per ponts d'hidrogen, tot i que la pròpia agitació molecular podria facilitar l'apropament de les molècules d'aigua a les prolines i aquestes interaccions podrien ser possibles.

Les prolines per altra banda son residus que formen torsions degut a la rigidesa del seu grup radical, es per aquest motiu que les prolines 8, 77 i 200 podrien ser importants per mantenir la correcta disposició dels diferents grups que interaccionen amb les aigües, com són per exemple el glutàmic 9 i la leucina 201. De fet les torsions d'aquestes prolines també poden afavorir per altra banda les interaccions del glutàmic 9 amb la tirosina 79, o el glutàmic 204 amb la serina 193 i el glutàmic 194 ja que com s'observa a la figura I.20 la prolina 200 forma un pont d'hidrogen amb el glutàmic 204.

La substitució d'aquestes prolines per glicines comporten la pèrdua de la rigidesa del grup radical i per tant la possible ruptura d'interaccions entre els grups veïns. La construcció del mutant P8W es va realitzar amb l'objectiu de determinar si la introducció d'un grup voluminós en la butxaca podia desorganitzar el complex format per les quatre molècules d'aigua i així poder determinar la funció d'aquest microambient. Els resultats obtinguts en aquest mutant van donar lloc a la construcció del mutant 3PG, on les tres prolines es van substituir simultàniament per glicines per comprovar si aquest fet podia comportar les mateixes conseqüències que en introduir un triptòfan en aquesta regió.

El primer fet amb els que ens vam trobar va ser que en fer la mutació P8G la quantitat de bR extreta d'aquests mutants era molt petita, en el millor dels casos de l'ordre de 0,5 mg/l comparat amb els 20 mg/l de la bR silvestre o els 10 mg/l d'altres mutants. En el cas del mutant 3PG també ens vam trobar amb el mateix problema de producció de bR segurament degut a que en aquest mutant també hi ha la mutació P8G. El mutant P8W però, presenta un nivell d'expressió de bR similar a altres bR mutants. Així doncs sembla ser que és la presència d'una glicina en la posició 8 més que l'absència de la prolina el fet que determina la precària obtenció de bR mutant. El nivell en el que es produeix la inhibició de la producció de bR és un tema que no ha sigut estudiat i que seria interessant de fer-ho per tal de determinar l'efecte de la glicina 8 en la producció de la proteïna.

És degut a l'escassa obtenció de bR mutants P8G i 3PG, que molts dels experiments realitzats als altres mutants, o bé no s'han pogut dur a terme en aquests dos mutants o bé s'ha fet una sola vegada i no s'han realitzat duplicacions. La substitució de la prolina 8 per una glicina pràcticament no ha implicat cap canvi substancial comparat amb la bR silvestre en els experiments que s'han pogut realitzar, exceptuant un

increment del pK_a de l'Asp 85. La manca d'una informació completa per falta de realització de més experiments no fa possible trobar la causa d'aquesta alteració.

Els efectes més importants s'han obtingut en substituir aquesta prolina per triptòfan, començant per un espectre d'absorbància de la proteïna alterat, amb un màxim d'absorbància desplaçat comparat amb la bR silvestre (taula IV. 11). En un principi el desplaçament cap al blau del seu màxim es va interpretar com un canvi en l'entorn del retinal o una major proporció de retinal en la configuració *13-cis*. Les dades de titració mostren però, que a pH neutre hi ha una important proporció de membrana vermella (figura IV.45 i IV.46) que coexisteix amb una proporció majoritària de bR púrpura. La barreja de totes dues espècies dona doncs lloc a un espectre d'absorbància amb el màxim desplaçat lleugerament cap al blau.

Les dades d'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina indiquen una important velocitat de reacció tant en absència com en presència d'il·luminació en el mutant P8W, més fins i tot que en el triple mutant 3PG (figura IV.48). Aquest fet indicaria una major obertura de l'extrem extracel·lular de les hèlices en aquest mutant potser degut a la ruptura d'interaccions inter-hèlices, possiblement a les formades per l'arginina 7 i el glutàmic 9 amb la tirosina 79 entre d'altres, i de la interacció del glutàmic 9 amb les aigües 415, 416 i 417. Aquesta ruptura però sembla no ser suficient com per donar lloc a aquesta obertura tan important, ja que les mutacions 3PG per un costat i R7E/E9R i Y79F presentades a l'apartat anterior no produeixen una descompactació tan important de les hèlices, i sembla que la suma de tots aquests factors no seria suficient per produir una accessibilitat tan pronunciada.

La visualització molecular de la introducció d'un triptòfan a la posició 8 (figura IV.58) dona varies possibilitats de mínima energia. La majoria de les opcions mostren una orientació de la cadena radical del triptòfan cap a l'exterior de la proteïna, de manera que en no allotjar-se en la butxaca, en principi no hauria de pertorbar les interaccions de les aigües. L'orientació cap a l'exterior del triptòfan podria determinar la interacció d'aquest grup amb bR veïnes del mateix trímer o trímer veí. Aquesta interacció podria donar lloc a una gran obertura de l'hèlix A explicant d'aquesta manera la gran accessibilitat de la hidroxilamina.

Aquesta menor compactació de les hèlices al mutant P8W es traduiria en una major entrada de molècules d'aigua al voltant del retinal canviant així tant el pK_a de l'Asp 85 com de la Base de Schiff (taula IV.13 i figura IV.45). Aquest entorn canviat

segurament també determinaria la formació de bR púrpura àcida en absència d'ions clor, segurament permetent la protonació de l'Asp 212 en absència d'ions. La descompactació de les hèlices present en aquest mutant, podria ser per altra banda responsable del canvi d'entorn de l'Asp 96 permetent la seva reprotonació a pH més elevats que a la bR silvestre en el pas d'N → O, tal i com ho mostra la desaparició ràpida d'M^s (taula IV.19).

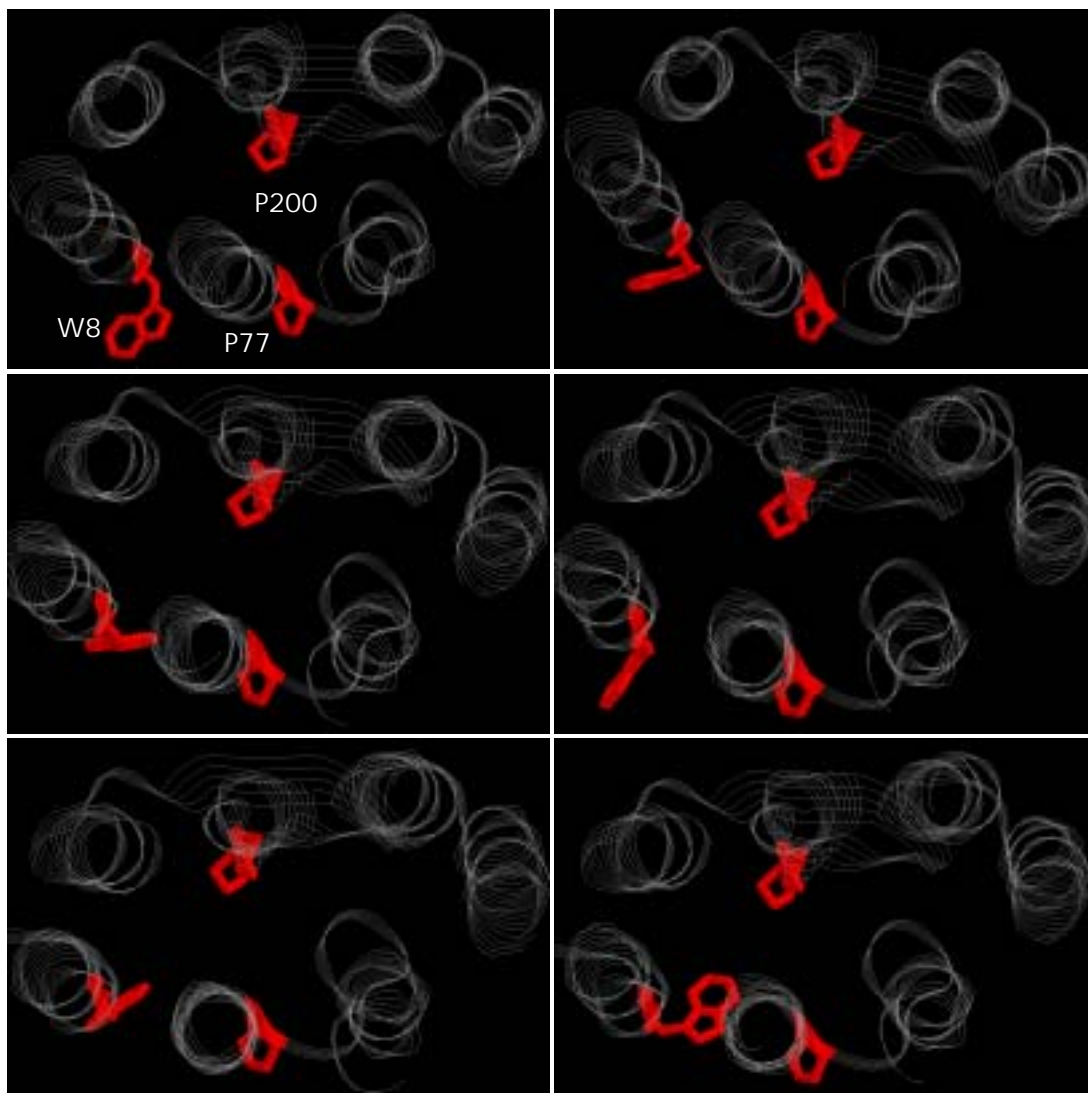


Figura IV.58. Visualització molecular de possibles orientacions del triptòfan 8 en el mutant P8W mitjançant el programa Swis prot PDB Viewer. Aquest programa permet de manera simplificada la introducció i visualització de les mutacions en una conformació de mínima energia. Estructura de Luecke et al. (1999a).

Aquesta major obertura però no sembla tenir un efecte massa important en l'estabilitat tèrmica de la proteïna, però en canvi sembla tenir importància en l'ordenació hexagonal de la membrana púrpura com mostra la quasi absent pre-transició

obtinguda per DSC (figura IV.52). El fet de que aquest mutant presenti un màxim d'absorbància (taula IV.12) i un pK_a de l'Asp 85 (figura IV.43) tan dependent de la força iònica del medi podria indicar una menor afinitat dels cations. Aquests resultats però, són difícils d'interpretar ja que a la bR silvestre el comportament de la proteïna és pràcticament idèntic en 150 mM i 1 M de KCl. El comportament observat en el mutant P8W, dependent de la força iònica del medi, semblaria indicar que hi ha una major proporció de càrregues negatives superficials que a la bR silvestre, i per lo tant seria necessària una major força iònica del medi per apantallar-les. Per que fos aquest el motiu, en el mutant P8W hauria d'incrementar de manera molt important el nombre de càrregues negatives, fet que creiem força improbable. Així doncs, com a possible explicació obtendriem que, mentre a la bR silvestre el major apantallament de les càrregues negatives a molaritats elevades no influenciaria l'entorn del retinal (o influenciaria molt poc), al mutant P8W hi hauria un efecte important. La major obertura de les hèlices detectada en aquest mutant seria responsable d'aquesta influència de la concentració iònica. Segurament el que succeeix en aquest mutant és una barreja de dos factors: per un costat l'apantallament de càrregues superficials afecten l'entorn del retinal molt més que a la bR silvestre, i per altra costat podria haver un efecte sobre els llocs d'unió de cations (Sanz et al., 2001).

Funcionalment, el mutant P8W presenta una normalitat quasi total amb l'excepció d'un lleuger retardament en la desprotonació de la BS a pH bàsic durant M i d'un descens en l'eficiència de bombeig de protons (30 %) comparat amb la bR silvestre. El motiu d'aquesta menor eficiència podria venir donat per la presència d'un entorn del retinal alterat (taula IV.12 i IV.13).

Per al mutant P77G, les dades d'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina mostren que hi ha una velocitat d'hidròlisi del retinal incrementada comparada amb la bR silvestre, encara que no tant com en el cas dels mutants P8W i 3PG (taula IV.15). Aquesta major accessibilitat s'interpreta com una estructura més oberta en la part extracel·lular de les hèlices en aquest mutant, facilitant així l'entrada de la molècula d'hidroxilamina dins de la proteïna. En un principi la prolina 77 no es trobaria interaccionant amb cap molècula d'aigua ni cap grup. Per tant, la seva mutació no hauria de produir la ruptura de cap interacció que es tradueix en una menor compactació de les hèlices. Els grups veïns de la prolina 77 però, sí que es troben formant ponts d'hidrogen, com són la isoleucina 78, entre l'oxigen del seu enllaç peptídic amb el

nitrogen de l'enllaç peptídic de la tirosina 67. Per altra banda l'oxigen de l'enllaç peptídic de l'asparragina 76 es troba formant un pont d'hidrogen amb el nitrogen i l'oxigen de l'enllaç peptídic de la valina 69. Els grups 76 i 78 es troben al bucle més llarg de la bR, el B-C, i es troben propers a l'hèlix C. Els grups 67 i 69 per altra banda es troben al mateix bucle però a l'altre costat, prop de l'hèlix B. La interacció entre aquests grups produeix un apropament entre els dos extrems del bucle dirigint el seu extrem cap als bucles D-E i F-G. Així doncs el paper de la prolina 77 podria consistir en dirigir apropiadament els grups 77 i 79 per que interaccionin amb l'altre extrem del bucle B-C (figura IV.59).

Aquesta doble interacció a més és pràcticament l'única interacció que es produiria entre els dos extrems del bucle. N'hi hauria un altre, encara que a major distància i per tant més feble, que formaria la glicina 65 amb el triptòfan 81 i la tirosina 80. Així doncs la ruptura d'aquestes dues interaccions podria donar lloc a la deslocalització del bucle B-C i l'obertura del forat existent entre les hèlixes D-E i F-G, facilitant així l'entrada de les molècules d'hidroxilamina i per extensió també de les molècules d'aigua al voltant del retinal. Aquest fet podria explicar l'augment del pK_a de l'Asp 85 en aquest mutant i la lleugera precocitat en la desprotonació de la BS.



Figura IV.59. Visualització de la regió extracel·lular on en taronja es troba representat el bucle B-C, en blau la Ile 78, en vermell l'Asn 76, en verd la Thr 67 i en negre la Val 69. Estructura de Luecke et al. (1999a).

Aquesta mutació però també produeix altres efectes com és una menor estabilitat tèrmica de la bR i una ordenació paracristal·lina alterada (figura IV.52 i taula IV.18). Funcionalment ens trobem amb el mateix cas que en el mutant P8W, on tot i tenir una proporció normal d'intermediari M, aquest mutant només té una capacitat de bombejar del 50 %, es a dir, de cada dos molècules que comencen el fotocicle solament una d'elles comporta el bombeig de protons. Aquest resultat concorda amb les dades de fotocorrents (figura IV.55), on s'observa com el pK_a del CAP és d'al voltant de 7,0, de manera que a aquest pH el 50 % de les bR tindrien una CAP desprotonat i per tant no es podrien desprotonar durant el fotocicle perquè ja es troben desprotonades a l'estat basal. En el cas de que el CAP es trobés desprotonat però, semblaria ser que es continuaria produint el bombeig de protons, però l'expulsió del protó es donaria cap al final del fotocicle com succeeix a pH àcids (veure secció I.7.2). Aquesta hipòtesi, però, no es troba del tot demostrada.

A la bR silvestre el bucle B-C es troba orientat prop del bucle F-G, on es troben localitzats els Glu 194 i 204 integrants del CAP, determinant l'entorn correcte per mantenir l'elevat pK_a del CAP. El desplaçament d'aquest bucle al mutant P77G alteraria aquest entorn afectant doncs les característiques de protonació/desprotonació del CAP. A més també produiria una alteració en l'afinitat d'unió de cations tal i com indicaria la quasi absent pre-transició del termograma (figura IV.52) i la petita diferència en el pK_a de l'Asp 85 en aigua i forma desionitzada.

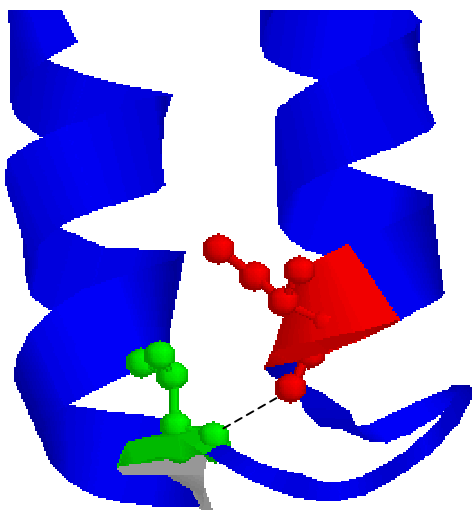


Figura IV.60. Visualització de l'extrem extracel·lular de les hèlices F i G. En vermell es troba representat la isoleucina 191 i en verd la leucina 201. Estructura de Luecke et al. (1999).

La tercera prolina mutada, P200G, té un comportament diferenciat de les altres tres prolines. Aquest grup, a l'igual que les altres tres prolines sembla que no interacciona amb cap molècula d'aigua però interacciona amb el glutàmic 204. La torsió generada per aquesta prolina a més podria determinar la interacció de la leucina 201 amb l'aigua 418 (figura I.20) i el correcte establiment del ponts d'hidrogen entre la isoleucina 191 i la valina 199 (figura IV.60).

L'entorn de l'Asp 85 en mutar la prolina 200 no queda afectat excepte pel cas en que la titració de pH es realitza en aigua, on el pK_a es troba una unitat de pH per sobre del valor obtingut per la bR silvestre (taula IV.13). Aquest fet podria indicar una menor afinitat dels cations a aquest mutant.

L'acceleració de la formació d' M_2 en aquest mutant podria indicar una desprotonació del CAP més ràpida que a la bR silvestre (figura IV.54). Els estudis d'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina indiquen que en produir la mutació P200G no tan sols no augmenta l'accessibilitat sinó que més bé la disminueix, de manera que en aquest mutant el temps de reacció es duplica en condicions d'il·luminació. A les fosques però, el temps de reacció és el mateix que per al cas de la bR silvestre. És doncs durant la realització del fotocicle quan es produeix una menor obertura de les hèlices impedit la introducció de la hidroxilamina dins de la proteïna. La menor obertura de les hèlices també queda reflexada en els canvis més petits observats a l'amida I dels intermediaris M i N obtingut per espectroscòpia d'infraroig (figura IV.56 i 57).

Aquesta menor obertura de les hèlices durant el fotocicle és probable que sigui la causa de la menor eficiència de bombeig de protons (40 %), comparat amb la bR silvestre (veure secció IV.3.3.2). El pK_a del CAP és normal (figura IV.55), de manera que la disminució del bombeig podria venir donat per l'impediment del moviment de les hèlices durant el fotocicle. Però com explicar aquesta dificultat del moviment? En aquest cas la prolina en comptes d'afavorir el tancament de les hèlices, sembla que produeix justament l'efecte contrari. Si la mutació P200G determinés la ruptura de l'enllaç entre la Ile 191 i Val 199 s'hauria d'observar en tot cas una major obertura de les hèlices. Una possible explicació podria ser que la substitució de la prolina 200 per una glicina produís un desplaçament de les hèlices F i G en trencar-se l'interacció 191-199, formant-se interaccions noves que impedirien un moviment correcte de les hèlices durant el fotocicle. Per altra banda, la possible desaparició de l'interacció per ponts

d'hidrogen entre la leucina 201 i l'aigua 418 podria ser responsable de part dels efectes observats en mutar la prolina 200 per una glicina. Una altra explicació dels canvis observats podria ser la ruptura del pont d'hidrogen que manté aquest grup amb el Glu 204.

IV.4. Estudi dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q

IV.4.1. Objectiu de les mutacions

L'Asp 96 i Glu 194 són dos grups que es troben en costats oposats de la bR (figura IV.61). Per tal d'estudiar la possible interacció entre tots dos residus s'han construït els mutants D96N, E194Q i el doble mutant D96N/E194Q (veure secció I.10.3).

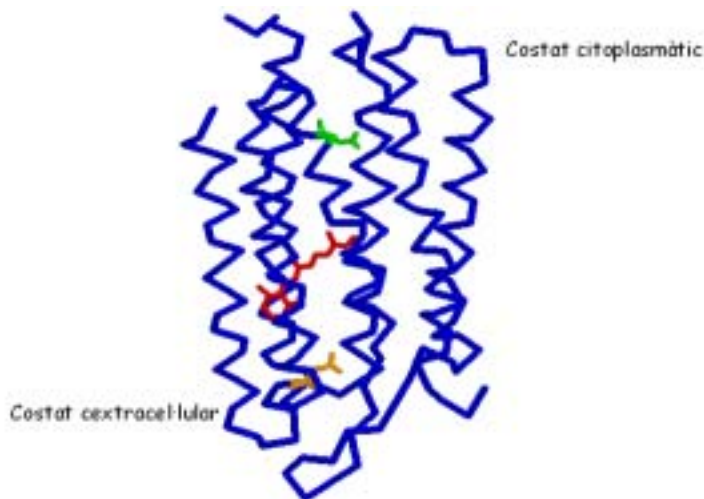


Figura IV.61. Posició de l'Asp 96 (verd) i Glu 194 (taronja) respecte el retinal (vermell) en la bR. Estructura de Luecke et al. (1999a).

L'Asp 96 es troba localitzat al costat citoplasmàtic de l'hèlix C i és el grup que cedeix el protó a la BS perquè es reprotoni en el pas d'M a N (veure secció I.6.2). En l'estat de repòs, l'Asp 96 es troba formant un pont d'hidrogen amb la treonina 46, localitzada a l'hèlix B (figura IV.62). La substitució d'aquest aspàrtic per una asparragina anul·la la capacitat de protonació/desprotonació del grup de manera que ja no pot exercir com a donador del protó a la BS. La interacció amb la treonina 46 però, continuaria existint encara que seria una interacció més feble i en aquest cas es produiria entre el ND2 de l'asparragina i l'OG1 de la tirosina 46. Així doncs introduint la mutació D96N el que s'aconsegueix és anul·lar la capacitat reprotonadora del grup 96 sense produir canvis importants en les interaccions d'aquest grup.

El glutàmic 194 es troba localitzat al costat extracel·lular de l'hèlix F i forma part de l'anomenat complex alliberador del protó, CAP, sent aquest residu molt important en el mecanisme d'expulsió del protó (veure secció I.7). Aquest residu a més es troba interaccionant mitjançant ponts d'hidrogen amb les molècules d'aigua 404 i 405 que junt amb l'establiment de ponts d'hidrogen amb altres grups formen la xarxa

d'aigües i ponts d'hidrogen que connecta la BS amb el CAP. El glutàmic 194 per altra banda es troba formant un doble pont d'hidrogen amb l'arginina 134 que es troba localitzada a l'hèlix E (figura IV.63).

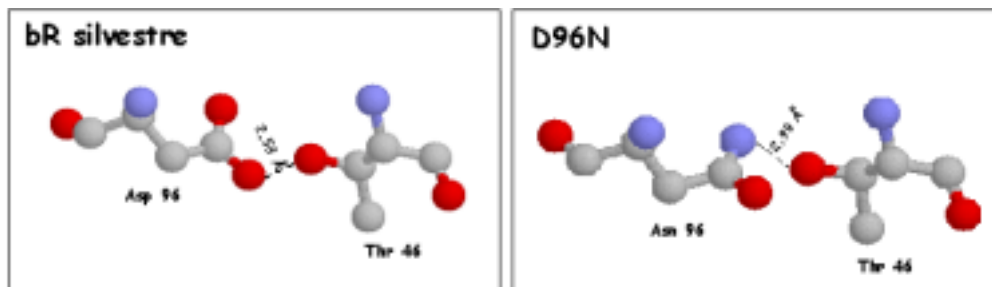


Figura IV.62. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen establerts pel grup 96 en la bR silvestre i en el mutant D96N. En vermell es troben representats els oxígens i en blau els nitrògens. Estructura de Luecke et al. (1999a).

La substitució del glutàmic en la posició 194 per una glutamina (figura IV.63), a més de produir la pèrdua de la seva capacitat de desprotonar-se, també produeix un canvi en les interaccions per ponts d'hidrogen. La interacció amb l'Arg 134 no solament es manté sinó que a més es veu reforçada en produir-se un nou pont d'hidrogen entre l'OE1 de la glutamina i l'NH2 de l'arginina. La interacció entre la glutamina i les aigües 404 i 405 no es trenca però en aquest cas aquestes interaccionarien de manera més feble amb el grup NE2 de la glutamina. La interacció entre l'aigua 404 i la glutamina podria arribar a no donar-se degut a la distància (3,44 Å). Així doncs introduint la mutació E194Q s'aboleix la capacitat de protonar-se del residu 194 sense afectar en principi de manera massa important les interaccions establertes per aquest grup. Suposarem doncs que els canvis estructurals de la proteïna en fer aquesta mutació són mínims.

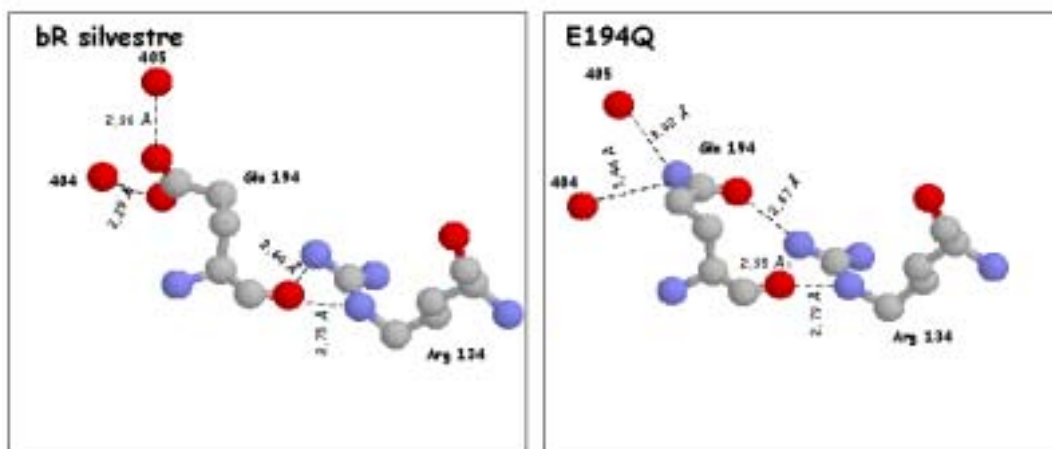


Figura IV.63. Detall de les interaccions per ponts d'hidrogen establerts a partir del grup 194 en la bR silvestre i mutant E194Q. En vermell es troben representats els oxígens i en blau els nitrògens. Estructura de Luecke et al. (1999a).

Així doncs la introducció de la doble mutació D96N/E194Q produeix a l'hora una inhabilitació del grup reprotonador de la BS i del grup alliberador del protó sense produir en principi efectes importants en l'estructura de la proteïna.

IV.4.2. ESTUDI ESTRUCTURAL

IV.4.2.1. Espectre d'absorbància i adaptació llum-fosc

Excepte per al mutant E104Q adaptat a la foscor, els espectres d'absorbància dels mutants estudiats en aquests apartat indiquen un màxim d'absorbància alterat, tant per la forma adaptada a la llum com l'adaptada a la foscor. En el mutant E194Q, la forma LA pateix un petit desplaçament del màxim d'absorbància cap al blau (Sanz 2000); la introducció d'aquesta mutació però, sembla no tenir efecte en el màxim d'absorbància de la forma DA. En el mutant D96N es produeix un desplaçament de l'espectre cap al vermell, tant de la forma DA, com LA (Soppa et al., 1989). Quan s'introdueix simultàniament la mutació E194Q i D96N, es produeix un petit desplaçament de l'espectre de la forma adaptada a la llum cap al blau, i un desplaçament cap al vermell en la forma adaptada a la foscor (taula IV.21).

Taula IV.21. Màxim d'absorbància en nm de mostres de bR en 150 mM KCl pH 7 i temperatura ambient. Els valors marcats amb un asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | Adaptat a la llum | Adaptat a la foscor |
|-------------|-------------------|---------------------|
| bR salvatge | 568 | 558 |
| D96N | 571* | 563* |
| E194Q | 566* | 559 |
| D96N/E194Q | 566* | 562* |

En els mutants on es troba com a mínim la mutació E194Q es produeix no només una diferència en el màxim d'absorbància de la proteïna sinó també un alentiment força important en la cinètica d'adaptació a la foscor (Sanz et al., 2001). Així doncs tant al mutant E194Q com al doble mutant D96N/E194Q el temps d'adaptació a la foscor a 4° C passa de ser d'unes dotze hores a la bR silvestre, a ser de l'ordre d'un mes.

IV.4.2.2. Comportament de la bR front l'acidificació del medi

La determinació del pK_a de la transició púrpura-blau dels mutants mostra que en condicions de 150 mM de KCl hi ha una disminució d'aquest pK_a en tots tres mutants estudiats (figura IV.64). La diferència més important observada és que la corba sigmoïdal obtinguda per als mutants D96N i D96N/E194Q és menys pronunciada que en el cas de la bR silvestre i del mutant E194Q. Aquest fet pot ser segut a una participació diferent de grups ionitzables en la transició púrpura-blau entre les diferents mostres.

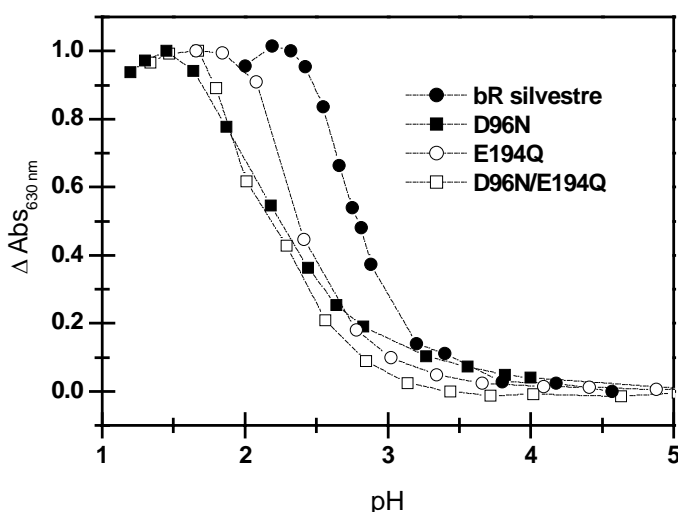


Figura IV.64. Representació dels canvis d'absorbància a 630 nm en funció del pH per a la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q adaptats a la foscor en 150 mM KCl, temperatura ambient. Les dades han estat normalitzades entre 0 i 1.

Els valors del pK_a en diferents condicions de força iònica (taula IV.22) mostren que en totes les condicions estudiades els tres mutants presenten un pK_a per sota de l'obtingut a la bR silvestre. Els tres mutants presenten un valor molt similar en 150 mM de KCl; en aigua i formes desionitzades però, els mutants que tenen la substitució D96N presenten un pK_a lleugerament per sota de l'obtingut en el mutant E194Q.

Així doncs els valors extrets de la taula IV.22 mostren que la substitució del residu 96 per una banda i el 194 (Sanz et al., 2001) per l'altra alteren l'entorn del retinal modificant lleugerament el pK_a de la transició púrpura-blau. Quan els dos aminoàcids es troben mutants simultàniament no s'aprecia cap canvi addicional en l'entorn del retinal, ja que el mutant D96N/E194Q presenta en totes les condicions estudiades un mateix valor de pK_a de l'Asp 85 que el mutant individual D96N.

Taula IV.22. pK_a de la transició púrpura-blau en diferents condicions per la bR silvestre i les bR mutants. S'indiquen amb asterisc aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre. Els valors que no tenen especificat l'error es deu a que aquest és inferior a 0,1.

| Mostra | 150 mM KCl | H ₂ O | Desionitzat |
|--------------|------------|------------------|-------------|
| bR silvestre | 2,7 | 3,2 | 5,5 |
| D96N | 2,2 ± 0,1* | 3,6 ± 0,2* | 4,6 ± 0,1* |
| E194Q | 2,3 ± 0,1* | 3,9 ± 0,1* | 5,2 ± 0,1* |
| D96N/E194Q | 2,2 * | 3,5* | 4,8 ± 0,1* |

El doble mutant però, presenta una característica totalment absent en els mutants individuals D96N, E194Q i en la bR silvestre. A la figura IV.65 es troben representats els espectres d'absorbància i diferència de la titració púrpura-blau del mutant D96N/E194Q desionitzat. Als espectres de diferència es pot apreciar com apareix una espècie absorbint a 437 nm a mesura que es va acidificant el medi. Aquesta espècie solament es detecta al doble mutant quan es troba sota condicions de desionització.

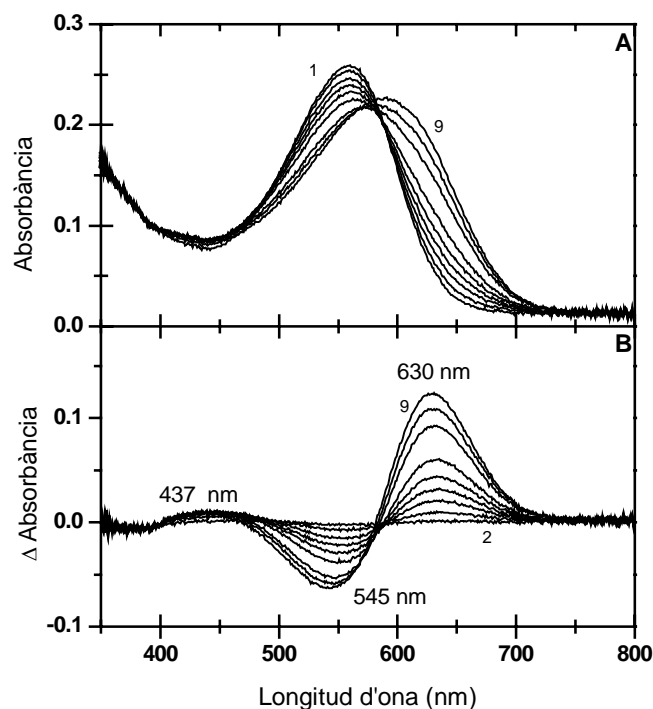


Figura IV.65 (A) Espectre d'absorbància del mutant D96N/E194Q desionitzat i a temperatura ambient a diferents pH, valors de pH_i (de l'1 al 9) 3,6; 4,1; 4,5; 4,8; 5,0; 5,3; 5,5; 5,9; 6,9. (B) Espectres de diferència pH_i menys l'espectre a pH 3,6.

La representació dels canvis d'absorbància a 437 nm en funció del pH dels espectres de la figura IV.65 donen com a resultat una corba sigmoïdal representada a la figura IV.66. El pK_a d'aquesta nova espècie és de 5,7; 0,9 unitats de pH per sobre del pK_a de l'Asp 85 en aquestes mateixes condicions.

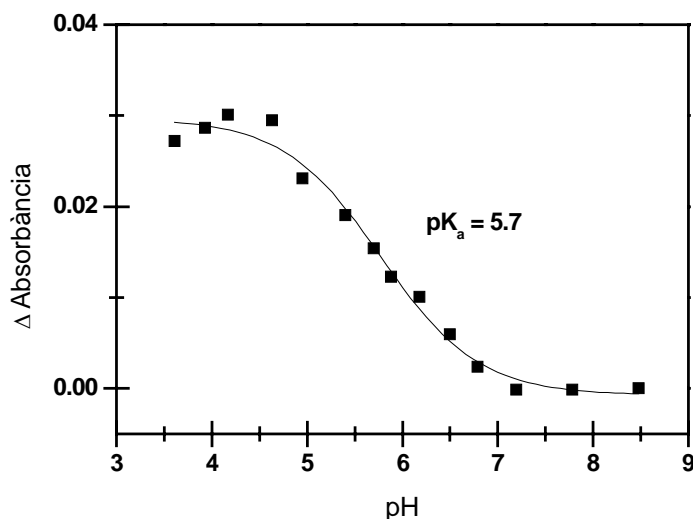


Figura IV.66. Representació de l'increment d'absorbància a 437 nm en funció del pH pel al mutant D96N/E194Q desionitzat. La línia representa l'ajust dels punts a una equació sigmoïdal i el valor de pK_a es correspon amb el punt mig de la transició.

La procedència d'aquesta espècie és un tema no resolt però es consideren dues possibilitats. La primera d'elles explicaria l'increment d'absorbància a 437 nm com a conseqüència de la protonació d'un altre grup diferent de l'aspàrtic 85 quan es disminueix el pH del medi. La segona d'elles explicaria l'origen d'aquesta espècie com deguda a l'aparició d'isòmers del retinal diferents de *tot-trans* i *13-cis* en disminuir el pH del medi. Per exemple, la forma *9-cis* del retinal té un màxim d'absorbància a 440 nm, molt semblant a l'espècie que obtenim, de manera que l'aparició d'aquest isòmer es considera com una possibilitat bastant plausible.

IV.4.2.3. Comportament de la bR front l'alcalinització del medi

Els espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants en alcalinitzar el medi es troben representats en la figura IV.67. Des del punt de vista pràctic, cal indicar que el mutant D96N/E194Q presenta un nivell d'agregació força important, i tot i que els espectres d'absorbància es varen realitzar utilitzant l'esfera integradora (veure secció III.3.3), varen quedar afectats. A primer cop d'ull el que es pot observar es que el mutant D96N presenta una forma addicional en augmentar el pH, una forma absorbent

cap a 410 nm l'origen de la qual es desconeix i que no apareix a cap altre mutant ni a la bR silvestre. El mutant E194Q presenta un petit increment a 580 nm segurament degut a que la mostra no es trobava completament adaptada a la foscor. En aquests mutant a més s'observa una aparició anormal de la forma vermella.

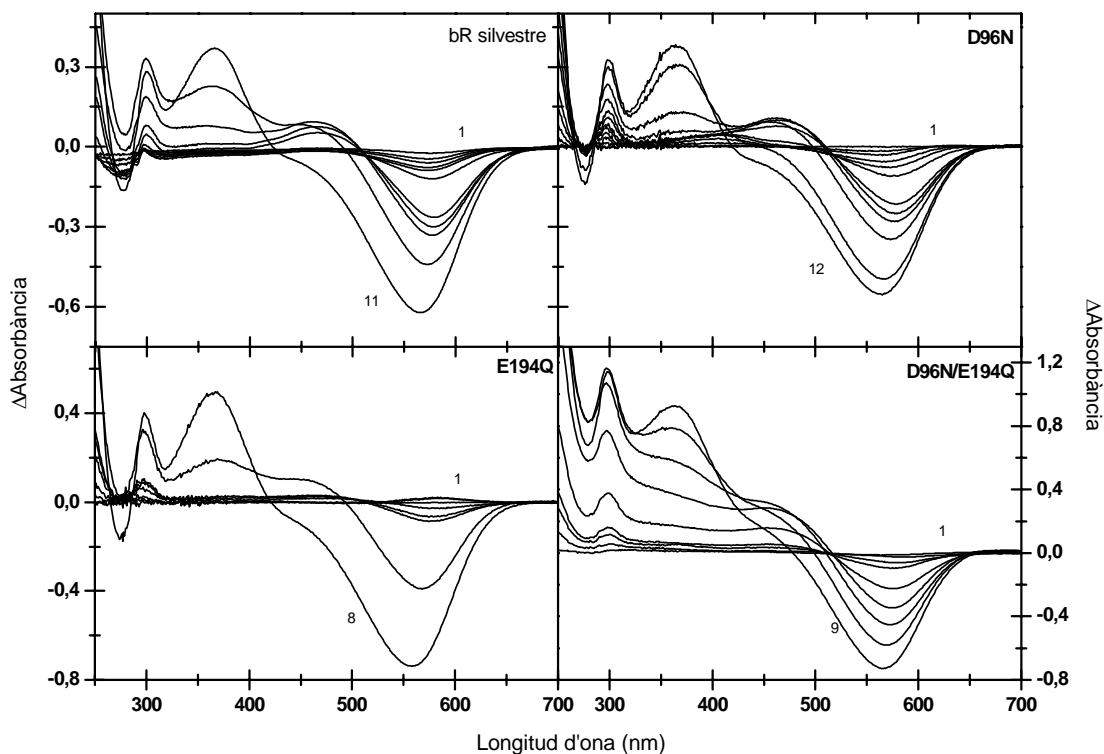


Figura IV.67. Espectres de diferència entre pH_i , indicats a sota, i pH neutre. Els espectres d'absorció es varen obtenir a partir de mostres resuspeses en 150 mM de KCl a temperatura ambient i adaptades a la foscor de la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q. On: bR silvestre (de l'1 al 11): 6,0; 7,7; 9,2; 9,7; 10,5; 11,0; 11,7; 12,1; 12,2; 12,4; 12,7 i 12,8. D96N amb pH_i (de l'1 al 12): 7,3; 9,3; 10,2; 11,0; 11,8; 12,4; 12,7; 13,0; 13,3; 13,5; 13,7 i 14,0. E194Q amb pH_i (de l'1 al 8): 6,9; 10,4; 11,3; 12,6; 12,9; 13,0; 13,4 i 13,6 i el mutant D96N/E194Q amb pH_i (de l'1 al 9): 6,8; 12,4; 12,8; 12,9; 13,1; 13,3; 13,5; 13,6 i 13,8.

En la representació de l'evolució de les diferents espècies en funció del pH (figura IV.68) pot observar-se que en el mutant individual E194Q la forma vermella, sinó que aquesta apareix a partir de pH 13. A pH 10, en el mutant D96N s'observa una pre-aparició de bR vermella (4 %) lleugerament incrementada comparada amb la bR silvestre (1 %) mentre que al doble mutant hi ha un menor percentatge (2 %) que en mutant D96N però major que en E194Q (0%).

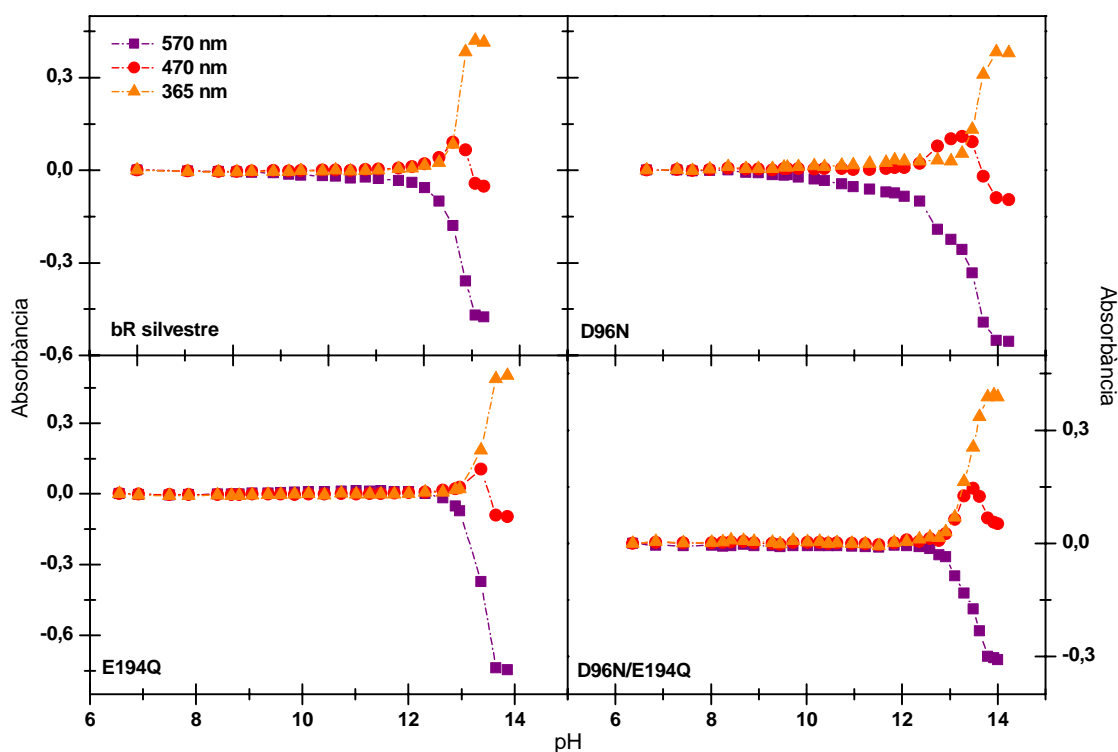


Figura IV.68. Representació del canvi d'absorbància a 570 nm, 470 nm i 365 nm en funció del pH per als mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q adaptats a la foscor, en 150 mM KCl i temperatura ambient. Els valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV.67.

En tot tres casos hi ha un augment en el pK_a de desnaturalització en unes 0,6-0,8 unitats de pH (taula IV.23). Així doncs sembla ser que la mutació d'aquests grups produeix una major estabilitat de la bR front a l'alcalinització del medi.

Taula IV.23. Valors de pK_a de desnaturalització alcalina de la bR silvestre i bR mutants adaptats a la foscor, en 150 mM KCl i temperatura ambient.

| Mostra | pK_a desnaturalització |
|--------------|--------------------------|
| bR silvestre | $12,8 \pm 0,1$ |
| D96N | $13,6 \pm 0,0$ |
| E194Q | $13,4 \pm 0,0$ |
| D96N/E194Q | $13,5 \pm 0,1$ |

En la representació de l'absorbància a 570 nm en funció del pH (figura IV.69) es pot observar més clarament que als mutants E194Q i D96N/E194Q no comença a haver-hi una disminució de l'absorbància a 570 fins un pH al voltant de 13, comparat amb la bR silvestre en la que aquest fet es dona a partir de pH 8 i de manera més

important a partir de pH 12. Així doncs sembla ser que la substitució del glutàmic 194 per una glutamina produeix una estabilitat de la bR en quant a la desprotonació de la BS com de la desnaturalització de la proteïna. En el mutant individual D96N però, tot i començar-se a produir bR vermella quasi al mateix pH que a la bR silvestre, es produeix una gran divergència entre l'aparició d'aquesta forma i la bR desnaturalitzada.

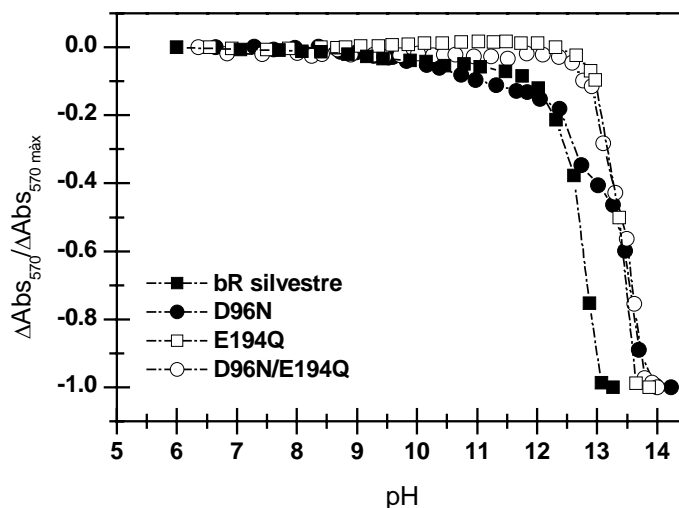


Figura IV.69. Increment d'absorbància a 570 nm en funció del pH per la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q en 150 mM KCl, adaptats a la foscor i temperatura ambient. Aquests valors s'han obtingut a partir dels espectres de diferència de la figura IV.67. Els valors han estat normalitzats entre 0 i -1.

IV.4.2.4. Reacció de la hidroxilamina amb la Base de Schiff

La hidroxilamina reacciona amb la base de Schiff, hidrolitzant-la i produint l'alliberament de la molècula de retinal. Aquest alliberament es pot seguir mitjançant els canvis d'absorbància del retinal. Tal i com es mostra a la figura IV.70 i a la taula IV.24, la mutació E194Q produeix un descens important en el temps de reacció de la hidroxilamina en presència d'il·luminació (Sanz 2000). Així doncs, tot i semblar que les interaccions es mantenen pràcticament intactes en el mutant E194Q, la major distància en els enllaços per pont d'hidrogen podria determinar una major laxitud de les hèlices. La mutació D96N també produeix una disminució del temps de reacció en condicions d'il·luminació, encara que no es gaire diferent de la bR silvestre, indicant que la substitució de l'aspàrtic 96 per una asparagina no produiria un important canvi estructural en la proteïna en termes de relaxació de les hèlices.

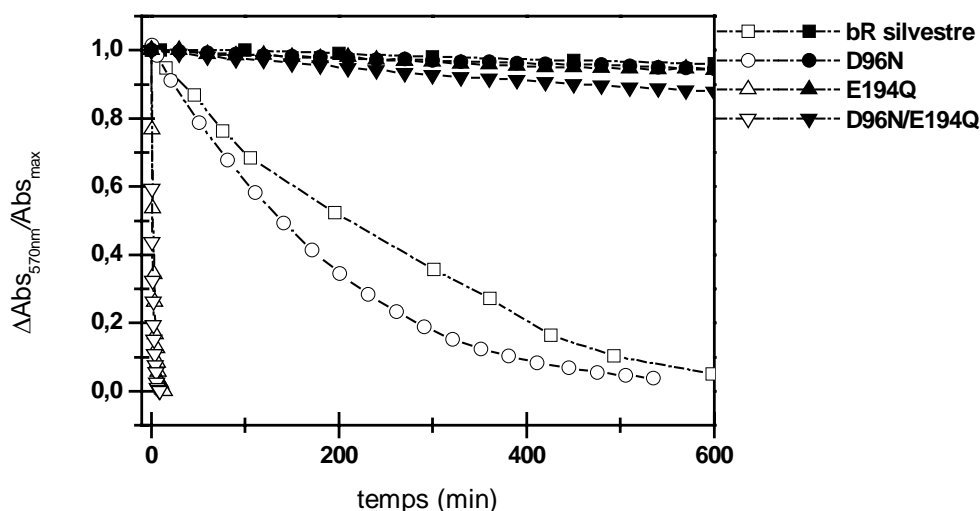


Figura IV.70. Cinètiques de desaparició de la banda a 570 nm en presència d'1 M d'hidroxilamina, 150 mM tampó fosfat, pH 7, 0 i temperatura ambient. Els símbols en negre es corresponen a l'incubació realitzada sota condicions de foscor i els símbols buits de il·luminació a 300 lux. Per a la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q.

Al doble mutant D96N/E194Q en condicions d'il·luminació la velocitat de hidròlisi del retinal és pràcticament la mateixa que per al mutant individual E194Q, de manera que l'addició de la mutació D96N no aportaria cap canvi important. A les fosques però, el doble mutant pateix una hidròlisi del retinal més ràpida que qualsevol dels mutants individuals, sent el valor de la velocitat d'hidròlisi del doble mutant superior a la suma dels valors dels mutants individuals, indicant que la mutació introduïda en un extrem de la proteïna afectaria l'altre extrem.

Taula IV.24. Valors de $t_{1/2}$ per la bR silvestre i els mutants del procés de reacció amb la hidroxilamina sota condicions d'il·luminació i foscor. A partir dels ajustos a exponencials de primer ordre s'han obtingut els valors de τ . El valor de $t_{1/2}$ s'obté multiplicant el valor de la τ per $\ln 2$. Amb asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mutant | $t_{1/2}$ (min) llum | $t_{1/2}$ (min) foscor |
|--------------|----------------------|------------------------|
| bR silvestre | 180 ± 17 | 10540 ± 600 |
| E194Q | $2,3 \pm 0,1^*$ | $7760 \pm 250^*$ |
| 194/96 | $1,9 \pm 0,7^*$ | $3381 \pm 60^*$ |
| D96N | $124 \pm 4^*$ | $8200 \pm 190^*$ |

IV.4.2.5. Estabilitat tèrmica de la bR

IV.4.2.5.1. Espectroscòpia UV-Vis

Els espectres de diferència dels diferents mutants a temperatura creixent en condicions de pH 7,0 i adaptats a la foscor (figura IV.71) mostren que en tots ells es produeixen petits canvis en la proporció de les diferents espècies comparat amb la bR silvestre.

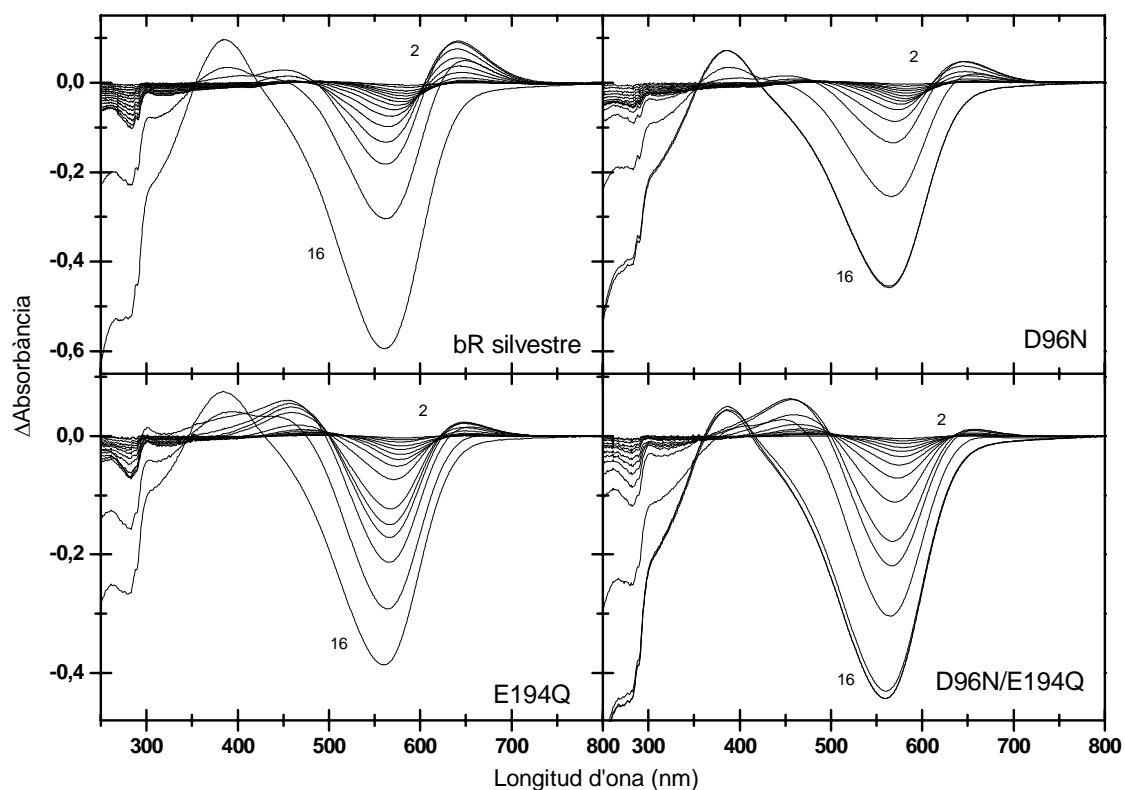


Figura IV.71. Espectres de diferència de la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q en funció de la temperatura. Mostres a pH 7,0; en aigua i adaptades a la foscor. Del 2 al 16 increment de temperatura de 5° C des de 25 a 95° C.

La representació de l'evolució de cadascuna de les espècies en funció de la temperatura (figura IV.72) mostra que a pH 7,0 els mutants que tenen com a mínim la mutació E194Q presenten una menor formació de bR blava comparat amb la bR silvestre (Sanz et al., 2001). Sembla ser que en aquests mutants aquesta disminució vindria com a conseqüència d'una major proporció de formació de bR vermella que comença a aparèixer a temperatures al voltant dels 60° C, 20° C per sota de la bR silvestre.

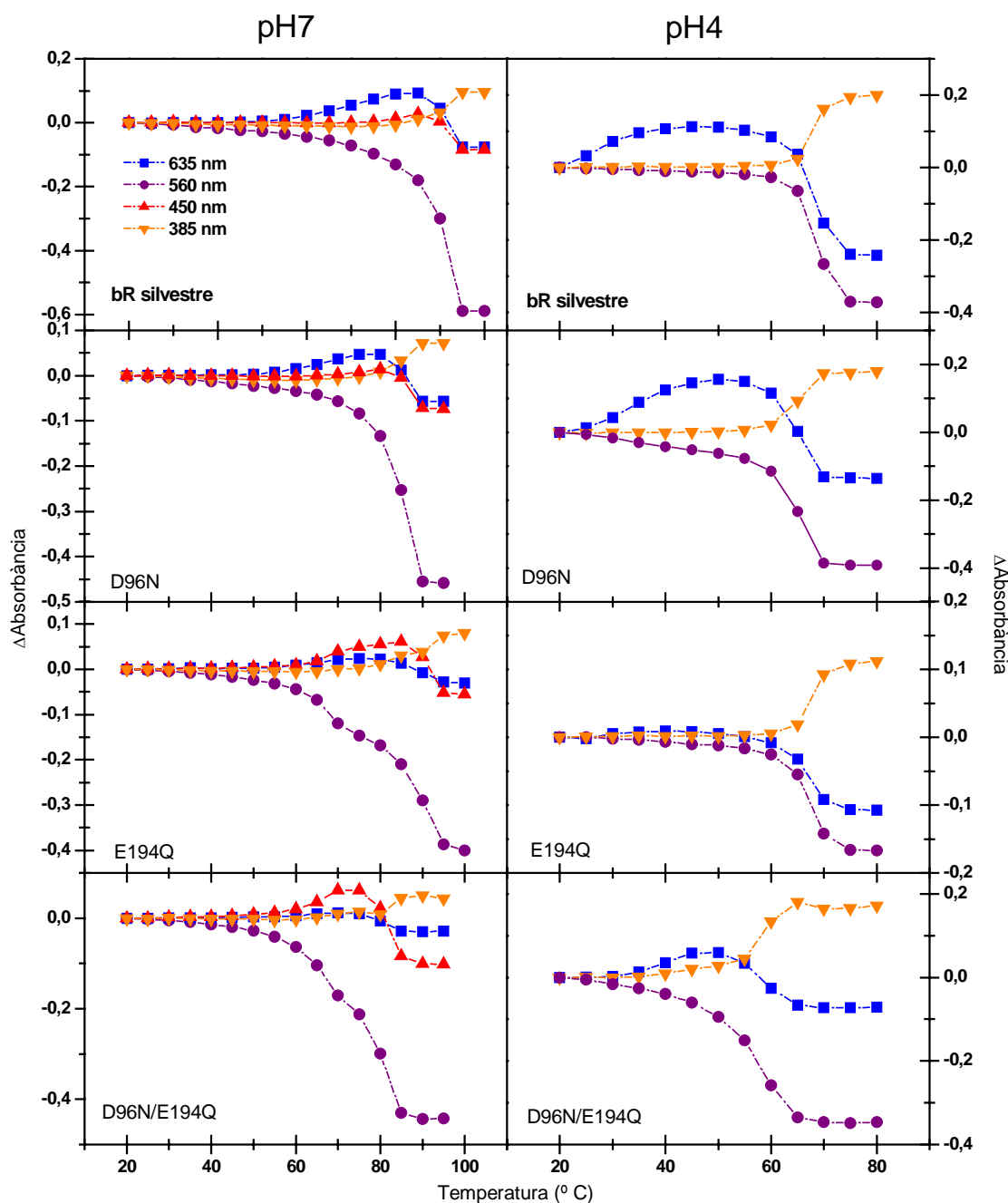


Figura IV.72. Representació de l'absorbància a les longituds d'ona 635, 560, 450 i 385 en funció de la temperatura a la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q adaptats a la foscor a pH 7,0 i 4,0.

A pH 4,0 però, el comportament dels mutants E194Q i D96N/E194Q és diferent. En aquest cas el mutant E194Q pràcticament no produeix forma blava, mentre que el doble mutant presenta una forma blava que comença a aparèixer a temperatures més elevades que a la bR silvestre, segurament degut a l'efecte de la mutació D96N ja que aquest mutant individual presenta encara quantitats de bR blava més importants que la bR silvestre.

La determinació de la temperatura de transició de la desnaturalització de la bR (taula IV.25) mostra una disminució de la T_m tant a pH 7 com a 4 en els mutants D96N i D96N/E194Q, sent aquest últim mutant el que posseeix una menor estabilitat tèrmica.

Taula IV.25. Valors de T_m de desnaturalització de la bR silvestre i mutants en H_2O a pH 7,0 i 4,0. En asterisc es troben indicats aquells valors que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | pH7 | pH4 |
|--------------|------------------|------------------|
| bR silvestre | $90,5 \pm 0,2$ | $68,1 \pm 0,3$ |
| D96N | $85,6 \pm 0,5^*$ | $64,8 \pm 0,2^*$ |
| E194Q | $89,5 \pm 1,4$ | $67,1 \pm 0,9$ |
| D96N/E194Q | $79,7 \pm 2,5^*$ | $58,0 \pm 0,5^*$ |

IV.4.2.5.2. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

L'observació dels termogrames obtinguts per DSC dels diferents mutants (figura IV.73) mostra importants diferències comparat amb la bR silvestre. A primer cop d'ull el que es pot observar és una menor intensitat dels pics acompanyada d'una major amplada, sobretot de la transició principal, degut probablement a una menor cooperativitat en el procés de desnaturalització de la proteïna. Aquesta menor cooperativitat seria el resultat d'una ruptura paulatina de les interaccions inter- i intra-hèlix que participen en l'estabilitat tèrmica de la bR.

Taula IV.26. Valors obtinguts per DSC de les T_m de les transicions tèrmiques que tenen lloc a la bR silvestre i els mutants. En asterisc estan indicats aquells valors que es considera que difereixen de l'obtingut a la bR silvestre.

| Mostra | T_m pre-transició | T_m transició principal |
|--------------|---------------------|---------------------------|
| bR silvestre | $82,3 \pm 0,6$ | $98,8 \pm 1,5$ |
| D96N | $81,4 \pm 0,0$ | $93,6 \pm 0,0^*$ |
| E194Q | $78,4 \pm 0,6^*$ | $99,9 \pm 0,1$ |
| D96N/E194Q | $70,3 \pm 0,6^*$ | $88,2 \pm 0,5^*$ |

La comparació de les T_m per a les dues transicions (taula IV.26) mostra que els mutants D96N i D96N/E194Q presenten una menor estabilitat tèrmica. El mutant

E194Q, tot i presentar un valor de la T_m principal igual que la bR silvestre, mostra una menor cooperativitat i capacitat calorífica aparent, indicant doncs que la mutació E194Q no afecta l'estabilitat tèrmica de la bR (Sanz et al., 2001) però si els processos que donen lloc a la desnaturalització de la proteïna. En canvi, el doble mutant és molt més inestable que el mutant D96N indicant que la substitució del glutàmic 194 per una glutamina produeix una disminució en l'estabilitat de la bR quan al mateix temps també hi ha la mutació D96N. Aquest fet doncs està revelant un efecte a llarga distància entre els residus 96 i 194. També cal remarcar la gran amplada de la transició principal per al doble mutant, amb una forma que sembla indicar la presència de dues transicions solapades.

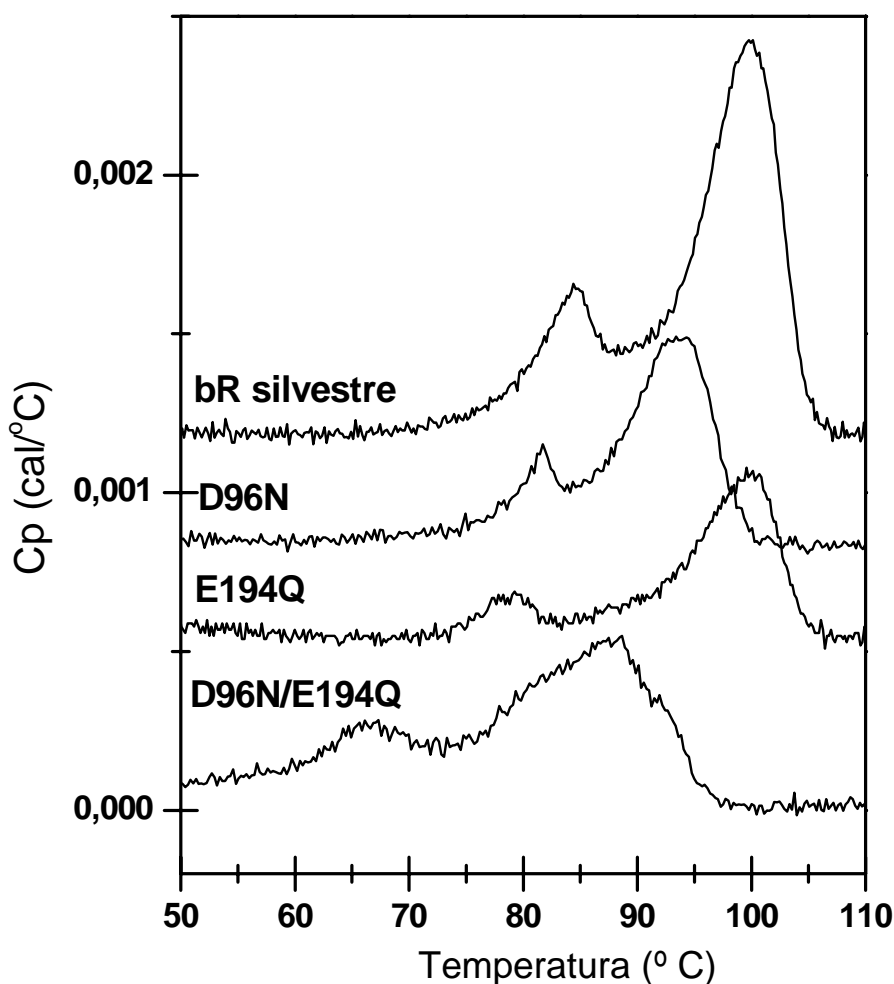


Figura IV.73. termogrames obtinguts per la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q en escalfar les mostres des de la temperatura de 25° C a 110° C i una vegada corregits per a la línia base. La velocitat d'escombrat és de 1,5° K/min. Les mostres es troben dialitzades front H₂O i a un pH de 6,5.

En quant a la pre-transició, els mutants E194Q (San et al., 2001) i sobretot el mutant D96N/E194Q són els que presenten una menor T_m indicant una ordenació paracristal·lina alterada. El fet de que el doble mutant presenti una major inestabilitat de la MP que el mutant E194Q i D96N corrobora de nou la influència a llarga distància entre els residus 96 i 194. En aquest cas sembla ser que és el glutàmic 194 i no l'aspàrtic 96, el que influeix d'una manera més important en l'ordenació paracristal·lina de la MP. En canvi, l'aspàrtic 96 té una influència més important sobre l'estabilitat tèrmica de la proteïna.

IV.4.3. ESTUDI FUNCIONAL

IV.4.3.1. Cinètica de l'intermediari M

L'estudi de la cinètica de l'intermediari M en els diferents mutants mostra que l'aparició d'M és independent del pH als mutants E194Q (Sanz 2000) i D96N/E194Q (figura IV.74). Els valors de la τ dels dos components representats a la taula IV.27 mostren que en aquests dos mutants la τ del component ràpid, obtingut a qualsevol pH, és equivalent a l'obtingut a la bR silvestre a pH 6,5. La τ del component lent, però, és similar a l'obtingut a pH 10 a la bR silvestre. Durant la desaparició d'M₁ i aparició d'M₂ es produeix la desprotonació del CAP a la bR silvestre a pH neutre. El fet de que al mutant E194Q s'acceleri notablement l'acceleració d'M₂ a pH neutre i àcid, indicaria una alteració en el procés d'expulsió del protó pel CAP.

És evident que aquests efectes es produeixen per la substitució del glutàmic 194 per una glutamina i que l'addició de la mutació D96N no afegeix cap efecte en la cinètica d'aparició d'M. La independència del pH d'aquests mutants junt amb el fet de que la τ del component lent es correspongui amb l'obtingut a la bR silvestre a pH alcalí demostra de manera evident que és el Glu 194 el responsable de la dependència del pH en la formació d'M. I de que és l'estat de protonació d'aquest grup el que determina una major o menor velocitat d'aparició de l'intermediari. De manera que a pH 10 a la bR silvestre en trobar-se el Glu 194 desprotonat no pot exercir com a grup alliberador del protó i com que l'alliberació del protó quedaria relegat cap al final del fotocicle, (veure secció I.7.2) un cop protonat l'Asp 85 M₁ desapareixeria de seguida donant lloc a M₂.

En fer la mutació E194Q estariem produint el mateix efecte que en tenir la bR a pH alcalí, ja que en inhabilitat la capacitat desprotonadora del grup 194 l'alliberació del

protó també s'hauria de donar cap al final del fotocicle. Així doncs queda demostrat que és l'estat de protonació del Glu 194 el que determina la ràpida aparició d'M.

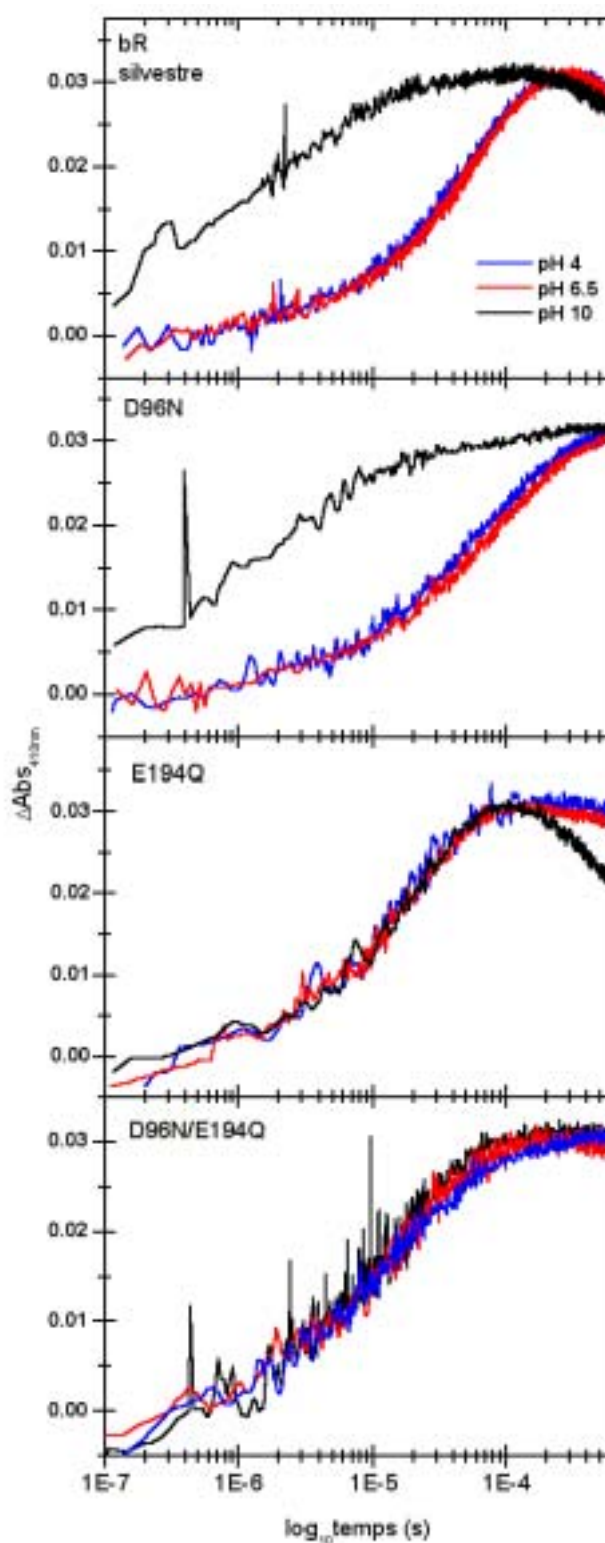


Figura IV.74. Representació del logaritme de la constant de desaparició de l'intermediari M obtingut per fotòlisi de llampec en funció del pH pels mutants D96N, E194Q, D96N/E194Q i bR silvestre en 1 M KCl, temperatura ambient.

La cinètica de formació de l'intermediari M al mutant D96N mostra un important enlentiment del component M_1 i sobre tot M_2 (taula IV.27). En el cas d' M_1 , aquest enlentiment es produeix únicament a pH àcid i neutre. Aquests resultats indicarien un retardament en la desprotonació de la BS segurament degut a un augment en el pK_a de l'Asp 85 durant el fotocicle. El fort enlentiment per altre costat, de la formació d' M_2 en aquest mutant en tot el rang del pH podria indicar dos fenòmens. Bé un retardament en la desprotonació del CAP o bé un impediment en la reorientació de la BS cap al costat citoplasmàtic.

A més del diferent comportament dels mutants respecte a les τ , es pot apreciar també una proporció diferent dels components comparat amb la bR silvestre. Els percentatges de la taula IV.27 mostren que en els mutant E194Q i D96N/E194Q hi ha un increment de la proporció del component ràpid i que aquesta proporció es manté independent del pH.

A diferència de les cinètiques presentades de l'intermediari M dels mutants dels altres dos blocs (Secció IV.2.3.1 i IV.3.3.1), en aquest cas la desaparició de l'intermediari no s'ha representat a la mateixa gràfica que la seva formació. Aquest fet es deu a que les característiques d'il·luminació requerides per prendre les dues cinètiques és diferent. En un principi es va pensar que el temps de desaparició d'M als mutants D96N i D96N/E194Q era independent del pH del medi. Però, resultats obtinguts per altres grups amb el mutant D96N indicava tot el contrari (Butt et al., 1989; Thorgeirsson et al., 1991). A més, quan s'il·luminaven suspensions a pH alcalí d'aquest mutant eren il·luminades s'observava visualment que la mostra esdevenia groguenca, i que un cop deixat d'il·luminar-la no retornava a l'estat púrpura fins passats uns minuts. Aquest fet doncs indicava que sota il·luminació s'estaven acumulant molècules amb intermediari M llarg (màxim d'absorbància a 410 nm). Investigant les causes dels diferents resultats que obteníem al nostre laboratori vam detectar que el feix de llum analitzador de l'aparell de fotòlisi de llampec (veure figura III.13) era massa intens i en incidir sobre l'intermediari M atrapat provocava un retorn a l'estat basal, ja que si l'intermediari M és il·luminat amb llum blava aquest retorna a l'estat BR (Butt et al., 1989).

Taula IV.27. Valors de τ de la cinètica d'aparició de l'intermediari M en 1 M de KCl i temperatura ambient a pH 4,0; 6,0 i 10,0 per a la bR silvestre i mutants. Els valors marcats amb asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre

| Mostra | Formació M (μ s) | | |
|--------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | pH 4,0 | pH 6,5 | pH 10 |
| bR silvestre | 7,3 \pm 1,5 (8 %) | 3,6 \pm 0,7 (10 %) | 2,3 \pm 0,4 (75 %) |
| | 60 \pm 6 (92 %) | 68 \pm 11 (90 %) | 20 \pm 3 (25 %) |
| D96N | 18 \pm 0 (36 %)* | 25 \pm 2 (38 %)* | 2,3 \pm 1,1 (73 %) |
| | 136 \pm 23 (64 %)* | 151 \pm 11 (62 %)* | 86 \pm 17 (27 %)* |
| E194Q | 3,9 \pm 1,0 (25 %)* | 3,9 \pm 0,8 (23 %) | 3,6 \pm 0,6 (19 %) |
| | 26 \pm 8 (75 %)* | 25 \pm 3 (77 %)* | 26 \pm 3 (81 %) |
| D96N/E194Q | 3,2 \pm 0,9 (36 %)* | 3,4 \pm 0,7 (37 %) | 2,9 \pm 1,8 (35 %) |
| | 28 \pm (64 %)* | 26 \pm 1 (63 %)* | 27 \pm 5 (65 %) |

D'acord amb aquest fenomen, es va observar que com més es reduïa la intensitat del feix de llum, la vida mitja d'M en els mutants D96N i D96N/E194Q s'anava incrementant. Així doncs, per tal d'evitar aquest artefacte es va reduir al màxim la intensitat de la llum analitzadora fins a un 0,6 % de la intensitat inicial. Aquest fet produïa però una disminució força important del senyal, i això comportava una manca de fiabilitat en les dades de formació d'M. És per aquest motiu que amb aquesta intensitat de llum només es podien estudiar les cinètiques de desaparició de l'intermediari.

Sota aquestes condicions d'il·luminació es va detectar que la bR silvestre i el mutant E194Q no variaven les seves constants comparat amb intensitats normals de llum. El mutant D96N i D96N/E194Q però van presentar un enlentiment molt important en la desaparició d'M. I no solament això, sinó que a més es va comprovar que aquests dos mutants presentaven una cinètica depenent del pH del medi (figura IV.75).

Les cinètiques realitzades sota aquestes condicions d'il·luminació van mostrar un temps mitjà d'M per al mutant D96N de l'ordre de segons. Aquests valors però segueixen sent incorrectes, ja que tot i que la intensitat lumínica es va disminuir el màxim possible, encara hi havia un efecte de retorn a l'estat basal. En efecte, amb un espectrofotòmetre normal (el qual utilitza un feix encara més dèbil) el seguiment dels canvis d'absorbància al llarg del temps en el mutant D96N un cop il·luminat va mostrar

que la τ de desaparició d'M era en aquest cas de l'ordre de 500 segons (pH 10,0) (figura IV.76).

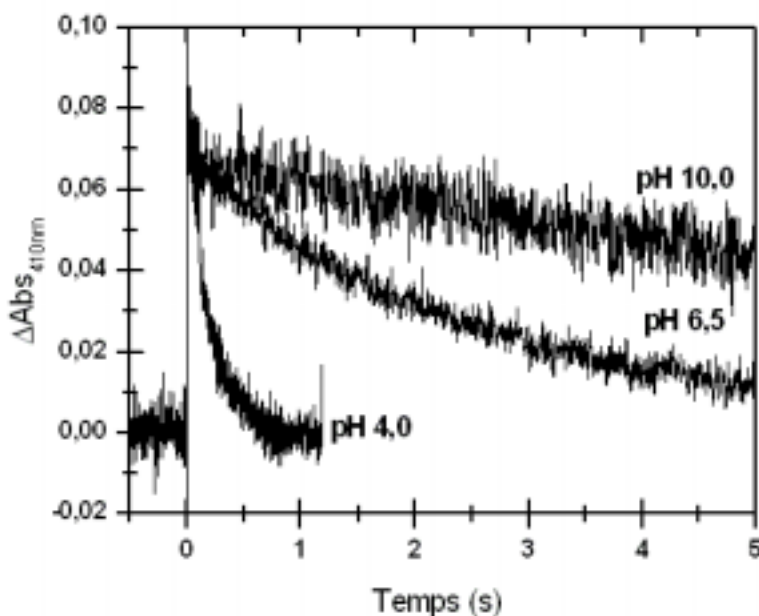


Figura IV.75. Cinètica de l'intermediari M del mutant D96N en 1M de KCl, adaptat a la llum, baixa intensitat de llum i temperatura ambient en les condicions de pH 4,0; 6,5 i 10,0.

Així doncs, prenent els valors de desaparició d'M dels mutant D96N i D96N/E194Q obtinguts a la intensitat de 0,6 %, vam obtenir unes cinètiques amb uns valors de τ (taula IV.28) mostrant que els mutants D96N i D96N/E194Q no solament pateixen un important enlentiment en la desaparició d'M, sinó també una pèrdua de la biexponencialitat, de manera que en aquests casos solament s'obté un component (M^f).

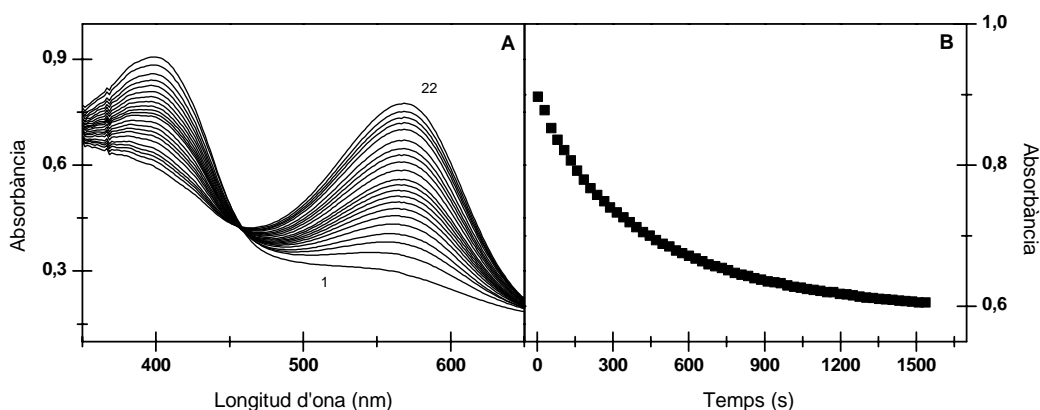


Figura IV.76. (A) Representació de l'espectre d'absorbància des de 350 nm a 650 nm a temps creixent, de l'1 al 22, després d'il·luminar una mostra de D96N, pH 10, 1 M KCl i temperatura ambient. (B) Representació dels canvis d'absorbància a 400 nm en funció del temps de la gràfica A.

Taula IV.28. Valors de τ de la cinètica de desaparició de l'intermediari M en 1 M de KCl i temperatura ambient a pH 4,0; 6,0 i 10,0 per a la bR silvestre i mutants. Els valors marcats amb asterisc són aquells que es considera que difereixen dels obtinguts a la bR silvestre.

| Mostra | Desaparició M (ms) | | |
|--------------|------------------------------------|-------------|-----------|
| | pH 10 | pH 6,5 | pH 4 |
| bR silvestre | 1,9 ± 0,5 (54 %) 67 ± 18 (46 %) | 3,5 ± 0,5 | 5,3 ± 1,6 |
| D96N | 20000 ± 2000 * | 2550 ± 150* | 235 ± 15* |
| E194Q | 1,1 ± 1 (38 %) 22 ± 14 (62 %)* | 11,2 ± 3,4* | 6,4 ± 0,0 |
| D96N/E194Q | 1600 ± 400* | 810 ± 180* | 370* |

La representació del logaritme de la inversa de la constant de desaparició de M^f (en segons), en funció del pH (figura IV.77), mostra que per la bR silvestre presenta una cinètica sensiblement dependent del pH, de manera que quan menor és el pH del medi el temps de desaparició d' M^f és major. Aquest fet es deu a que quan menor és el pH del medi, l'Asp 96 té menys tendència a deprotonar-se i cedir el seu protó a la BS ja que el pK_a d'aquest aspàrtic en M és 8.

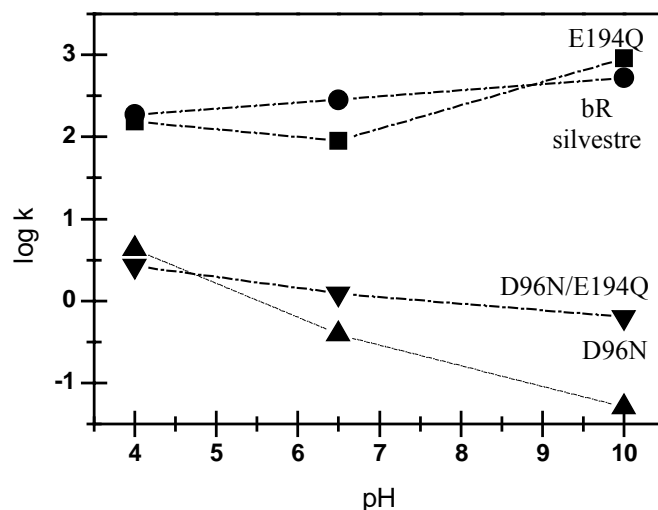


Figura IV.77. Representació del log de k de la desaparició de l'intermediari M^f en funció del pH per a mostres en 1 M KCl i temperatura ambient de la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q. On k és $1/\tau$.

En el cas del mutant E194Q entre pH 6 i 10, en disminuir el pH del medi es produeix un enlentiment en la desaparició d' M^f , a pH 4 però, es produeix una

acceleració en la reprotonació de la BS. Aquest increment en la desaparició d' M^f podria ser degut a que la mutació E194Q produís una disminució en el pK_a de l'Asp 96 afavorint la seva desprotonació a pH àcids. Aquest mutant per altre costat mostra una important acceleració de la caiguda del segon component a pH 10 i un enlentiment a pH 6,5 (figura IV.78 i taula IV.28).

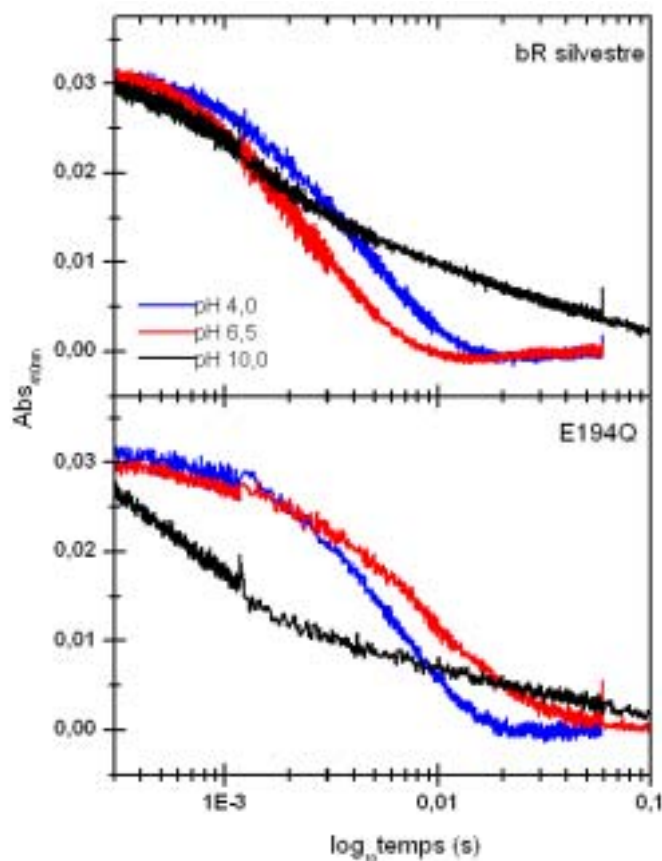


Figura IV.78. Cinètica de desaparició de l'intermediari M, determinada pels canvis d'absorbància a 410 nm en funció del temps, després de ser excitada per un pols de làser de la bR silvestre i el mutant E194Q en 1 M de KCl a pH 4,0; 6,5 i 10,0.

El mutant D96N per altre costat presenta una desaparició d' M fortament dependent del pH de medi (figura IV.77). S'ha de tenir en compte que els valors de la gràfica varen ser obtinguts a la mínima intensitat de llum en fotòlisi de llampec, però les dades obtingudes en l'espectrofotòmetre UV-visible indiquen que $\log k$ és $-2,6$ a pH 10,0. L'important enlentiment de la desaparició d' M a pH 10 en aquest mutant es produeix com a conseqüència de la impossibilitat de la BS de reprotonar-se des de l'Asn 96, i el protó ha de procedir directament del medi extern incrementant-se així el temps necessari per a la reprotonació de la BS (Otto et al., 1989; Tittor et al., 1989). En

disminuir el pH del medi, i per tant en augmentar la concentració de protons al voltant de la proteïna, s'observa com es produeix una disminució del temps de reprotonació de la BS ja que els protons poden accedir més fàcilment cap al voltant de la BS.

Al doble mutant D96N/E194Q cabria esperar un resultat similar que en cas del mutant individual D96N ja que el protó reprotonador de la BS en aquest cas també hauria de provenir directament del medi extern. En aquest cas però, no solament la desaparició d'M es més ràpida que al mutant D96N a pH neutres i bàsics sinó que també la dependència del pH no és tan marcada. Encara que al doble mutant la reprotonació de la BS és més lenta que en la bR silvestre o el mutant E194Q, el fet de que sigui més ràpida que en el mutant D96N indica que la mutació del glutàmic 194 localitzat a l'extrem extracel·lular, influencia de manera important el flux d'entrada de protons des de el medi extern a l'entorn del retinal des del costat citoplasmàtic. A pH àcid però, la velocitat de reprotonació de la BS és més ràpida al mutant D96N que al doble mutant, aquest fet és degut a que en el mutant D96N/E194Q en ser actiu el grup reprotonador de la BS, l'Asp 96, a pH tan àcids es desfavoreix la seva desprotonació, al mutant D96N però, com que el protó accedeix directament des del citoplasma, la reprotonació no depèn de la desprotonació i per tant del pK_a de cap grup.

L'estudi de les intensitats d'absorbància a 410 nm per als diferents mutants i bR silvestre mostra que a pH 6,5 el 55 % de les molècules de proteïna del mutant D96N inicien el fotocicle. En el cas del mutant E194Q aquest percentatge és del 63 %, i del 28 % pel doble mutant D96N/E194Q. Així doncs el doble mutant sembla que pateix un efecte additiu en quant a la disminució de la capacitat d'iniciar el fotocicle.

IV.4.3.2. Bombeig de protons

IV.4.3.2.1. Piranina

L'estudi de la capacitat bombejadora de protons dels diferents mutants mitjançant la molècula piranina ens permet comprovar les característiques del mecanisme de bombeig de les diferents mostres. A la gràfica IV.79 es representen els canvis d'absorbància de la piranina al llarg del temps per la bR silvestre i els mutants E194Q i D96N/E194Q. Els espectres d'aquesta gràfica van ser realitzats amb intensitats de llum del feix analitzador normals.

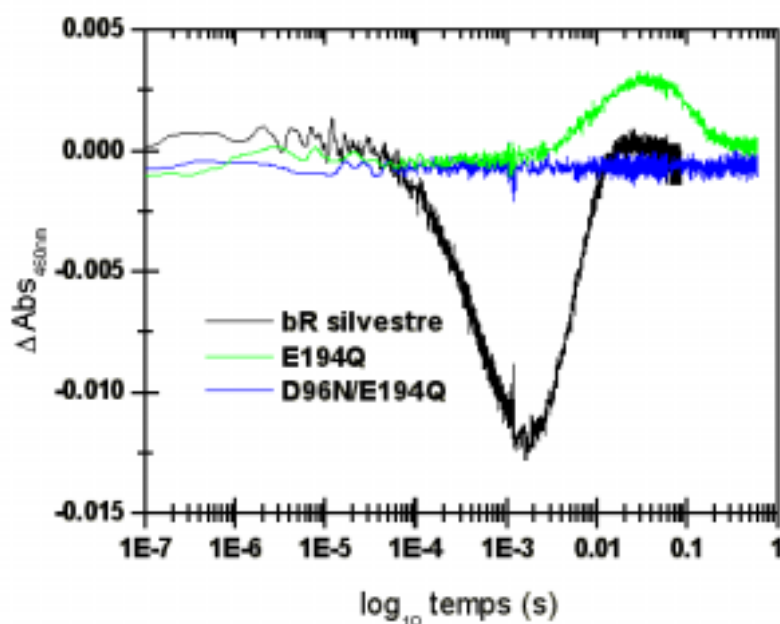


Figura IV.79. Cinètica de bombeig de protons en forma de absorbància a 460 nm de la piranina en funció del temps per a la bR silvestre i els mutants E194Q i D96N/E194Q en 1M de KCl, pH 7, 50 μ M de piranina i temperatura ambient.

El mutant E194Q presenta una inversió en l'ordre d'expulsió i entrada del protó comparat amb la bR silvestre (Balashov et al., 1997; Dioumaev et al., 1998) on es reflexa un comportament d'aquest mutant similar al de la bR silvestre a pH per sota de 5,8. En aquestes condicions de pH es pot observar que primer es produeix una entrada del protó per la part citoplasmàtica i més tard, en el pas d'O a BR, l'expulsió d'un protó pel costat extracel·lular (veure secció I.7.2). A pH àcids el Glu 194 es trobaria contínuament protonat i per lo tant no podria actuar com a CAP. L'anul·lació de la capacitat protonadora/desprotonadora del glutàmic 194 en mutar-lo per una glutamina produeix el mateix efecte (Balashov et al., 1997; Dioumaev et al., 1998; Luecke et al., 1998). La mutació E194Q afecta únicament la cinètica d'expulsió del protó, ja que observant el temps de captació del protó a la bR silvestre i aquest mutant (figura IV.79) s'observa que és mateix.

En el cas del mutant D96N, el temps d'expulsió i captació del protó depèn de la intensitat lumínica del feix analitzador. Així, es va comprovar que a mesura que es disminuïa la seva intensitat, el temps de captació del protó s'anava enlentint en concordància amb l'obtenció d'un intermediari M amb una vida mitja més llarga. Degut a problemes d'obtenció de senyal, el mínim d'intensitat lumínica a la qual es va poder fer l'assaig de piranina va ser al 3 % respecte l'intensitat normal (figura IV.80). Ja a

aquesta intensitat de llum es pot apreciar com hi ha un enlentiment d'uns dos ordres de magnitud del bombeig respecte a la bR silvestre.

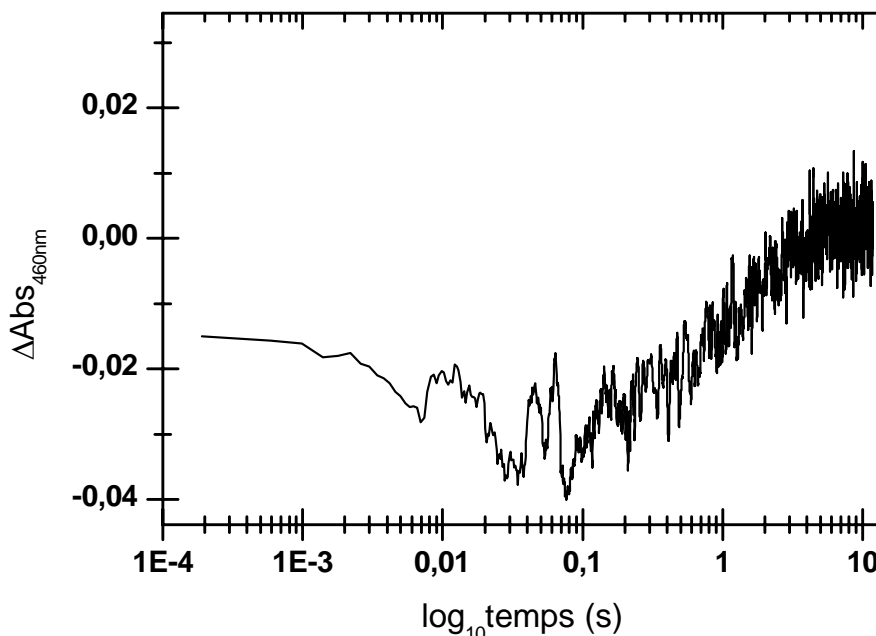


Figura IV.80. Cinètica de bombeig de protons en forma d'absorbància a 460 nm de la piranina en funció del temps, del mutant D96N en 1M de KCl, pH 7, 50 μ M de piranina i temperatura ambient. La intensitat d'il·luminació és d'un 3 % respecte a la intensitat normal.

Les intensitats del senyal donat per la piranina indiquen que el mutant D96N bombeja un 54 % i el mutant E194Q un 61 % comparat amb el 100 % del bombeig de la bR silvestre. En el cas del mutant D96N la captació del protó es realitza durant la caiguda de l'intermediari M en comptes de en N com es produeix a la bR silvestre. Això és degut a que en aquest mutant la reprotonació de la BS s'ha de fer directament des del medi citoplasmàtic.

En el cas del doble mutant D96N/E194Q caldria esperar un comportament similar al mutant E194Q però amb un retardament de la cinètica. La cinètica de bombeig obtinguda, però, mostra una absència total de senyal tant per l'entrada com per la sortida del protó (figura IV.79). A partir d'aquest resultat podem extreure dues deduccions. Una d'elles és que al doble mutant, en inhabilitar-se el grup expulsor del protó i el grup reprotonador de la BS es produeix una incapacitat de la proteïna en bombejar protons. L'altre possibilitat és que l'entrada i la sortida del protó es

realitzessin a l'hora de manera que el canvi de pH net al medi fos zero i no pogués, així, ser detectable per la piranina.

Per tal de determinar quina d'aquestes dues hipòtesis era la correcta vam dissenyar experiments de determinació de bombeig de protons mitjançant la inclusió de bR en liposomes.

IV.4.3.2.2. Incorporació en liposomes

Mitjançant aquesta tècnica és possible determinar de manera directa no tan sols la presència o no d'activitat bombejadora de la bR, sinó també l'eficiència de bombeig entre les diferents mostres. Aquesta tècnica consisteix en incloure els fragments de membrana púrpura en liposomes, de manera que aquests s'orienten majoritàriament amb el costat citoplasmàtic cap al costat extern del liposoma. La il·luminació de la suspensió de liposomes amb bR dona lloc a canvis del pH del medi en produir-se el bombeig de protons des de el medi extern cap al interior del liposoma (veure secció III.7.b).

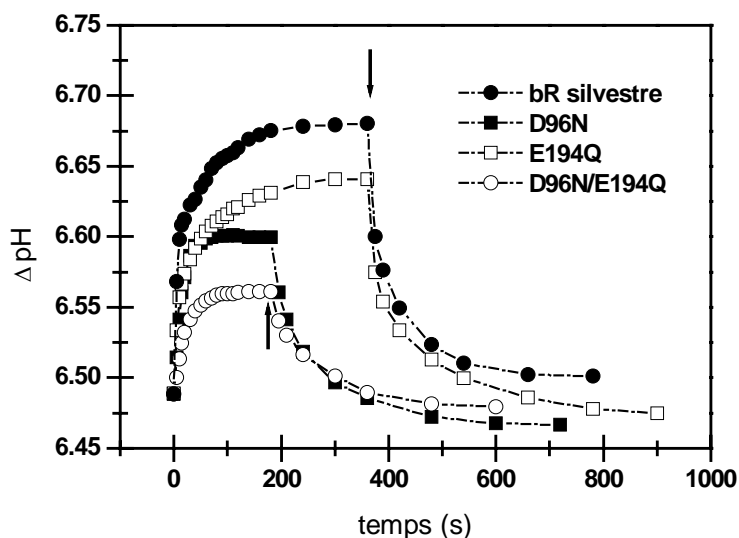


Figura IV.81. Representació del canvi del pH del medi en funció del temps d'il·luminació. Les fletxes indiquen el moment en el que s'atura la il·luminació i es prenen mesures de pH fins que el pH del medi retorna al seu valor inicial. Les mostres de bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q es troben adaptades a la llum en 150 mM KCl, amb pH inicial de 6,5 i temperatura ambient.

A la figura IV.81 es troben representats els canvis de pH del medi en il·luminar suspensions de liposomes amb bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q inclosos. Només començar la il·luminació dels liposomes es pot observar un ràpid

increment del pH del medi com a conseqüència del bombeig de protons des de l'exterior a l'interior de les vesícules. La velocitat d'increment del pH va disminuint al llarg del temps fins que arriba un moment en el qual s'estabilitza el pH del medi com a conseqüència de l'establiment d'un equilibri entre l'entrada de protons per part de la bR i la sortida d'aquests del liposoma per difusió. Un cop establert aquest equilibri, el cessament de la il·luminació dona lloc al retorn del pH del medi al valor inicial abans d'il·luminar.

L'estudi de les cinètiques de bombeig de protons per liposomes dona lloc a dos conceptes, la velocitat inicial de bombeig i la quantitat de bombeig total (veure secció III.7.b) els quals indiquen la capacitat bombejadora de cadascuna de les mostres (taula IV.29). L'ajustament d'una equació lineal sobre els tres primers punts de cada corba dona el valor de la velocitat inicial de bombeig, mentre que la ΔpH màxima, moment de la saturació, és la quantitat de bombeig total produït.

Taula IV.29. Valors en % de la velocitat inicial de bombeig i quantitat de bombeig total per a les mostres de bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q en 150 mM KCl, pH 6,5 i temperatura ambient.

| Mostra | Velocitat inicial de bombeig | Quantitat de bombeig |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| bR silvestre | 100 | 100 |
| D96N | 46 ± 2 | 55 ± 2 |
| E194Q | 63 ± 3 | 75 ± 2 |
| E194Q/D96N | 21 ± 2 | 37 ± 4 |

Tant les dades de velocitat inicial de bombeig com la quantitat de bombeig mostren que el mutant D96N presenta al voltant d'un 50 % menys de capacitat bombejadora que la bR silvestre. El mutant E194Q també presenta una disminució de l'activitat encara que no tan elevat com el doble mutant D96N/E194Q on es demostra que aquest mutant és capaç de bombejar protons però bastant ineficientment.

IV.4.3.3. Fotocorrents

Mitjançant aquesta tècnica és possible obtenir informació sobre el moviment de càrregues elèctriques en la bR. La disposició experimental emprada en aquest treball, proporciona un senyal elèctric fins un temps d'uns 400 μs (Figura IV.32) on es poden distingir diverses fases, tal com s'exposa a la secció IV.2.3.3. L'estudi del senyal

elèctric produït per la bR orientada en ser il·luminada mostra comportaments ben diferents per als diferents mutants estudiats.

La representació de les constants de temps de B2 i M (figura IV.82) mostra primerament que el mutant D96N no solament presenta un CAP amb un pK_a una unitat per sobre del valor obtingut a la bR silvestre, sinó que hi ha una important diferència en les constants obtingudes per fotocorrents i per fotòlisi de llampec. Com ja s'ha comentat a l'apartat IV.2.3.3 hi ha una concordància quasi total entre la constant de formació d'M i de caiguda del component B2 (figura IV.32.bis). En aquest cas però, hi ha una gran diferència entre les dues constants (figura IV.83). El valor de la constant obtinguda per el component B2 en aquest mutant és comparable a l'obtingut a la bR silvestre; és el valor d'M el que es troba més elevat. El fet de que hi hagi un desacoblament entre les dues constants indica que en aquest mutant hi ha esdeveniments durant la formació d'M que no impliquen moviments de càrregues dintre de la proteïna. Així doncs els moviments de càrregues a per exemple pH 7,0 es donen als 60 μ s, però més enllà d'aquest temps es continuaria formant M. Es pot concloure doncs, que la formació de l'intermediari M en aquest mutant té lloc en dos temps, un més ràpid que implica un moviment de càrregues i un altre més lent on no es detecta cap moviment de càrregues.

En el cas del mutant E194Q i el doble mutant D96N/E194Q es pot observar que tant la constant de B2 com d'M són totalment independents del pH del medi. El valor de les constants es mantenen entre 30 i 40 μ s. En aquest cas els valors no són iguals que a la bR silvestre a pH bàsic per una qüestió d'acumulació de diferents components. En el cas de la bR silvestre a pH bàsic (veure taula IV.27), predomina la forma ràpida (M_1), de manera que en forçar l'ajust a una única exponencial el valor de la τ obtinguda és ràpida. En el cas del mutant D96N/E194Q el component majoritari és el component lent (M_2). Així doncs, quan es força l'ajust a una monoexponencial el valor de τ obtingut es proper al valor obtingut per al component lent. Per altra banda, quan no es força l'ajust a una monoexponencial sinó que a una biexponencial, es pot observar que els dos components de la corba dels mutants E194Q i D96N/E194Q en tot el rang del pH, tant per fotocorrents com per fotòlisi de llampec, presenten la mateixa τ que la bR silvestre a pH 10. Aquests resultats indiquen doncs, que és l'estat de protonació del glutàmic 194 el que determina la dependència del pH de les constants de caiguda de B2 i de formació de M tal i com ja van establir Misra et al. (1998).

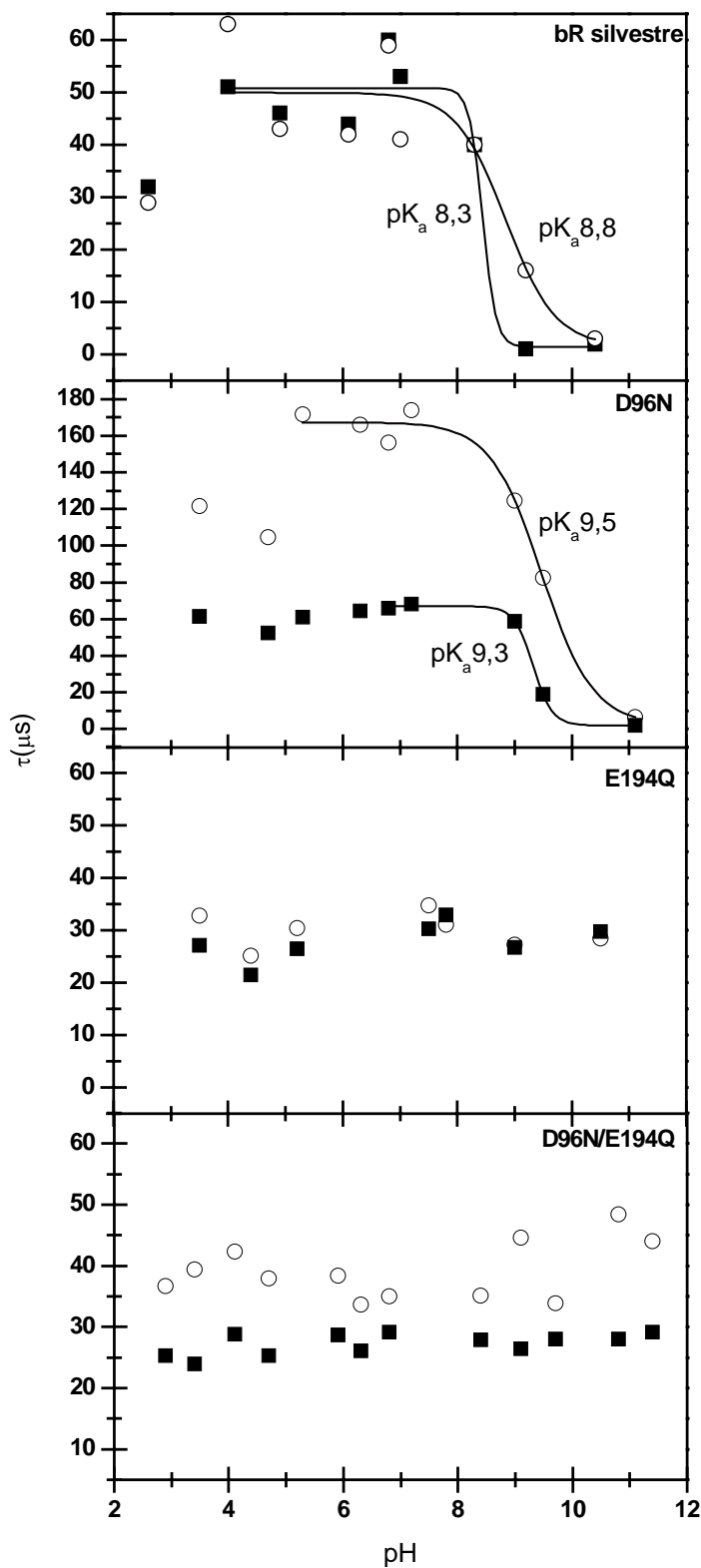


Figura IV.82. Representació de la constant de caiguda del component B2, quadre negre, i la formació d'M, cercle buit, en funció del pH per la bR silvestre i els mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q. En el cas del mutant E194Q es troba resuspès en 50 mM Na_2SO_4 els valors obtinguts però són els mateixos que en condicions de 100 mM de KCl.

Donat que al mutant E194Q desapareix el caràcter sigmoidal de la constant de desaparició de B2, indica que el pK_a obtingut a la bR silvestre prové de l'estat de protonació/desprotonació del glutàmic 194. Sent doncs aquest valor de pK_a el del CAP a l'estat basal de la proteïna (veure secció V). Així a la bR silvestre el pK_a del CAP a l'estat basal en 100 mM de KCl es trobaria al voltant de 8,5 de manera que a pH cada vegada més per sobre d'aquest pH, el CAP estaria ja desprotonat i el component lent aniria sent més minoritari fins que arribaria un punt en que desapareixeria.

Al doble mutant s'observa, a l'igual que al mutant D96N però en menor mesura, un petit desfasament entre les dues constants trobant-se la constant de B2 10 μ s per sobre de la constant d'M.

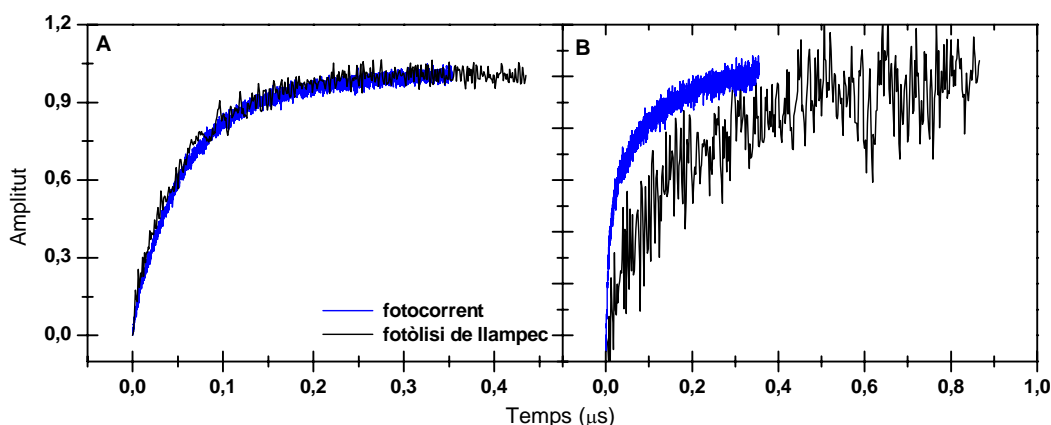


Figura IV.83. Superposició del senyal obtingut per fotòlisi de llampec de l'intermediari M i el component B2 invertit de fotocorrents de la bR silvestre (A) i el mutant D96N (B) en 100 mM KCl i pH 6,8. Els dos espectres han estat normalitzats entre 0 i 1.

IV.4.3.4. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR)

IV.4.3.4.1. Espectres de diferència de l'intermediari M

L'estudi per FTIR de l'intermediari M obtingut sobre films secs a pH 10,0 i -30° C mostra que els mutants E194Q i D96N/E194Q presenten una BS protonada tot i que en aquestes condicions hauria d'obtenir-se l'intermediari M i per tant la BS hauria de trobar-se desprotonada (figura IV.85). En realitat, sota aquestes condicions l'intermediari atrapat a aquests mutants no és purament M, ja que hi ha una certa barreja de L, M i N (Lazarova et al., 2000) (figura IV.30), tal i com indiquen per exemple el pic positiu a 1551 cm^{-1} típic d'L, i el pic negatiu a 1742 cm^{-1} típic d'N.

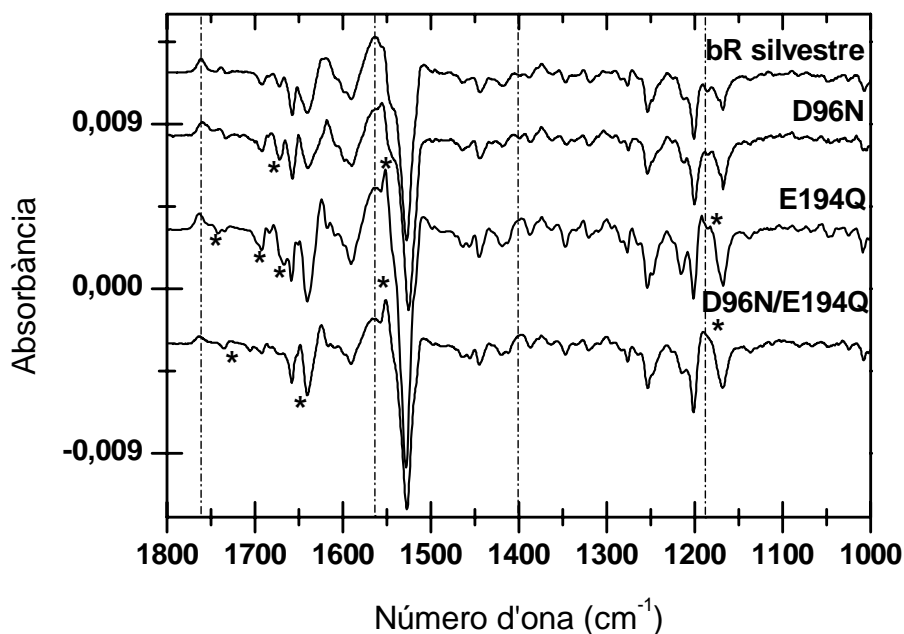


Figura IV.84. Espectre de diferència de la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q obtinguts a partir de film sec de MP a pH 10, 150 mM KCl i -30° C. L'intermediari atrapat és l'M. * canvis per tenir en consideració.

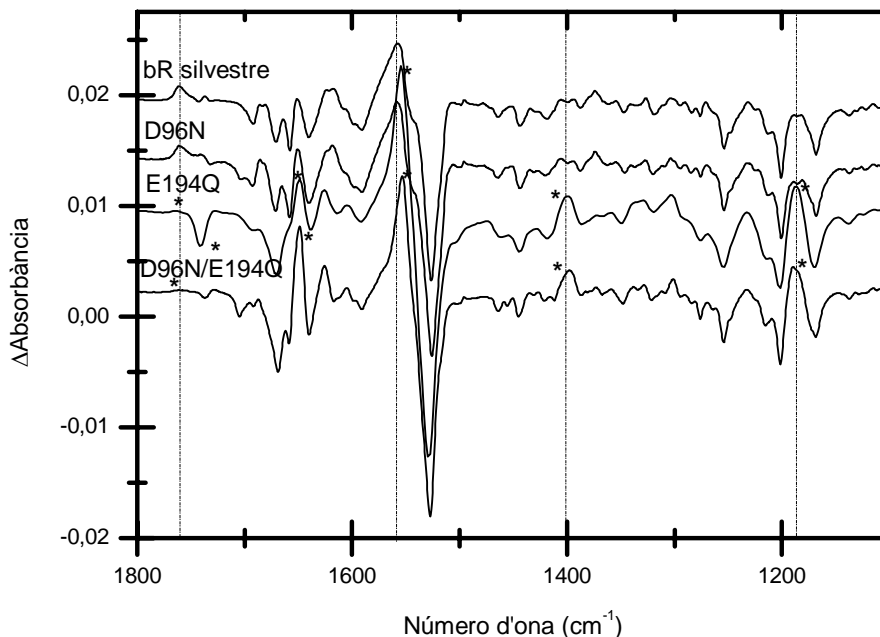


Figura IV.85. Espectre de diferència de la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q obtinguts a partir de film humit de MP a pH 10, 150 mM KCl i -30° C. L'intermediari atrapat és majoritàriament M. * canvis per tenir en consideració.

Sota aquestes condicions de sequedat, l'M atrapat als mutants E194Q i D96N/E194Q té l'aspàrtic 85 protonat, fet normal a l'intermediari M. En condicions

d'humitat, però, ens trobem amb que es produeix una desprotonació de l'Asp 85 (Lazarova et al., 2000; Zscherp et al., 2001) (figura IV.85) i l'M obtingut es troba barrejat amb N (figura IV.79 i taula IV.30).

Taula IV.30. Intermediari atrapat a la bR silvestre i dels diferents mutants en 150 mM de KCl, pH 10,0 en diferents condicions de temperatura i humitat.

| Mostra | 4° C | | -30° C | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|-----|
| | Humit | Sec | Humit | Sec |
| bR silvestre | N | M | MN | M |
| D96N | M _N | M _N | M _N | M |
| E194Q | N | M | M, N | LM |
| D96N/E194Q | N | MN | M, N | LM |

En el cas del doble mutant i sobretot del mutant D96N va ser necessari il·luminar amb llum blava entre mesura i mesura dels espectres per tal de fer retornar les restes d'M a l'estat basal BR (Butt et al., 1989).

IV.4.3.4.2. Espectres de diferència de l'intermediari N

En condicions d'obtenció de l'intermediari N com és a pH 10,0; 4° C i mostra humida (figura IV.86) es pot apreciar que en el mutant D96N no es pot atrapar un N pur. Degut a que en aquest mutant la reprotonació de la BS és molt lenta, el que ens trobem és un intermediari M_N on la proteïna estructuralment es troba en conformació N però amb la BS desprotonada (Kamikubo et al., 1997).

Al doble mutant D96N/E194Q caldria esperar un comportament similar a l'obtingut al mutant D96N, ja que en el doble mutant en trobar-se també inhabilitat el grup reprotonador de la BS aquesta hauria de trobar-se desprotonada. L'N obtingut en aquest mutant però té una BS totalment protonada (figura IV.86). Aquest protó no pot provenir de l'Asn 96, així doncs ha de provenir del medi extern o bé d'un altre grup. En aquest mutant, a l'igual que al mutant E194Q, cal destacar la presència d'un Asp 85 desprotonat quasi en tota la seva totalitat (figura IV.87). Aquest fet es deu a que en fer la mutació E194Q, el CAP no es pot desprotonar durant M i per tant no s'indueix l'increment del pK_a de l'Asp 85 i aquest es desprotona (Lazarova et al., 2000) (veure secció I.7.1).

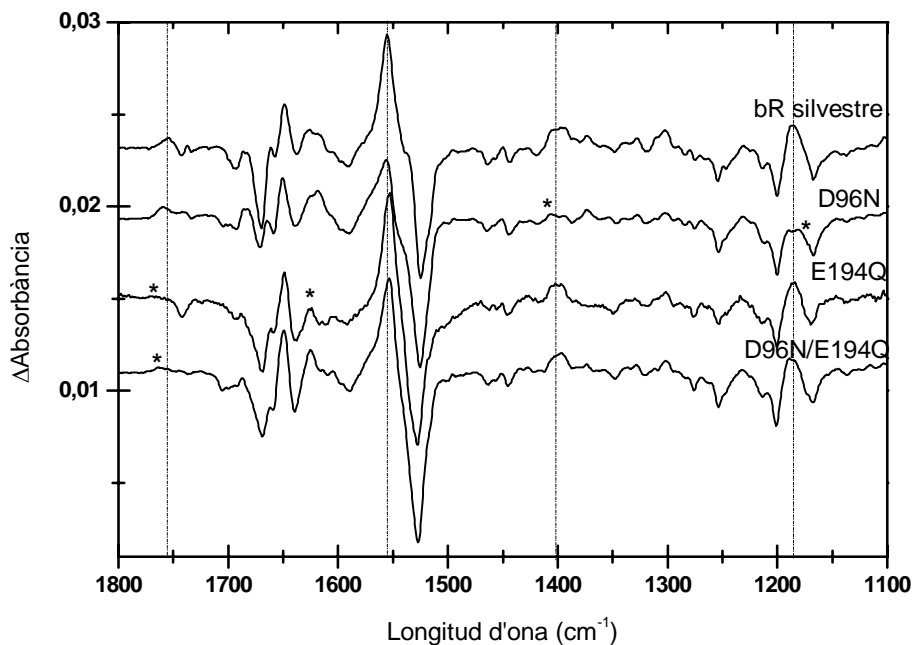


Figura IV.86. Espectre de diferència de la bR silvestre i dels mutants D96N, E194Q i D96N/E194Q obtinguts a partir de film humit de MP a pH 10, 150 mM KCl i 4° C. L'intermediari atrapat és l'N.

* Canvis per tenir en consideració.

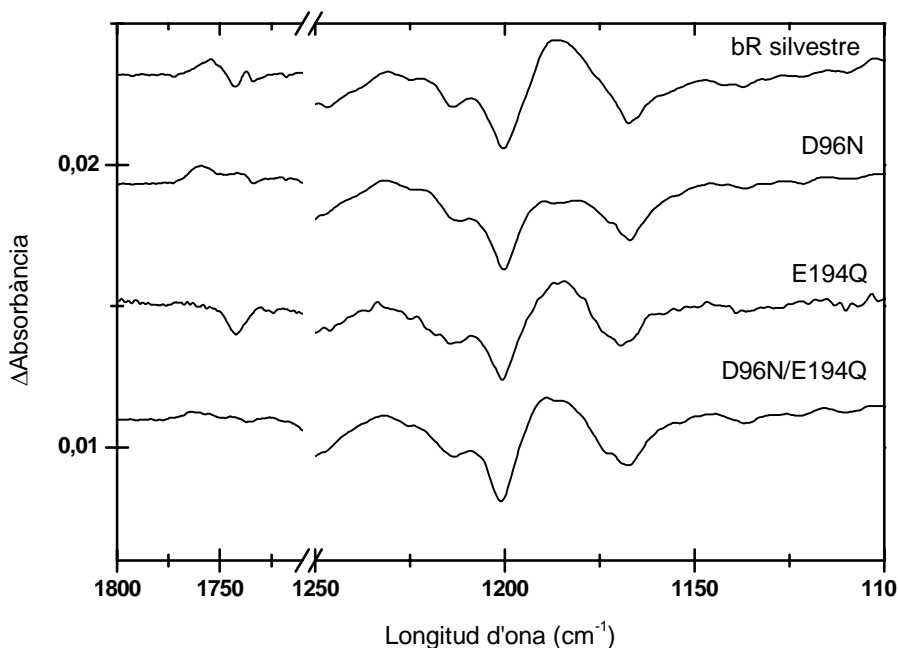


Figura IV.87. Ampliació de la regió dels carboxílics i del retinal de la figura IV.80.

Observant les bandes de la regió dels carboxils i del retinal del mutant E194Q (IV.87) es podria deduir que el protó de l'Asp 96 reprotona normalment la BS tal i com ho mostren la banda negativa a 1742 cm^{-1} provinent de la desprotonació de l'Asp 96 i la banda a 1186 cm^{-1} per sobre de la línia base indicant una BS protonada. Però la banda

positiva absent a 17755 cm^{-1} mostra que l'Asp 85 es troba anormalment desprotonat. El protó de l'Asp 85 podria anar a parar a la xarxa d'aigües o podria protonar un altre grup però també podria passar que el protó de l'Asp 85 retornés a la BS i que el protó de l'Asp 96 s'alliberés a la xarxa d'aigües o a un altre grup.

IV.4.4. Discussió

Les dades obtingudes anteriorment al treball de Lazarova et al (2000) van donar lloc a la idea d'una relació a llarga distància entre les dues regions de la bR, més concretament entre el glutàmic 194 i l'aspàrtic 96 (veure secció I.10.3). Les mutacions D96N i E194Q per separat han sigut àmpliament estudiades encara que no des de tots els punts de vista presentats en aquest treball. Els resultats obtinguts per al doble mutant D96N/E194Q són íntegrament inèdits i actualment es troben en vies de publicació.

Per un costat la substitució de l'Asp 96 per una Asn produeix una incapacitat de reprotonar la BS des d'aquest grup; en ser una mutació conservativa però, l'estructura de la proteïna en principi es manté intacte (figura IV.62). L'estudi de l'accessibilitat de la hidroxilamina mostra que les modificacions estructurals són mínimes en realitzar la substitució de l'Asp per una Asn. No obstant, els resultats obtinguts per aquest mutant mostren algunes diferències en comparació amb la bR silvestre. Per exemple, en estudiar el pK_a de l'Asp 85 en l'estat basal es pot apreciar un petit canvi del màxim d'absorbància de la proteïna. Aquest efecte és d'esperar tenint en compte que el grup carboxilat de l'Asp 96, tot i trobar-se a uns 10 \AA de distància, pot influir en la distribució electrònica del cromòfor a través d'interaccions amb altres grups propers al retinal. En particular, la substitució de l'aspàrtic pel grup asparragina implica una disminució en la capacitat de formació de ponts d'hidrogen que pot contribuir a una menor estabilitat de la proteïna. Els estudis d'estabilitat tèrmica per altre costat, tant per espectroscòpia UV-visible com per DSC mostren una menor estabilitat del mutant front la temperatura.

Estudis de fotòlisi de llampec del mutant D96N mostren una formació de l'intermediari M_1 força enlentida a tot el rang del pH comparat amb la bR silvestre. Aquest fet indica que la substitució de l'aspàrtic retarda la desprotonació de la BS. La desaparició d' M_1 , per altre costat, es veu fortament influenciada pel pH del medi. La mutació D96N impedeix la ràpida protonació de la BS en el pas d' M a N degut a que el protó no pot procedir de l'Asn 96 i per tant ha d'accedir directament des del citoplasma

(Otto et al., 1989; Tittor et al., 1989), fet que retarda molt la reprotonació de la BS produint que la caiguda d'M sigui tan lenta.

Pel que fa al mecanisme de bombeig de protons estudiat mitjançant el pigment piranina, és clar que la captació del protó també es troba molt retardada comparat amb la bR silvestre i que aquesta es dona durant la caiguda de l'intermediari M (figura IV.80). L'estudi de les intensitats del senyal de la piranina mostra que aquest mutant presenta una eficiència de transport de protons del 55 % comparat amb la bR silvestre. Aquesta dada es troba corroborada amb els resultats obtinguts als experiments de bombeig de protons en liposomes (taula IV.29). La menor capacitat bombejadora del mutant D96N indicaria doncs, que només la meitat de les proteïnes són capaces de bombejar. Aquesta conclusió però, és certa en part, ja que és cert que bombeja menys però això és degut a que hi ha un menor nombre de molècules que inicien el fotocicle, un 55 % (veure secció IV.4.3.1). Així doncs l'eficiència de bombeig de protons en aquest mutant és d'un 100 %: totes les molècules que inicien el fotocicle transporten un protó. La ineficiència la trobem doncs en el nombre de proteïnes que són capaces d'iniciar el fotocicle. La mutació D96N d'alguna manera inhibeix la realització del fotocicle de la proteïna en algun punt abans de la formació d'M, ja sigui inhibint la isomerització del retinal des de *tot-trans* a *13-cis* o bé impedit la desprotonació de la BS. Dades obtingudes per altres grups però, mostren una menor eficiència de bombeig de protons d'aquest mutant i un percentatge de formació d'M similar a l'obtingut a la bR silvestre (Marinetti et al., 1989; Otto et al., 1989). Aquestes dades però van ser obtingudes a partir d'un mutant D96N realitzat a *E.coli*, i en molts casos s'ha observat que el comportament dels mutants pot variar depenent de si s'ha expressat a la espècie nativa *H.salinarum* o a *E.coli* com es feia antigament.

L'estudi del moviment de càrregues per fotocorrents mostra per un costat l'augment d'una unitat de pH del pK_a del CAP en aquest mutant comparat amb la bR silvestre, indicant un cop més una influència a llarga distància. Per altre costat el que s'observa és un desacoblament entre les constants de caiguda de B2 i formació d'M, indicant que en aquest mutant durant la formació d'M es produeixen aconteixements que no impliquen el moviment de càrregues dintre de la proteïna.

L'acumulació de l'intermediari M_N corrobora les dades obtingudes amb anterioritat (Kamikubo et al., 1997) on l'anul·lació del grup reprotonador de la BS produeix un enlentiment de la seva reprotonació acumulant-se per FTIR un intermediari

N-like on estructuralment la proteïna té una conformació i entorn del retinal típic de l'intermediari N, però la BS es troba desprotonada, característic d'M.

En substituir el glutàmic 194 per una glutamina estem impedit la desprotonació d'aquest grup i per tant estem evitant que pugui actuar com a CAP (Dioumaev et al., 1998). Les interaccions per pont d'hidrogen però, continuarien sent similars, encara que hi participarien diferents àtoms de la glutamina (figura IV.63) i la distància dels enllaços seria major en el mutant.

L'estudi d'aquest mutant mostra que hi ha una influència d'aquesta mutació sobre l'entorn del retinal tal i com ho mostra el petit canvi en el màxim d'absorbància de la forma LA (taula IV.21), l'enlentiment de la cinètica de adaptació a la foscor en més de 60 vegades (Sanz et al., 2001), o el pK_a de l'Asp 85 alterat en l'estat basal de la proteïna (taula IV.22).

Tot i que en el mutant E194Q les interaccions es mantenen pràcticament intactes, sembla que no són suficients com per conservar una compactació normal de les hèlices ja que l'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina a les fosques es veu incrementada en aquest mutant i sobretot en presència d'il·luminació (Sanz 2000) (taula IV.24). Aquesta flexibilitat de les hèlices però no es tradueix en una menor estabilitat tèrmica de la proteïna tal i com ho indiquen els estudis d'estabilitat tèrmica per espectroscòpia i DSC (Sanz et al., 2001) (taula IV.25 i IV.26). En canvi, la xarxa paracristal·lina es troba afectada tal i com ho indica una pre-transició menys cooperativa i el fet de que aparegui a una temperatura menor.

Funcionalment, el mutant E194Q mostra unes alteracions importants tant del fotocicle com del mecanisme de bombeig de protons. El fet de que la cinètica de formació de l'intermediari M sigui independent del pH (Sanz 2000) i de que la constant obtinguda sigui la mateixa que per al cas de la bR silvestre a pH 10 (taula IV.27) mostra que la dependència del pH de la formació d'M a la bR silvestre depèn de l'estat de protonació del glutàmic 194. Tant si el Glu 194 es troba desprotonat com mutat, l'Asp 85 probablement pateix un augment en el seu pK_a reprotonant-se abans. Les dades obtingudes per fotocorrents corroboren aquesta idea ja que no solament no s'obté cap pK_a del CAP, sinó que els valors obtinguts són els mateixos independentment del pH. Així doncs queda demostrat que quan el glutàmic 194 es desprotona (pH igual ó

superior a 10) o es muta, es produeix una aparició d'M molt més ràpida que per la bR silvestre a pH neutres o àcids.

La desaparició d'M per altre costat (o sigui, la reprotonació de la base de Schiff) mostra una dependència del pH, de manera que a pH 10 E194Q presenta una desaparició d'M^s més ràpida que a la bR silvestre, i a pH neutre o àcid mostra una desaparició de l'intermediari M₂ més lenta que a la bR silvestre. La més ràpida desaparició d'M^s a pH neutre en aquest mutant, podria indicar una alteració de l'equilibri N \leftrightarrow O. Així doncs, en realitzar la mutació E194Q es podria estar afectant la reprotonació de l'Asp 96 potser accelerant-la. El fet de que la desaparició d'M₂ sigui més lenta a pH neutre indica un enlentiment en la reprotonació de la BS des de l'Asp 96. Així doncs, la mutació E194Q per un costat produiria un retardament en la reprotonació de la BS i per altre costat facilitaria l'entrada del protó des del citoplasma per reprotonar l'Asp 96.

En el mutant E194Q, el mecanisme de bombeig de protons estudiat per piranina està profundament alterat (Balashov et al., 1997; Dioumaev et al., 1998). En trobar-se mutat el Glu 194 aquest no es pot desprotonar en M₁ i per tant no es pot alliberar el protó al medi extracel·lular. Sota aquestes condicions el protó s'allibera en el pas d'O a BR directament des de l'Asp 85 possiblement via l'Asp 212 (Dioumaev et al., 1999; Zscherp et al., 2001) (veure secció I.7.2). La funció bombejadora del mutant no solament presenta una inversió del mecanisme sinó que a més hi ha una disminució en l'eficiència de bombeig, sent d'un 65 % comparat amb la bR silvestre. Com en el cas del mutant D96N, aquesta reducció en el bombeig es deu a una menor capacitat del mutant en iniciar el fotocicle. Així doncs la substitució del glutàmic només permet que el 63 % de les molècules iniciïn el fotocicle.

Els intermediaris atrapats mitjançant FTIR (taula IV.30) mostren que el mutant E194Q no tendeix a acumular l'intermediari M, obtenint-se quasi sempre barreges d'aquest intermediari amb diverses proporcions d'L i N (Lazarova et al., 2000). Aquest efecte és esperable tenint en compte que el temps de vida mitja d'aquest intermediari és menor a pH 10 que a la bR silvestre (taula IV.27 i IV.28). Aquest mutant a més presenta una protonació de l'Asp 85 en M i N bastant inestable. L'estudi de la dependència de la protonació de l'Asp 85 en funció del pH mostra que el seu pK_a en el mutant E194Q és de 7,6 quan en el medi hi ha presència d'ions clor, ja que en llur absència el comportament de protonació de l'Asp 85 esdevé normal (Lazarova et al., 2002). En la

bR silvestre, la protonació de l'Asp 85 des de la BS es produeix gràcies a que l'aspàrtic 85 incrementa el seu pK_a des de 2,7 a 8. Aquest fet indueix la desprotonació del CAP i un segon increment del seu pK_a al voltant de 10 (Sasaki et al., 1994; Balashov et al., 2000). En el mutant E194Q en no produir-se la desprotonació del CAP aquest segon increment del pK_a de l'Asp 85 no tindria lloc, de manera que a pH per sobre de 8 ens trobaríem amb una Asp 85 desprotonat, i és de fet el que ens trobem als espectres obtinguts a pH 10 (figura IV.84 i IV.85). Aquest fet doncs demostra que hi ha una important comunicació entre el CAP i l'Asp 85 segurament via la xarxa d'aigües. Com es pot observar a la figura IV.63, a la bR silvestre el grup carboxil del glutàmic 194 es troba formant un pont d'hidrogen amb les aigües 404 i 405 que a l'hora formen altres interaccions amb altres grups que s'acaben comunicant amb l'Asp 85. La desprotonació del glutàmic 194 deu alterar la seva interacció amb aquestes aigües i el senyal es transmetria cap a l'Asp 85 provocant l'increment en el seu pK_a . Al mutant E194Q la interacció de les aigües 404 i 405 continua existint però en aquest cas amb el grup amida de la glutamina. Com que no es pot produir la desprotonació d'aquest grup, la interacció amb les aigües 404 i 405 es mantindria intacta de manera que no es formaria cap cascada que portés la informació a l'Asp 85 i així doncs no es podria donar el segon increment en el seu pK_a .

Però, si durant M en presència d'humitat i en N, l'Asp 85 es troba desprotonat (figura IV.85 i IV.86), a on va a parar aquest protó? Lazarova et al (2000) proposen que aquest protó s'alliberaria a la xarxa de ponts d'hidrogen. Una altra possibilitat seria que retornés a la BS (Sanz 2000) i el protó de l'Asp 96 podria alliberar-se a la xarxa d'aigües.

L'estudi del doble mutant D96N/E194Q i la seva comparació amb la bR silvestre i amb els mutants individuals D96N i E194Q, ha mostrat alguns resultats esperables i altres molt reveladors. Per un costat la lleugera alteració de l'entorn del retinal era esperable tenint en compte que les mutacions individuals ja ho produeixen. En aquest sentit, l'enlentiment de la cinètica d'adaptació a la foscor és comparable a l'observat al mutant individual E194Q.

L'alteració del retinal queda també reflexat en aquest cas en un pK_a de l'Asp 85 alterat en l'estat basal. El pK_a de la forma desionitzada, però, posseeix una característica no present en cap dels dos mutants individuals. Sota aquests condicions apareix una

forma vermella absorbent a 437 nm d'origen desconegut, amb un pK_a una unitat de pH per sobre del pK_a de l'Asp 85 (figura IV.65 i IV.66) i que podria provenir de l'aparició d'isòmers del retinal en conformació 9-cis.

Aquest mutant, com els dos anteriors, presenta una major estabilitat de la proteïna front pH elevats degut segurament a un petit increment en el pK_a de la BS, ja que en aquest mutant, com en el cas de l'E194Q la forma vermella apareix a pH més elevats que a la bR silvestre. Així doncs la substitució del glutàmic 194 per una glutamina ja comporta una alteració en la xarxa de ponts d'hidrogen a l'estat basal. L'increment en la distància dels ponts d'hidrogen entre les aigües 404 i 405 amb el grup 194 sembla ser important en la comunicació del CAP amb el retinal.

L'accessibilitat del retinal per la hidroxilamina al doble mutant es troba més accentuat que als mutants individuals. Aquest efecte és lògic tenint en compte que es sumen els efectes de les dues mutacions. La major laxitud de les hèlices en aquest mutant es tradueix en una menor estabilitat tèrmica de la proteïna i una ordenació alterada de la membrana púrpura.

El doble mutant, en posseir la mutació E194Q, també presenta una formació de l'intermediari M independent del pH i amb una constant similar a l'obtinguda al mutant individual. La desaparició d'M és més lenta que a la bR silvestre i al mutant E194Q, però més ràpida que al mutant D96N. Aquest resultat indicaria doncs que la introducció de la mutació E194Q accelera la reprotonació de la BS. Aquest efecte podria produir-se via una efecte a llarga distància on en mutar el glutàmic 194 s'accelerés l'entrada del protó des del citoplasma, o bé que influencés l'entorn d'algun grup proper al retinal actuant inusualment com a grup reprotonador de la BS. En el cas de que alguna d'aquestes opcions fos la correcta, ens podem preguntar si al mutant individual E194Q hauríem d'observar el mateix efecte d'acceleració de la desaparició d'M. De fet, en aquest mutant s'observa una acceleració en la desaparició d'M^s a pH bàsic podent indicar una facilitació en l'entrada del protó des del citoplasma. En el doble mutant aquesta acceleració s'observa en tot el rang de pH.

Com era d'esperar, al doble mutant, com en el mutant E194Q, s'aboleix la dependència de la desaparició de B2 i formació d'M del pH del medi (figura IV.82). Així doncs, quan el Glu 194 es troba substituït per una glutamina el procés de desprotonació de la BS durant M esdevé totalment independent del pH del medi.

L'estudi de l'activitat bombejadora de protons del doble mutant mitjançant piranina mostra una absència absoluta de senyal (figura IV.79), la qual cosa podria ser interpretada com una absència d'activitat bombejadora de protons en aquest mutant, o bé que l'expulsió i recaptació del protó es realitzés simultàniament. En aquest cas, en ser el canvi de pH net del medi zero, la piranina no canvia el seu estat de protonació, i per tant tampoc hi ha canvis en el seu espectre d'absorbància. La determinació del bombeig de protons mitjançant la inclusió del mutant en liposomes mostra que efectivament hi ha bombeig de protons encara que reduït (30 %) comparat amb la bR silvestre (figura IV.29). Aquest fet doncs indica que al mutant D96N/E194Q els processos d'expulsió i captació del protó es realitzen a l'hora. El fet de que la mutació D96N retardi la captació del protó cap als 100 ms, valor depenent de la intensitat lumínica, i de que el mutant E194Q retardi l'alliberació del protó cap als 30 ms, produeix que hi hagi un solapament parcial dels dos processos. La reduïda eficiència de bombeig ve com a conseqüència d'una menor proporció d'intermediari M format a aquest mutant.

Els intermediaris atrapats per FTIR mostren un comportament molt similar a l'observat al mutant individual E194Q. L'Asp 85, com que el CAP no es pot desprotonar, no pot patir el segon increment en el seu pK_a i a pH per sobre de 8 es desprotona. L'intermediari N atrapat al doble mutant presenta una BS protonada (figura IV.86 i IV.87), i ja que l'Asn 96 no es pot desprotonar, el protó en teoria ha de procedir directament des del medi extern. Si és així la reprotonació de la BS ha de ser tan lenta que l'intermediari atrapat ha de tenir una BS desprotonada com de fet succeeix en el mutant D96N. Les dades de fotòlisi de llampec però, ja mostraven que en el doble mutant la desaparició d'M no es trobava tan enlentida com al mutant D96N. Així doncs és d'esperar que la BS es trobi reprotonada en l'intermediari N atrapat. Però d'on ve aquest protó? La construcció i estudi del doble mutant D96N/E194Q esperàvem que ens respongués a aquesta pregunta. El fet de que la mutació E194Q influeixi de manera tan important en els aconteixements produïts a l'extrem citoplasmàtic de la bR no permet conèixer l'origen d'aquest protó.

V. **DISCUSSIÓ GENERAL**

La part extracel·lular de la bacteriorodopsina és una zona de gran interès en ser el lloc des d'on s'expulsa el protó al medi extracel·lular. El grup involucrat en aquesta expulsió, el CAP, es troba en estreta relació amb la BS de manera que aconteixements que succeeixen en la part extracel·lular es transmeten al voltant del retinal i viceversa. Amb l'obtenció d'estructures cada vegada de major resolució s'ha demostrat que la interacció entre la BS i el CAP es produeix via una complexa xarxa d'aigües que estableixen ponts d'hidrogen amb diferents aminoàcids de la proteïna (Luecke et al., 1999b) (veure secció I.7.1). Tot i conèixer la identitat dels grups participants en la xarxa d'aigües són molts els dubtes concernents a la funció específica de cadascun d'aquests grups.

Estudiant l'estructura de la bR però, es pot apreciar que aquesta xarxa d'aigües no és l'única existent a la proteïna. A la mateixa zona extracel·lular es pot apreciar l'existència d'un altre entramat de ponts d'hidrogen on hi participen les aigües 415, 416, 417 i 418 i diversos grups del voltant com són el glutàmic 9, la leucina 201 i l'asparragina 202 (figura I.20). La tirosina 79 es troba en una posició central comunicant la xarxa d'aigües principal amb aquesta xarxa secundària (figura I.16). L'alteració de les posicions de l'Arg 7 i el Glu 9 i la mutació de la Tyr 79 per una fenilalanina dóna lloc a canvis estructurals en la bR tal i com ho indiquen les dades d'incubació dels mutants amb hidroxilamina (taula IV.5). Aquest fet dóna lloc a una alteració del pK_a de l'Asp 85 i del CAP per un costat i a una menor estabilitat tèrmica i alteració de l'ordenació paracristal·lina de la bR per l'altre. Aquestes mutacions, però, semblen no afectar de manera important la funció de la proteïna donat que les característiques del fotocicle i del mecanisme de bombeig de protons no difereixen de la bR silvestre (figura IV.28 i IV.31).

Aquesta xarxa d'aigües secundària es troba localitzada en una butxaca creada per les prolines 8, 77 i 200 (figura I.18 i I.20) i el seu paper estructural i/o funcional no ha sigut estudiat fins al moment. La curiosa disposició d'aquestes prolines envoltant les molècules d'aigua va suscitar la idea de que aquesta estructura podria tenir alguna funció important en la bR. L'estudi de la mutació d'aquestes prolines per glicines i de les interaccions que aquestes realitzen, ha revelat que aquestes prolines semblen no interaccionar directament amb la xarxa i que podrien actuar en realitat produint torsions i/o conformacions adequades a les hèlices i bucles permetent l'establiment de ponts

d'hidrogen de grups del voltant. La substitució d'aquestes prolines per glicines dóna lloc a alteracions del pK_a de l'Asp 85. És la substitució de la prolina 77 però la que produeix els canvis més importants en la proteïna a nivell d'estructura, estabilitat tèrmica i entorn del CAP. Quan totes tres prolines però, són substituïdes a l'hora, l'efecte observat és molt més dràstic on els únics experiments que s'han pogut realitzar mostren que hi ha una descompactació important de les hèlices que segurament dóna lloc al important canvi observat del pK_a de l'Asp 85.

L'alteració que produeix la mutació de les prolines en la xarxa secundària no afecta solament l'estructura de la proteïna, sinó també la seva funcionalitat (veure secció IV.3.3.2). Les mutacions P77G, P200G i P8W redueixen l'eficiència de bombejar protons de la proteïna indicant doncs que aquests grups estarien involucrats directa o indirectament en el mecanisme de bombeig de protons, probablement en l'expulsió dels protó al medi. Així doncs la substitució de les prolines produeixen unes alteracions més importants que no pas les produïdes per les mutacions R7E/E9R i Y79F degut potser a que en mutar les prolines s'està afectant la xarxa d'aigües secundària més profundament.

A part de la influència de les mutacions via xarxa d'aigües, en aquest estudi també hem detectat efectes a curta distància com és la mutació S193A. La serina 193 es troba interaccionant doblement amb el glutàmic 204 apropant-lo al glutàmic 194 (figura I.17). En realitzar la mutació S193A una d'aquestes interaccions es trencaria (figura IV.11) produint segurament un allunyament dels dos glutàmics i l'increment d'una unitat de pH del pK_a del CAP (figura IV.35). Així doncs la serina 193 sembla actuar de pont entre els glutàmics 194 i 204 apropant suficientment les seves càrregues negatives com per establir el correcte pK_a del CAP. Aquesta serina a més sembla estar involucrada directa o indirectament en el mecanisme de bombeig de protons, ja que la seva substitució per una alanina no solament redueix el nombre de molècules que son capaces d'iniciar el fotocicle, sinó que a més redueix la capacitat de la proteïna de transportar protons.

La serina 193 tot i trobar-se interaccionant amb els glutàmics 194 i 204, i presentar algunes característiques similars al mutant E194Q (allargament important del temps d'adaptació a la foscor (veure secció IV.2.2.1 i IV.4.2.1)) presenta un comportament ben diferent en altres aspectes. El mutant S193A per exemple no presenta una desprotonació abans d'hora de l'Asp 96 en els intermediaris N i M atrapats

per FTIR com s'obté al mutant E194Q (veure secció IV.4.3.4) però si una pobre acumulació d'M obtenint-se barreges d'L i N (taula IV.10), ni una inversió en el procés de bombeig de protons. Així doncs, tot i semblar ser un grup important per mantenir la correcta estructura del CAP, la seva mutació no produeix una inhabilitació d'aquest.

L'establiment de xarxes d'aigua permanents sembla ser una característica de la part extracel·lular de la bR ja que a la part citoplasmàtica s'estableixen xarxes transitòries en algun moment del fotocicle (Cao et al., 1991) (veure secció I.6.2). A l'estat basal però, fenòmens que succeeixen a la part citoplasmàtica afecten a la part extracel·lular. La mutació D96N per exemple, altera l'entorn del CAP incrementant en una unitat de pH el seu pK_a a l'estat basal (figura IV.82). Així doncs, tot i que no hi ha una xarxa d'aigües establerta a l'estat basal a la part citoplasmàtica aquesta es troba comunicada amb l'extrem extracel·lular.

Aquesta influència a llarga distància ja ha sigut observada anteriorment mitjançant el marcatge de les valines amb ^{13}C al mutant D96N i el seu posterior estudi per NMR (Tanio et al., 1999b). Aquestes dades mostren que en realitzar aquesta mutació es produeixen canvis en la Val 199 localitzada al costat extracel·lular, i es proposa que aquests canvis es produeixen mitjançant la connexió de D96-T46-V49-D85-E204.

La influència entre els dos extrems de la proteïna es dona en tots dos sentits tal i com ho mostren les dades presentades a aquest treball. Quan l'Asp 96 es substitueix per una asparragina el protó que ha de reprotonar la BS durant el fotocicle ha de provenir directament del medi extern (Otto et al., 1989; Tittor et al., 1989) i és per aquest motiu que en aquest mutant l'intermediari M té un temps de vida mitja força incrementat comparat amb la bR silvestre. En afegir la mutació E194Q al mutant D96N, es produeix una important disminució del temps de vida mitja d'M degut a que en el doble mutant la BS es reprotona més ràpidament que al mutant D96N (veure secció IV.4.3.1). L'afavoriment de la reprotonació de la BS al doble mutant podria estar casat per una facilitació de l'entrada del protó des del citoplasma o bé induint la desprotonació d'un grup alternatiu a l'Asp 96. El fet de que el doble mutant presenti una menor compactació de les hèlices (veure secció IV.4.2.4) podria recolzar la idea de la facilitació de l'entrada del protó des del medi. Sigui quin sigui el cas, l'acceleració en la reprotonació de la BS indica que l'eliminació de la càrrega negativa del glutàmic 194

deu influenciar els ponts d'hidrogen de la zona citoplasmàtica a través de la inducció de canvis en la xarxa de ponts d'hidrogen de la part extracel·lular.

Les mutacions R7E/E9R, Y79F i P8W per altre costat també podrien produir un efecte a llarga distància facilitant la reprotonació de l'Asp 96, situat a l'altre costat de la proteïna, tal i com ho mostra l'acceleració de la desaparició d'M^s.

Aquests casos no són els únics que evidencien la influència entre els dos extrems de la proteïna. El mutant E204Q és un altre exemple on es pot observar una alteració del costat oposat de la proteïna, tal com mostra l'estudi per RMN d'aquest mutant, en el que es produeixen canvis en la Val 49, situada en el costat citoplasmàtic (Tanio et al 1999b). Un altre cas d'interacció a llarga distància és la de l'Arg 82 amb el Glu 231 (Alexiev et al., 2000), ja que la doble mutació R82A/G231C reverteix els efectes produïts al mutant individual R82A.

Són doncs molts els casos en els que s'ha pogut observar una interacció entre extrems de la bR. Així doncs no ens ha de sorprendre que durant el fotocicle la desprotonació del CAP a M₁, localitzat al costat extracel·lular, produeixi una obertura de les hèlices a la part citoplasmàtica per permetre l'entrada de molècules d'aigua i que per tant l'Asp 96 primer es pugui desprotonar i després reprotonar-se (veure secció I.6.2). Aquestes interaccions a llarga distància semblen ésser una característica general de la família de proteïnes de 7 hèlices α com són els GPCRs (Receptors acoblats a proteïna G). En aquesta família de receptors, cal que es produeixi la transmissió de canvis conformacionals des del costat extracel·lular al citoplasmàtic, per tal de que es produeixi l'activació de la proteïna G específica (Hargrave et al., 1992). Així doncs, el mecanisme conformacional responsable d'aquesta propagació de canvis estructurals present en la bR seria homòleg al mecanisme present a la família GPCR. En particular, s'ha descrit que la rodopsina també presenta una obertura del costat citoplasmàtic a l'intermediari Meta II (Menon et al., 2001), de manera semblant a la bR.

L'estudi dels diferents mutants presentats a aquest treball ha permès obtenir dades no solament dels grups mutats, sinó també del funcionament general de la bR. El fet per exemple de que el mutant P8W presenti una certa desprotonació de la BS a pH neutres (veure secció IV.3.2.3) però no una desnaturalització, mostra que no és exclusivament la desprotonació de la BS el que determina la desnaturalització de la proteïna. Sembla ser doncs que és necessària la desprotonació de diverses tirosines

(Balashov et al., 1991) perquè la desprotonació de la BS doni lloc a la desnaturalització de la proteïna.

Les dades de fotocorrents per a la bR silvestre per altra banda mostren que en augmentar el pH del medi per sobre de 8 es comença a produir una acceleració important de la desaparició de B2. La representació de la constant de desaparició de B2 en funció del pH dona una corba sigmoïdal amb un pK_a de 8,3 (figura IV.34). Liu (1990) va suggerir que la desaparició del component lent de B2 era degut a la incapacitat de la bR de bombejar protons a pH cada vegada més alcalins, i que aquest fet era degut a la desprotonació d'algun grup a pH elevats. Balashov et al (1991) va suggerir que el grup que s'havia de desprotonar era una tirosina i que era el seu estat de protonació el que determinava la constant de caiguda de B2. Les dades obtingudes però en aquest treball junt amb les de Sanz (2000) suggereixen que en realitat el grup que es desprotona a elevats pH és el glutàmic 194. Aquesta conclusió s'extrau del fet de que en mutar aquest grup per una glutamina desapareix la dependència del pH de la desaparició de B2 (figura IV.82). De fet, el valor de la constant de B2 al mutant E194Q es el mateix a tot el rang de pH i es correspon amb el mateix valor obtingut a la bR silvestre a pH bàsics on el Glu 194 es troba desprotonat. Com que la desaparició de B2 i formació d'M segueixen la mateixa cinètica (figura IV.32 bis i IV.35), és l'estat de protonació del mateix grup el que determina la dependència de les seves constant del pH. Així doncs, la independència de la formació d'M del pH del medi en el mutant E194Q (Sanz 2000) es donaria com a conseqüència de la inhabilitació d'aquest grup a protonar-se/desprotonar-se.

Per tant, la corba sigmoïdal obtinguda de la representació de la constant de desaparició de B2 o aparició de M en funció del pH, és en realitat la corba de titració del glutàmic 194 a l'estat basal de la proteïna donant un pK_a aparent entre 8,3 i 8,8. Aquest valor està d'acord amb resultats publicats per altres grups (Dickopf et al., 1997). La dependència de la formació d'M i desaparició de B2 del pH sembla que també depèn del glutàmic 204, en certa forma. En efecte, experiments de fotòlisi de llampec (Sanz 2000) i fotocorrents sobre el mutant E204Q (dades no publicades) mostren que en comparació amb la bR silvestre, la dependència del pH es desplaça cap a valors més extrems del pH. Així, la mutació del Glu 204 per Gln podria influir en el pK_a del Glu 194.

La bR és una proteïna que té varis llocs d'unió de cations, però llur localització és un tema molt controvertit (veure secció I.8) En estudis recents publicats al nostre grup (Sanz et al., 2001) sobre els glutàmics extracel·lulars 9, 74, 194 i 204 es va proposar un model de llocs d'unió de cations, on un catió es trobaria unit al voltant del glutàmic 9, i un altre es trobaria compartit entre els glutàmics 194 i 204. L'estudi presentat en aquest treball es centra principalment en la part extracel·lular de la bacteriorodopsina, i moltes de les mutacions dutes a terme es troben pròximes a aquests llocs d'unió. Per exemple les mutacions P8G, P8W i R7E/E9R poden afectar el lloc d'unió del glutàmic 9 i les mutacions P200G i S193A el lloc compartit pel grup 194 i 204. S'ha de tenir en compte però, que com s'ha mostrat al llarg d'aquesta tesi, a la part extracel·lular hi ha una complexa connexió entre els diferents grups via diverses xarxes d'aigua. Així doncs, altres mutacions com la Y79F o P77G poden afectar els llocs d'unió dels cations a traves de les xarxes d'aigua.

Tot i que en aquest treball no s'ha estudiat directament la influència de les mutacions sobre la unió de cations a la proteïna, les dades de titració de pH en diferents condicions i de DSC que mostren una possible alteració en el contingut de cations en aquests mutants. I és per aquest motiu que alguns efectes sobre l'estructura i funció de la proteïna observat en alguns mutants poden venir provocades per aquest menor contingut en cations.

Durant el doctorat són vàries les tècniques que hem estat posant a punt al nostre laboratori. Una d'aquestes tècniques és la d'obtenció de cristalls de bacteriorodopsina. Recentment hem aconseguit obtenir cristalls de la bR silvestre l'aspecte dels quals sembla indicar que són de bona qualitat (figura I.3). L'estudi per raig X d'aquests cristalls no s'ha pogut dur a terme de moment i és per aquest motiu que encara no hem obtingut l'estructura d'aquests cristalls. Altra tècnica que també s'està acabant de posar a punt és la de microscòpia de força atòmica (AFM). Aquesta tècnica permet obtenir imatges de l'ordenació para-cristal·lina de la bR. De fet ja hem obtingut algunes imatges de la bR silvestre encara que no són de massa bona qualitat (figura I.6).

I es que és de vital importància desenvolupar i aplicar noves tècniques d'estudi de la bR ja que tot i la gran quantitat d'estudis que s'han realitzat sobre la bR, són molts encara els dubtes que s'han d'esclarir. Després de 40 anys d'estudi de la bR fins i tot actualment s'està qüestionant si la bR en realitat bombeja protons des del citoplasma al

costat extracel·lular. Hi ha cada vegada més adeptes a la teoria de que en realitat la bR el que bombeja són hidroxils des del costat extracel·lular al citoplasmàtic (Luecke., 2000).

VI CONCLUSIONS

1.- L'intercanvi de les posicions dels grups arginina 7 i glutàmic 9 i la mutació de la tirosina 79 per fenilalanina donen lloc a una alteració estructural de la proteïna que es tradueix per un costat en una modificació del pK_a de l'Asp 85 i del complex alliberador del protó i per altre costat en una menor estabilitat tèrmica de la bR i l'alteració de la ordenació para-cristal·lina de la membrana púrpura. Aquests canvis només tenen un efecte lleuger sobre la funció de la proteïna demostrant que aquests grups no estan implicats directament en el mecanisme de transport.

2.- La serina 193 juga un paper important en el manteniment del pK_a correcte del CAP. Aquesta funció la realitzaria mitjançant el doble pont d'hidrogen que estableix amb el glutàmic 204 apropant-lo cap al glutàmic 194. Aquesta serina a més té un paper important en mantenir el correcte establiment de la xarxa d'aigües i la funcionalitat de la bR ja que la seva substitució per una alanina produeix una notable inhabilitació de la proteïna tant en iniciar el fotocicle com en bombejar protons.

3.- La funció de les prolines 8, 77 i 200, presents en els bucles del costat extracel·lular sembla consistir en produir les torsions necessàries en la cadena polipeptídica per què es puguin configurar les interaccions adequades entre diferents grups i les aigües de la xarxa secundària. Es demostra que la substitució d'aquestes prolines per glicines afecta l'eficiència del transport de protons.

4.- La prolina 77 permet interaccions al bucle B-C que produeix la direccionalització de l'extrem d'aquest bucle cap als bucles D-E i F-G. La mutació P77G impediria la formació d'aquestes interaccions i per tant podria donar lloc a una obertura entre els altres dos bucles. Aquest fet produeix que el mutant P77G presenti una elevada accessibilitat per la hidroxilamina.

5.- La substitució de la prolina 200 per una glicina restringeix el moviment de les hèlices durant el fotocicle. La interacció produïda entre la isoleucina 191 de l'hèlix F i la leucina 201 de l'hèlix G es podria trobar afavorida per la presència de la prolina 200. En realitzar la mutació P200G aquest enllaç, i/o l'establert entre la Pro 200 i el Glu

204, podria trencar-se i permetre que els extrems de les hèlices F i G estableixin noves interaccions potser més rígides que restringirien el moviment de les hèlices.

6.- La mutació P8W produeix canvis estructurals molt importants de la proteïna que alteren l'entorn del retinal, afavorint la desprotonació de la BS a pH neutre, l'increment del pK_a de l'Asp 85 i la formació de bR púrpura-àcida en absència d'ions clor. L'accessibilitat de la BS per la hidroxilamina indica una important obertura de les hèlices en aquest mutant. La introducció d'un triptòfan en aquesta posició produeix una alterada ordenació de la membrana púrpura.

7.- S'han aportat noves dades que demostren la influència mútua entre els costats citoplàsmic i extracel·lular de la bR. El doble mutant D96N/E194Q presenta una menor rigidesa de les hèlices en comparació amb els mutants individuals, com s'observa de les dades extrems de l'incubació del mutant amb hidroxilamina. La presència d'una major obertura de les hèlices durant el fotocicle podria ser el causant de que la reprotonació de la BS s'acceleri notablement en el doble mutant comparat amb el mutant D96N. Aquesta alteració estructural a més produeix una important davallada de l'estabilitat tèrmica de la proteïna.

8.- La doble mutació D96N/E194Q inhibeix parcialment la capacitat de la proteïna d'iniciar el fotocicle de manera més important que els mutants individuals. Les molècules de bR que realitzen el fotocicle duen a terme el transport d'un protó. Ara bé, l'expulsió i captació del protó en aquest mutant es solapen en el temps, impeding la detecció d'activitat bombejadora via experiments amb piranina.

9.- La formació d' M_1 i M_2 , és a dir, la desprotonació i la reorientació de la BS depèn de l'estat de protonació del glutàmic 194. Així doncs quan a pH alcalí aquest grup es troba desprotonat, la BS es desprotona i es reorienta més ràpidament que quan el glutàmic 194 es troba protonat. S'ha comprovat que el pK_a obtingut per fotocorrents es correspon amb el pK_a del Glu 194, i per tant del complex alliberador del protó, a l'estat basal.

10.- La desprotonació de la BS no és suficient per donar lloc a la denaturalització alcalina de la bR ja que és necessari que també es desprotonin altres grups de la proteïna com poden ser diverses tirosines. Aquesta conclusió s'extrau del fet de que alguns dels mutants estudiats en aquesta tesi, com per exemple el mutant P8W, presenten un desacoblament entre l'aparició de BS desprotonada i la desnaturalització de la proteïna.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Alexiev U., Mollaaghababa., Khorana H. G. and Heyn M. P. (2000) Evidence for long range allosteric interactions between the extracellular and cytoplasmatic parts of Bacteriorhodopsin from the mutant R82A and its second site revertant R82A/G231C. *J. Biol. Chem.* **275**, 13531-13440.
- Ames J. B., Fodor S. P. A., Gebhard R., Raap J., van der Berg E.M.M., Lugtenburg J. and Mathies R. A. (1989) Bacteriorhodopsin's M412 intermediate contains a 13-cis, 14-s-trans, 15-anti-retinal Schiff base chromophore. *Biochemistry* **28**, 3681-3687.
- Ames J. B. and Mathies R. A. (1990) The role of back-reactions and the proton uptake during the N \rightarrow O transition in Bacteriorhodopsin's photocycle: a kinetic resonance raman study. *Biochemistry* **29**, 7181-7190.
- Ariki M. and Lanyi J. (1986) Characterization of metal ion-binding sites in Bacteriorhodopsin. *J.Biol.Chem.* **261**, 8167-8174.
- Atkinson G. H., Ujj L. and Zhou Y. (2000) Vibrational spectrum of the J-625 intermediate in the room temperature Bacteriorhodopsin photocycle. *J. Phys. Chem. A.* **104**, 4130-4139.
- Azuaga A. I., Sepulcre F., Padrós E. and Mateo P. L. (1996) Scanning calorimetry and Fourier-transform infrared studies into the thermal stability of cleaved Bacteriorhodopsin systems. *Biochemistry* **50**, 16328-16335.
- Balashov S. P., Govindjee R. and Ebrey T. G. (1991) Red shift of the Purple Membrane absorption and the deprotonation of tyrosine residues at high pH. *Biophys. J.* **60**, 475-490.
- Balashov S. P., Govindjee R., Kono M., Imasheva E., Lukashev E., Ebrey T. G., Crouch R. K., Menick D. R. and Feng Y. (1993) Effect of the arginine-82 to alanine mutation in Bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle. *Biochemistry* **32**, 10331-10343.
- Balashov S. P., Govindjee R., Imasheva E., Misra S., Ebrey T. G., Feng Y., Crouch R. K. and Menick D. R. (1995) The two pK_a's of aspartate-85 and control of thermal isomerization and the proton release in the arginine-82 to lysine mutant of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 8820-8834.
- Balashov S. P., Imasheva E., Govindjee R. and Ebrey T. G. (1996) Titration of aspartate-85 in Bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release. *Biophys J.* **70**, 473-481
- Balashov S. P., Imasheva E. S., Ebrey T. G., Chen N., Menick D. R. and Crouch R. K. (1997) Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 8671-8676.
- Belrhali H., Nollert P., Royant A., Menzel C., Rosenbuch J. P., Landau E. M. and Pebay-Peyroula E. (1999) Protein, lipid and water organization in Bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure* **8**, 909-917.

- Benardó P., Barbieri R., Padrós E., Luchinat C. and Pons M. (2002) Lanthanide modulation of the orientation of macromolecules induced by Purple Membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 374-375.
- Betlach M. C., Leong D. and Boyer H. W. (1986) Bacterio-opsin gene expression in *Halobacterium salinarum* System. *Appl. Microbiol.* **7**, 83-89.
- Birge R. R. (1995) Ordenadores de base proteínica. *Investigación y Ciencia*. **Mayo**, 60-65.
- Birge R. R., Gillespie N. B., Izaguirre E. W., Kusnetzow A., Lawrence A. F., Singh D., Song Q. W., Schmidt E., Stuart J. A., Seetharaman S. and Wise K. J. (1999) Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memories. *J. Phys. Chem. B.* **103**, 10746-10766.
- Blaurock A. E. and Stoeckenius W. (1971) Structure of the Purple Membrane. *Nature New Biology* **233**, 152-155.
- Bousché O., Braiman M., He Y. W., Khorana H. G. and Rothschild K. J. (1991) Vibrational spectroscopy of Bacteriorhodopsin mutants. Evidence that As9-96 deprotonates during the M \rightarrow N transition. *J. Biol. Chem.* **266**, 11063-11066.
- Bousché O., Sonar S., Krebs M. P., Khorana H. B. and Rothschild K. J. (1992) Time-resolved fourier transform of the Bacteriorhodopsin mutant Tyr.185 \rightarrow Phe: Asp-96 reprotonates during O formation; As-85 and Asp-212 deprotonate during O decay. *Photochem. Photobiol.* **56**, 1085-1095.
- Braiman M. S., Ahl P. L. and Rothschild K. J. (1987) Millisecond fourier-transform infrared difference spectra of Bacteriorhodopsin's M₄₁₂ photoproduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 5221-5225.
- Braiman M. S., Mogi T., Marti T., Stern L. J., Khorana H. G. and Rothschild K. J. (1988) Vibrational spectroscopy of Bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96 and 212. *Biochemistry.* **27**, 8516-8520.
- Braiman M. S., Bousché O. and Rothschild J. (1991) Protein dynamics in the Bacteriorhodopsin photocycle: submillisecond fourier transform infrared spectra of the L, M and N photointermediates. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**, 2388-2392.
- Braiman M. S., Dioumaev A. K. and Lewis J. R. (1996) A large photolysis-induced pK_a increase of the chromophore counterion in Bacteriorhodopsin: implications for ion transport mechanism of retinal proteins. *Biophys. J.* **70**, 934-947.
- Brouillette C. G., Muccio D. D. and Finney T. K. (1987) pH dependence of Bacteriorhodopsin thermal unfolding. *Biochemistry* **26**, 7431-7438.
- Brown L. S., Sasaki J., Kandori H., Maeda A., Needleman R. and Lanyi J. K. (1995) Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of Bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **270**, 27122-27126.

- Brown L. S., Needleman R. and Lanyi J. K. (1999) Functional roles of aspartic acid residues at the cytoplasmatic surface of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **38**, 6855-6861.
- Butt H. J., Fendler K., Bamberg., Tittor J. and Oesterhelt D. (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of Bacteriorhodopsin as a proton pump. *EMBO J.* **8**, 1657-1663.
- Cao Y., Váró G., Chang M., Ni B., Needleman R. and Lanyi J. K. (1991) Water is required for proton transfer from aspartate-96 to the Bacteriorhodopsin Schiff Base. *Biochemistry* **30**, 10972-10979.
- Chakrabarti P. and Chakrabarti S. (1998) C-H...O hydrogen bond involving proline residues in α helices. *J. Mol. Biol.* **284**, 867-873.
- Chang C.-H., Chen J.-G., Govindjee R. and Ebrey T. (1984) Cation binding by Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **82**, 396 - 400.
- Chang C.-H., Jonas R., Melchiorre S., Govindjee R. and Ebrey T. G. (1986) Mechanism and role of divalent cation binding of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **49**, 731-739.
- Cladera J., Galisteo M. L., Duñach M., Mateo P. L. and Padrós E. (1988) Thermal denaturation of deionized and native Purples Membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **934**, 148-156.
- Cladera J., Galisteo M. L., Sabés M., Mateo P. L. and Padrós E. (1992) The role of retinal in the thermal stability of the Purple Membrane. *Eur. J. Biochem.* **207**, 581-585.
- Cladera J., Torres J. and Padrós E. (1996) Analysis of conformational changes in Bacteriorhodopsin upon retinal removal. *Biophys. J.* **70**, 2882-2887.
- Cline S. W. and Doolittle W. F. (1987) Efficient transfection of the Archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriology* **169**, 1341-1344.
- Cline S. W., Lam W. L., Charlebois R. L., Schalkyk L. C., and Doolittle W. F. (1989) Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **35**, 148-152.
- DasSarma S., RajBhandary U. L., and Khorana H. G. (1984) Bacterio-opsin mRNA in wild-type and Bacterio-opsin-deficient *Halobacterium salinarum* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 125-129.
- Dencher N. A. and Heyn M. P. (1979) Bacteriorhodopsin monomers pump protons. *FEBS Lett.* **108**, 307-310.
- Dencher N. A., Dresselhaus D., Zaccai G and Büldt G. (1989) Structural changes in Bacteriorhodopsin during proton translocation revealed by neutron diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7876-7879.
- Dencher N., Rafferty C. N. and Sperling W. (1982) Photochemistry and isomer determination of 13-cis and trans-Bacteriorhodopsin. *Methods in Enzimology* **88**, 167-175.

- Dickopf S. and Heyn M. P. (1997) Evidence for the first phase of the reprotonation switch of Bacteriorhodopsin from time-resolved photovoltage and flash photolysis experiments on the photoreversal of the M-intermediate. *Biophys. J.* **73**, 3171-3181.
- Dioumaev A. K., Richter H. T., Brown L. S., Tanio M., Tuzi S., Saitô H., Kimura Y., Needleman R. and Lanyi J. K. (1998) Existence of a proton transfer chain in Bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry* **37**, 2496-506.
- Dioumaev A. K., Brown L. S., Needleman R. and Lanyi J. K. (1999) Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the Bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212. *Biochemistry* **38**, 10070-10078.
- Dollinger G., Eisenstein L., Lin S. L., Nakanishi N., Odashima K. and Termini J. (1986) Bacteriorhodopsin: fourier transform infrared methods for studies of protonation of carboxyl groups. *Methods Enzymol.* **127**, 649-662.
- Druckmann S., Ottolengui M., Pande A. and Callender R. H. (1982) Acid-base equilibrium of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **21**, 4953-4959.
- Duñach M., Seigneuret M., Rigaud J.-L. and Padrós E. (1986) The relationship between the chromophore moiety and the cation binding sites in Bacteriorhodopsin. *Bioscience reports* **6**, 961- 966.
- Duñach M., Seigneuret M., Rigaud J.-L. and Padrós E. (1987) Characterization of the cation binding sites of the purple membrane. Electron spin resonance and flash photolysis studies. *Am. Chem. Soc.* **26**, 1180-1185.
- Duñach M., Seigneuret M., Rigaud J.-L. and Padrós E. (1988) Influence of cations on the blue to purple transition of Bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **263**, 17378-17384.
- Duñach M., Padrós E., Muga A. and Arrondo J. L. R. (1989) Fourier-transform infrared studies on cation binding to native and modified purple membranes. *Biochemistry* **28**, 8940-8945.
- Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S.H., Rajbhandary U. T. and Khorana H.G. (1981) The Bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6744-6748.
- Earnest T. N., Roepe P., Braiman M. S., Gillespie J. and Rothschild J. (1986) Orientation of the Bacteriorhodopsin chromophore probed by polarized fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry* **25**, 7793-7798.
- Ebrey T. G., Bencher B. and Kilbride B. M. P. (1977) Exciton interactions and chromophore orientation in the Purple Membrane. *J. Mol. Biol.* **112**, 377-397.
- Edman K., Nollert P., Royant A., Belrhali H., Pebay-Peyroula E., Hajdu J., Neutze R. and Landau E.M. (1999) High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Nature* **401**, 822-826.
- Eliash T., Weiner L., Ottolenghi M. and Sheves M. (2001) Specific binding sites for cations in Bacteriorhodopsin. *Biophys J.* **81**, 1155-1162.

- Facciotti M. T., Rouhani S., Burkard F. T., Betancourt F. M., Downing K. H., Rose R. B., McDermott G. and Glaeser R. M. (2001) Structure of an early intermediate in the M-state phase of the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* **81**, 3442-3455.
- Fahmy K., Weidlich M., Engelhard M., Tittor J., Oesterhelt D. and Siebert F. (1992) Identification of the proton acceptor of the Schiff Base deprotonation in Bacteriorhodopsin: A fourier-transform infrared study of the mutant Asp85→Glu in its natural lipid environment. *Photochem. Photobiol.* **56**, 1073-1083.
- Fischer U. and Oesterhelt D. (1979) Chromophore equilibria in Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **28**, 211-230.
- Fischer W. B., Sonar S., Marti T., Khorana H. G. and Rothschild K. J. (1994) Detection of a water molecule in the active-site of Bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction. *Biochemistry.* **33**, 12757-12762.
- Fodor S. P., Ames J. B., Gebhard R., Van der Berg E. M. M., Stoeckenius W., Lugtenburg J. and Mathies R. A. (1988) Chromophore structure in Bacteriorhodopsin's N intermediate: implications for the proton-pumping mechanism. *Biochemistry* **27**, 7097-7101.
- Friedman N., Gat Y., Sheves M. and Ottolenghi M. (1994) On the heterogeneity of the M population in the photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **33**, 14758-14767.
- Fujiyoshi Y. (1999) Molecular structure of the proton pump revealed with electron crystallography. *The FASEB Journal.* **13**, S191-S194.
- Fukuda K. and Kouyama T. (1992) Photoreaction of Bacteriorhodopsin at high pH: origins of the slow decay component of M. *Biochemistry* **31**, 11740-11747.
- Gennis R. B. and Ebrey T. G. (1999) Proton pump caught in the act. *Science* **286**, 252-253.
- Gerwert K., Souvignier G. and Hess B. (1990) Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of Bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 9774-9778.
- Govaerts C., Blanpain C., Deupi X., Ballet S., Ballesteros J. A., Wodak S. J., Vassart G., Pardo L. and Parmentier M. (2001) The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. *J. Biol. Chem.* **276**, 13217-13225.
- Govindjee R., Misra S., Balashov S. P., Ebrey T. G., Crouch R. K. and Menick D. R. (1996) Arginine-82 regulates the pK_a of the group responsible for the light-driven proton release in Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **71**, 1011-1023.
- Griffiths J. A., King J., Yang D., Browner R. and El-Sayed M. A. (1996) Calcium and magnesium binding in the native and structurally perturbed purple membrane. *J. Phys. Chem.* **100**, 929-933.
- Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K. H., Baldwin J. M. and Henderson R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**, 393-421.

- Hampp N., Bräuchle C. and Oesterhelt D. (1990) Bacteriorhodopsin wild type and variant aspartate-96 → asparagine as reversible holographic media. *Biophys. J.* **58**, 83-93.
- Hampp N. (2000) Bacteriorhodopsin as photochromic retinal protein for optical memories. *Chem. Rev.* **100**, 1755-1776.
- Hargrave P. A. and McDowell J. H (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *Faseb J.* **6**, 2323-2331.
- Hartsel S. C. and Cassim J. Y. (1988) Structure and photodynamics of Bacteriorhodopsin in a delipidated contracted lattice form of Purple Membrane. *Biochemistry* **27**, 3720-3724.
- Hayashi S., Tajkhorshid E. and Schulten K. (2002) Structural changes during the formation of Early intermediates in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* **83**, 1281-1297.
- Heberle J. and Dencher N. A. (1990) Accelerated proton transfer from the Purple Membrane surface. *FEBS Letters.* **277**, 277-280.
- Heberle J. and Dencher N. A. (1992) Proton transfer in the light-harvesting protein Bacteriorhodopsin: an investigation with optical pH-indicators. Proton transfer in hydrogen-bonded systems. Ed. T. Bountis, *Plenum Press, New York* 187-197.
- Henderson R. and Unwin P. N. T. (1975a) Three-dimensional model of the Purple Membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28-32.
- Henderson R. (1975b) The structure of the Purple Membrane form *Halobacterium salinarum*: analysis of the X-ray diffraction pattern. *J. Mol. Biol.* **93**, 123-138.
- Henderson R., Balwin J. M. and Ceska T. A. (1990) Model for the structure of Bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.
- Heyes C. D. and El-Sayed M. A. (2001) Effect of temperature, pH, and metal ion binding on the secondary structure of Bacteriorhodopsin: FT-IR study of the melting and the premelting transition temperatures. *Biochemistry* **40**, 11819-11827.
- Heyes C. D., Wang J., Sanii L. S. and El-Sayed A. (2002) Fourier transform infrared study of the effect of different cations on Bacteriorhodopsin protein thermal stability. *Biophys. J.* **82**, 1598-1606.
- Heymann J. B., Pfeiffer M., Hildebrandt V., Kaback H. R., Fotiadis D., de Groot B., Engel A., Oesterhelt D. and Müller D. J. (2000) Conformations of the rhodopsin third cytoplasmic loop grafted onto Bacteriorhodopsin. *Structure* **8**, 643-653.
- Heyn M. P., Cherry R.J. and Müller U. (1997) Transient and linear dichroism studies on Bacteriorhodopsin: determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore. *J. Mol. Biol.* **117**, 607-620.

- Hiraki K., Hamanaka T., Mitsui T. and Kito Y. (1981) Phase transitions of the Purple Membrane and the Brown Holo-Membrane X-ray diffraction, circular dichroism spectrum and absorption spectrum studies. *Biochem. Biophys. Acta* **647**, 18-28.
- Hoflack J., Trumpp-Kallmeyer S. and Hibert M. (1994) Re-evaluation of Bacteriorhodopsin as a model for G protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **15**, 7-9.
- Holz M., Drachev L. A., Tatsushi M., Otto H., Kaulen A. D., Heyn M. P., Skulachev V. P. and Khorana H. G. (1989) Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in Bacteriorhodopsin slows the decay of the M intermediate and the associated proton movement. *Proc. Natl. Sci. USA*. **86**, 2167-2171.
- Huang K. S., Bayley H. and Khorana H. G. (1980) Delipidation of Bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 323-327.
- Ihara K., Umemura T., Katagiri I., Kitajima-Ihara T., Sugiyama Y., Kimura Y. And Mukohata Y. (1998) Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J. Mol. Biol.* **285**, 163-174.
- Jackson M. B. and Sturtevant J. M. (1978) Phase transitions of the Purple Membranes of *Halobacterium halobium*. *Am. Chem. Soc.* **17**, 911-915.
- Jonas R., and Ebrey T. G. (1991) Binding of a single divalent cation directly correlates with the purple-to-blue transition in Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 149-153.
- Juncosa M., Pons J., Planas A. and Querol E. (1994) Improved efficiency in site-directed mutagenesis by PCR using *Pyrococcus* sp GB-D polymerase. *Biotechniques* **16**, 820-821.
- Kamikubo H., Oka T., Imamoto Y., Tokunaga F., Lanyi J. K. and Kataoka M. (1997) The last phase of the reprotonation switch in Bacteriorhodopsin: the transition between the M-type and the N-Type protein conformation depends on hydration. *Biochemistry* **36**, 12282-12287.
- Kano K. and Fendler J.H. (1978) Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. *Biochem. Biophys. Acta* **509** 289-299.
- Kataoka M., Hisatomi O., Tokunaga F., Washioka H. and Tonosaki A. (1982) Electron microscopy observation on the phase transition of Purple Membrane. *J. Biochem.* **92**, 1667-1670.
- Kates M., Kushwaha S.C. and Sprott G. D. (1982) Lipids of Purple Membrane from extreme halophiles and methanogenic bacteria. *Methods in enzymology* **88**, 98-111.
- Kelemen L., Galajda P., Száraz S. and Ormos P. (1999) Chloride ion binding to Bacteriorhodopsin at low pH : an infrared spectroscopic study. *Biophys. J.* **76**, 1951-1958.

- Kikukawa T., Araiso T., Mukasa K., Shimozawa T. and Kamo N. (1995) The molecular motion of Bacteriorhodopsin mutant D96N in the Purple Membrane. *FEBS Letters* **377**, 502-504.
- Kimura Y., Ikegami A. and Stoeckenius W., (1984) Salt and pH-dependent changes of the purple membrane absorption spectrum. *Photochem. Photobiol.* **40**, 641-646.
- Kimura Y., Vassyleyev D. G., Miyazawa A., Kidera A., Matsushima M., Mitsuoka K., Murata K., Hirai T. and Fujiyoshi Y. (1997) Surface of Bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **389**, 206-211.
- Koch M. H. J., Dencher N. A., Oesterhelt D., Plöhn H. J., Grapp G. and Büldt G. (1991) Time-resolved X-ray diffraction study of structural changes associated with the photocycle of Bacteriorhodopsin. *The EMBO J.* **10**, 521-526.
- Kolbe M., Besir H., Essen L. O. and Oesterhelt D. (2000) Structure of the light-driven chloride pump Halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* **288**, 1390-1396.
- Kouyama T., Nasuda-Kouyama A., Ikegami A., Mathiew M. K. and Stoeckenius W. (1988) Bacteriorhodopsin photoreaction: identification of a long-lived intermediate N (P,R350) at high pH and its M-like photoproduct. *Biochemistry* **27**, 5855-5863.
- Koyama Y., Nakasu H., Mukai Y. and Tokunaga F. (1993) Isomerization of the retinylidene chromophore of Bacteriorhodopsin in light adaptation: intrinsic isomerization of the chromophore and its control by the apo-protein. *Photochem. Photobiol.* **57**, 732-738.
- Kresheck G.C., Lin C.T., Williamson L. N. Mason W. R. (1990) The thermal stability of native, delipidated, deionized and regenerated Bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **7**, 289-302.
- Krimm S. and Dwivedi A. M. (1982) Infrared spectrum of the Purple Membrane: clue to a proton conduction mechanism? *Nature* **216**, 407-408.
- Kuschmitz D. and Hess B. (1982) Trans-cis isomerization of the retinal chromophore of Bacteriorhodopsin during the photocycle. *FEBS Letters* **138**, 137-138.
- Landau E.M. and Rosenbusch J. P. (1996) Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14532-14535.
- Landt O., Grunert H. P. and Hahn U. (1990) A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**, 125-128.
- Lanyi J. K. (1979) The role of Na⁺ in transport processes of bacterial membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **559**, 377-397.
- Lanyi J. K. and Pohorille A. (2001) Proton pumps: mechanism of action and applications. *TRENDS in Biotechnology* **19**, 140-144.
- Lanyi J. K. and Schobert B. (2002) Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the Schiff Base: the switch in the Bacteriorhodopsin photocycle. *J. Mol. Biol.* **321**, 727-737.

- Lazarova T. and Padrós E. (1996) Helical and reverse turn changes in the BR-N transition of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **35**, 8354-8358.
- Lazarova T., Sanz C., Querol E. and Padrós E. (2000) Fourier transform infrared evidence for early deprotonation of Asp⁸⁵ at alkaline pH in the photocycle of Bacteriorhodopsin mutants containing E194Q. *Biophys. J.* **78**, 2022-2022.
- Lazarova T., Sanz C., Sepulcre F., Querol E. and Padrós E. (2002) Specific effects of chloride on the photocycle of E194Q and E204Q mutants of Bacteriorhodopsin as measured by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **41**, 8176-8183.
- Le Coutre J., Tittir J., Oesterhelt D. and Gerwert K. (1995) Experimental evidence for hydrogen-bonded network proton transfer in Bacteriorhodopsin shown by Fourier-transform infrared spectroscopy using azide as catalyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4962-4966.
- Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H. and Stoeckenius W. (1974) Tunable later resonance raman spectroscopy of Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4462-4466.
- Liu S. Y. and Ebrey T. G. (1988) Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel. *Biophys. J.* **54**, 321-329.
- Liu S. Y. (1990) Light-induced currents from oriented purple membrane. Correlation of the microsecond component (B2) with the L-M photocycle transition. *Biophys. J.* **57**, 943-950.
- Lozier R. H., Bogomolni R. A. and Stoeckenius W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium salinarum*. *Biophys. J.* **15**, 955-962.
- Ludlam G. J. and Rothschild K. J. (1997) Similarity of Bacteriorhodopsin structural changes triggered by chromophore removal and light-driven proton transport. *FEBS Letters* **407**, 285-288.
- Ludmann K., Gergely C. and Váró G. (1998) Kinetic and thermodynamic study of Bacteriorhodopsin photocycle over a wide pH range. *Biophys. J.* **75**, 3110-3119.
- Luecke H., Richter H. T. and Lanyi J. K. (1998) Proton transfer pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Å resolution. *Science* **280**, 1934-1937.
- Luecke H., Schobert B., Richter H. T., Cartailler J. P. and Lanyi J. K. (1999a) Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **291**, 899-911.
- Luecke H., Schobert B., Richter H. T., Cartailler J. P. and Lanyi J. K. (1999b) Structural changes in Bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution. *Science* **286**, 255-259.
- Luecke (2000) Atomic resolution structures of Bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochem. Biophys. Acta* **1460**, 133-156.
- Maeda A., Sasaki J., Shichida Y., Yoshizawa T., Chang M., Ni B., Needleman R. and Lanyi K. L. (1992) Structures of acid 96 in the L and N intermediates of

- Bacteriorhodopsin : analysis by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 4684-4690.
- Maglova L., Guleva D., Chekulaeva L. and Atanasov B. (1990) A calorimetric study of White and Purple Membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1017**, 217-220.
 - Marinetti T., Subramaniam S., Mogi T., Marti T. And Khorana G. (1989) 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. USA* **86**, 529-533.
 - Mathies R. A., Lin S. W., Ames J. B. and Pollard W. T. (1991) From femtoseconds to biology: mechanism of Bacteriorhodopsin's light driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 491-518.
 - Menon S. T., Han M. And Sakmar T. P. (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiological Reviews* **81**, 1659-1688.
 - Metz G., Siebert F. and Engelhard M. (1992) Asp⁸⁵ is the only aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of Bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* **303**, 237-241.
 - Misra S. (1998) Contribution of proton release to the B2 photocurrent of Bacteriorhodopsin. *Biophys J.* **75**, 382-388.
 - Mitsouka K., Hirai T., Murata K., Miyazawa A., Kidera A., Kimura Y. and Fujiyoshi Y. (1999) The structure of Bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* **286**, 861-882.
 - Möller C., Büldt G., Dencher N. A., Engel A. Müller D. J. (2000) Reversible loss of crystallinity on photobleaching Purple Membrane in the presence of hydroxylamine. *J. Mol. Biol.* **301**, 869-879.
 - Mowery P.C., Lozier R. H., Chae Q., Tseng Y-W., Taylor M. and Stoerkenius W. (1979) Effect of acid pH on the absorption spectra and the photoreactions of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **18**, 4100-4107.
 - Muccio D. D. and Cassim J.Y. (1979) Interpretations of the Effects of the pH on the spectra of the purple membrane. *J. Mol. Biol.* **135**, 595-609.
 - Müller J., Münster C. and Salfitt T. (2000) Thermal denaturing of Bacteriorhodopsin by X-ray scattering from oriented Purple Membranes. *Biophys. J.* **78**, 3208-3217.
 - Nassal M., Mogi T., Karnik S. S. and Khorana H. G. (1987) Structure-function studies on Bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **262**, 298-302.
 - Neumüller M. and Jähnig F. (1996) Modeling of Halorhodopsin and Rhodopsin based on Bacteriorhodopsin. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics.* **26**, 146-156.
 - Ni B., Chang M., Duschl A., Lanyi J. and Needleman R. (1990) An efficient system for the synthesis of Bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium*. *Gene* **90**, 169-172.

- Oesterhelt D. and Stoeckenius W. (1971) Rhodopsin-like protein from the Purple Membrane of *Halobacterium salinarum*. *Nature New Biology* **233**, 149-152.
- Oesterhelt D. (1973a) Reversible photolysis of the Purple Complex in the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* **37**, 316-326.
- Oesterhelt D. and Stoeckenius W. (1973b) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2853-2857.
- Oesterhelt D., Meentzen M. and Schuhmann L. (1973c) Reversible dissociation of the Purple Complex in Bacteriorhodopsin and identification of the 13-cis and all-trans retinal as its chromophores. *Eur. J. Biochem.* **40**, 453-463.
- Oesterhelt D. and Stoeckenius W. (1974a) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into Red and Purple Membrane. *Methods in Enzymology* **31**, 667-678.
- Oesterhelt D., Schuhmann L. and Gruber H. (1974b) Light-dependent reaction of Bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of *Halobacterium salinarum*: demonstration of an apo-membrane. *FEBS Letters* **44**, 257-261.
- Oesterhelt D. and Schuhmann L. (1974c) Reconstitution of Bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* **44**, 262-265.
- Oesterhelt D. (1976) Bacteriorhodopsin as light-induced ion exchanger? *FEBS Letters* **64**, 20-22.
- Ohno K., Takeuchi Y. and Yoshida M. (1977) Effect of light-adaption on the photoreaction of Bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum*. *Biochem. Biophys. Acta* **462**, 575-582.
- Ohno K., Takeuchi Y. and Yoshida M. (1981) On the two forms of intermediate M of Bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **33**, 573-578.
- Oka T., Yagi N., Fujisawa T., Kamikubo H., Tokunaga F. and Kataoka M. (2000) Time resolved x-ray diffraction reveals multiple conformations in the M-N transition of the Bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 14278-14282.
- Oka T., Yagi N., Tokunaga F. and Kataoka M. (2002) Time-resolved X-ray diffraction reveals movement of F helix of D96N Bacteriorhodopsin during M-MN transitional neutral pH. *Biophys. J.* **82**, 2610-2616.
- Ormos P., Chu K. and Mourant J. (1992) Infrared study of the L, M and N intermediates of Bacteriorhodopsin using the photoreaction of M. *Am. Chem. Soc.* **31**, 6933-6937.
- Otto H., Marti T., Holz M., Mogi T., Lindau M., Khorana H. G. and Heyn M. P. (1989) Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9228-9232.
- Ovchinnikov Y. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Y., Kiselev A. V. and Lobanov N. A. (1979) The structural basis of the functioning of Bacteriorhodopsin: an overview. *FEBS Letters* **100**, 219-223.

- Padrós E., Sanz C., Lazarova T., Márquez M., Sepulcre F., Trapote X., Muñoz F. X., Gonzalez-Moreno R., Bourdelande J. L. and Querol E. (2001) Extracellular mutants of Bacteriorhodopsin as possible materials for bioelectronic applications. Bioelectronic applications of photochromic pigments. NATO Science Series. Series I: Life and behavioural sciences. **335**, 120-136.
- Papadopoulos G., Dencher N. A., Zaccai G. and Büldt G. (1990) Water molecules and exchangeable hydrogen ions at the active centre of Bacteriorhodopsin localized by neutron diffraction. *J. Mol. Biol.* **214**, 15-19.
- Pebay-Peyroula, Rummel G., Rosenbuch J. P. and Landau E. M. (1997) X-ray structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *SCIENCE* **277**, 1676-1681.
- Peck R.F., Echavarri-Erasun C., Johnson E. A., Ng W. V., Kennedy S. P., Hood L., DasSarma S. and Krebs M. P. (2001) brp and blh are required for synthesis of the retinal cofactor of Bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* **23**, 5739-5744.
- Pfefferlé J. M., Maeda A., Sasaki J. and Yoshizawa T. (1991) Fourier transform infrared study of the N intermediate of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **30**, 6548-6556.
- Pfeifer F., Friedman J., Boyer H. W. and Betlach M. (1984) Characterization of insertions affecting the expression of the Bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Research* **12**, 2489-2497.
- Pohorille A. and Deamer D. (2002) Artificial cells: prospects for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* **20**, 123-128.
- Polland H. J., Franz M. A., Zinth W., Kaiser W., Kölling E. and Oesterhelt D. (1984) Optical picosecond studies of Bacteriorhodopsin containing a sterically fixed retinal. *Biochem. Biophys. Acta* **767**, 635-639.
- Radionov A. N. and Kaulen A. D. (1996) Two Bacteriorhodopsin M intermediates differing in accessibility of the Schiff Base for azide. *FEBS Letters* **387**, 122-126.
- Radionov A. N. and Kaulen A. D. (1997) 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 Letters* **409**, 137-140.
- Rammelsberg R., Huhn G., Lübben M. and Gerwert K. (1998) Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network. *Biochemistry* **37**, 5001-5009.
- Rehorek M. and Heyn M. P. (1979) Bind of all-trans retinal to the Purple Membrane. Evidence for cooperativity and determination of the extinction coefficient. *Biochemistry* **18**, 4977-4983.
- Renthall R., Shuler K. and Regalado R. (1990) Control of Bacteriorhodopsin colour by chloride at low pH. Significance for the proton pump mechanism. *Biochem. Biophys. Acta* **1016**, 378-384.

- Richter H. T., Brown L. S., Needleman R. and Lanyi J. K. (1996) A linkage of the pK_a's of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **30**, 4054-4062.
- Riek R. P., Rigoustos I., Novotny J. and Graham R. M. (2000) Non- α -helical elements modulate polytopic membrane protein architecture. *J. Mol. Biol.* **306**, 349-362.
- Riesle J., Oesterhelt D., Dencher N. and Heberle J. (1996) D38 is an essential part of the proton translocation pathway in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **35**, 6635-6643.
- Rothschild K. J. and Clark N. A. (1979) Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane. *Biophys. J.* **25**, 473-488.
- Rothschild K. (1992) FTIR difference spectroscopy of Bacteriorhodopsin: toward a molecular model. *J. Bioenergetics and Biomembranes* **24**, 147-167.
- Rothschild K. J., Marti T., Sonar S., He Y. W., Rath P., Fischer W. And Khorana H. G. (1993) Asp⁹⁶ deprotonation and transmembrane α -helical structural changes in Bacteriorhodopsin. *J Biol Chem.* **268**, 27046-27052.
- Rouso I., Gat Y., Lewis A., Sheves M. and Ottolenghi M. (1998) Effective light-induced hydroxylamine reactions occur with C₁₃=C₁₄ nonisomerizable Bacteriorhodopsin pigments. *Biophys J.* **75**, 413-417.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanz C., Lazarova T., Sepulcre F., González-Moreno R., Bourdelande J-L., Querol E. and Padrós E. (1999) Opening the Schiff base moiety of Bacteriorhodopsin by mutation of the four extracellular Glu side chains. *FEBS Letters* **456**, 191-195.
- Sanz C. (2000) Disseny i expressió de bacteriorodopsines mutants en *Halobacterium salinarum*: estudi estructural i funcional. Tèsi doctoral. Febrer. UAB.
- Sanz C., Márquez M., Perálvarez A., Elouatik S., Sepulcre F., Querol E., Lazarova T. and Padrós E. (2001) Contribution of extracellular Glu residues to the structure and function of Bacteriorhodopsin. Presence of specific cation-binding sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 40788-40794.
- Sass H. J., Büldt G., Gessenich R., Hehn D., Neff D., Schlesinger R., Berendzen J. and Ormos P. (2000) Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type Bacteriorhodopsin. *Nature* **406**, 649-652.
- Satoru T., Satoru Y., Michicazu T., Hidernasa K., Sayuri I., Akira N., Needleman R., Lanyi J. and Saito H. (1999) Location of the cation-binding site in the loop between helices F and G of Bacteriorhodopsin as studied by ¹³C NMR. *Biophys. J.* **78**, 1523-1531.
- Scherrer P., Mathew M. K., Sperling W. and Stoeckenius W. (1989) Retinal isomer ratio dark-adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin monomers. *Biochemistry* **28**, 829-834.

- Schobert B., Cupp-Vickery J., Hornak V., Smith S.O. and Lanyi J. K. (2002) Crystallographic structure of the K intermediate of Bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal. *J. Mol. Biol.* **321**, 715-726.
- Seiff F., Wallat I., Ermann P. and Heyn M. P. (1985) A neutron diffraction study on the location of the polyene chain of retinal in Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3227-3231.
- Sepulcre F., Cladera J., García J., Proietti M. G., Torres J. and Padrós E. (1996) An extended X-Ray absorption fine structure study of the high-affinity cation-binding site in the purple membrane. *Biophys. J.* **70**, 852-856.
- Shen Y., Safinya C. R., Liang K. S., Ruppert A. F. and Rothschild K. J. (1993) Stabilization of the membrane protein Bacteriorhodopsin to 140° C in two dimensional films. *Nature* **366**, 48-50.
- Siebert, F., Mäntele W. and Kreutz W. (1982) Evidence for the protonation of two internal carboxylic groups during the photocycle of Bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* **141**, 82-87.
- Siebert, F. and Mäntele W. (1983) Investigation of the primary photochemistry of Bacteriorhodopsin by low-temperature fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur J Biochem.* **130**, 565-573.
- Smith S.O., Pardeoen J. A., Mulder P. P. J., Curry B., Lugtenburg J. and Mathies R. (1983) Chromophore structure in Bacteriorhodopsin's O₄₆₀ photointermediate. *Biochemistry* **22**, 6141-6148.
- Smith S. O., Lugtenburg J. and Mathies R. A. (1985) Determination of retinal chromophore structure in Bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy. *J. Membr. Biol.* **85** 95-109.
- Soppa J., Otomo J., Straub J., Tittor J., Meeßen S. and Oesterhelt D. (1989) Bacteriorhodopsin mutants of *Halobacterium* sp. GRB II. Characterization of mutants. *J. Biol. Chem.* **264**, 13049-13056.
- Spassov V. Z., Luecke H., Gerwert K. and Bashford D. (2001) pK_a calculations suggest storage of an excess proton in a hydrogen-bonded water network in Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **312**, 203-219.
- Spudich J. L. Bogomolni R. A. (1988) Sensory rhodopsins of Halobacteria. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 193-215.
- Spudich J. L. (1994) Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor. *Cell* **79**, 747-750.
- Steinberg G., Friedman N., Sheves M. and Ottolenghi M. (1991) Isomer composition and spectra of the dark and light adapted forms of artificial Bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **54**, 969-976.
- Steinhoff H. J., Mollaaghababa R., Altenbach C., Hideg K., Krebs M., Khorana H. G. and Hubbell W. L. (1994) Time-Resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled Bacteriorhodopsin. *Science* **266**, 105-107.

- Stern L. J., Ahl P. L., Marti T., Mogi T., Duñach M., Berkowiz S., Rothschild K. J. and Khorana H. G. (1989) Substitution of membrane-embedded aspartic acids in Bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle. *Biochemistry* **28**, 10035-10042.
- Stoeckenius W. And Bogomolni R. A. (1982) Bacteriorhodopsin and related pigments of Halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 587-616.
- Subramaniam S., Marti T., Rösselet S. J., Rotchild K. J. and Khorana H. G. (1991) The reaction of hydroxylamine with Bacteriorhodopsin studied with mutants that have altered photocycles: selective reactivity of different photointermediates. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**, 2583-2587.
- Subramaniam S., Lindahl M., Bullough P., Faruqi A. R., Tittor J., Oesterhelt D., Brown L., Lanyi J. and Needleman R. (1999) Protein conformational changes in the Bacteriorhodopsin photocycle. *J. Mol. Biol.* **287**, 145-161.
- Sumper M. and Herrmann G. (1976) Biosynthesis of Purple Membrane: control of retinal synthesis by Bacterio-opsin. *FEBS Letters* **71**, 333-336.
- Szundi I. and Stoeckenius W. (1989) Surface pH controls purple-to-blue transition of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **56**, 369-383.
- Tajkhorshid E. and Suhai S. (1999) The effect of the protein environment on the structure and charge distribution of the retinal Schiff Base in Bacteriorhodopsin. *Theor. Chem. Acc.* **101**, 180-185.
- Takei H. and Lewis A. (1993) Biphasic M decay of high pH dehydrated Purple Membrane studied with fourier transform infrared spectroscopy: a model accounting for functional differences between different M forms. *Photochem. Photobiol.* **57**, 707-713.
- Taneva S. G., Koynova R. and Tenchov B. (1994) Thermal stability of lipid-depleted purple membranes at neutral and low pH values. *FEBS Letters* **345**, 154-158.
- Tanimoto T., Furutani Y. and Kandori H. (2003) structural changes of water in the Schiff Base region of Bacteriorhodopsin: proposal of a hydration switch model. *Biochemistry* **42**, 2300-2306.
- Tanio M., Tuzi S., Yamaguchi S., Kawaminami R., Naito A., Needleman R., Lanyi K. L. and Saitô H. (1999a) Conformational changes of Bacteriorhodopsin along the proton conduction chain as studied with ¹³NMR of (3-¹³C) Ala-labeled protein: Arg⁸² may function as a information mediator. *Biophys. J.* **77**, 1577-1584.
- Tanio M., Inoue S., Yokota K., Seki T., Tuzi S., Needleman R., Lanyi J. K., Naito A. and Saitô H. (1999b) Long-distance effects of the site-directed mutation on backbone conformation in Bacteriorhodopsin from solid state NMR of 1-C¹³ Val-labeled proteins. *Biophys. J.* **77**, 431-442.
- Terpigov E. L. and Degtyareva O. V. (2001) FTIR emission spectra of Bacteriorhodopsin in a Vibrational excited state. *Biochemistry (Moscow)* **66**, 1315-1322.

- Thorgeirsson T. E., Milder S. J., Miercke L. J. W., Betlach M.C., Shand R. F., Stroud R. M. and Kliger D. S. (1991) Effects of Asp-96 → Asn, and Arg-82 → Gln single-site substitutions on the photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **30**, 9133-9142.
- Thorgeirsson T. E., Xiao W., Brown L. S., Needleman R., Lanyi J. K. and Shin Y. K. (1997) Transient channel-opening in Bacteriorhodopsin: an EPR study. *J. Mol. Biol.* **273**, 951-957.
- Tittor J., Soell C., Oesterhelt D., Butt H-J. and Bamberg E. (1989) A defective proton pump, point-mutated Bacteriorhodopsin Asp96 → Asn is fully reactivated by azide. *EMBO J.* **8**, 3477-3482.
- Torres J., Sepulcre F. and Padrós E. (1995) Conformational changes in Bacteriorhodopsin associated with protein-protein interactions: a functional α I- α II helix switch? *Biochemistry* **34**, 16320-16326.
- Unwin P. N. T. and Henderson R. (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* **94**, 425-440.
- Van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., Grant W. D. and Konings W. N. (1999) Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles* **3**, 253-257.
- Váró G. and Lanyi J. K. (1989) Photoreactions of Bacteriorhodopsin at acid pH. *Biophys. J.* **56**, 1143-1151.
- Váró G. and Lanyi J. K. (1990) Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **29**, 2241-2250.
- Váró G. and Lanyi J. K. (1991a) Thermodynamics and energy coupling in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* **30**, 5016-5022.
- Váró G. and Lanyi J. K. (1991b) Kinetic and spectroscopy evidence for an irreversible step between deprotonation and reprotonation of the Schiff Base in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* **30**, 5008-5015.
- Váró G., Brown L. S., Needleman R. and Lanyi J. K. (1999) Binding of calcium ions to Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **76**, 3219-3226.
- Visiers I., Braunheim B. B. and Weinstein. (2000) Prokink: a protocol for numerical evaluation of helix distortions by proline. *Protein Engineering* **13**, 603-606.
- Vonk J. (2000) Structure of the Bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography. *The EMBO J.* **19**, 2152-2160.
- Wang J. (2000) Photocurrent from oriented membrane films containing acid-blue and acid-purple Bacteriorhodopsin and its mutants. *Photochem. Photobiol.* **71**, 476-480.
- Weidlich O., Ujj L., Jäger F. and Atkinson G. H. (1997) Nanosecond retinal structure changes in K-590 during the room-temperature Bacteriorhodopsin photocycle: picosecond time-resolved coherent anti-stokes raman spectroscopy. *Biophys. J.* **72**, 2329-2341.

- Xiao W., Brown L. S., Needleman R., Lanyi J. K. and Shin Y. K. (2000) Light-induced rotation of the transmembrane α -helix in Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **304**, 715-721.
- Xu Z. J., Moffett D. B., Peters T. R., Smith L. D., Perry B. P., Whitmer J., Stokke S. A. and Teintze M. (1995) The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of Bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **42**, 24858-24863.
- Yamazaki Y., Hatanaka M., Kandori H., Sasaki J., Karstens W. F. J., Raap J., Lugtenburg J., Bizounok M., Herzfeld J., Needleman R., Lanyi J. K. and Maeda A. (1995) Water structural changes at the proton uptake site (the Thr46-Asp96 domain) in the L intermediate of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 7088-7093.
- Yang D. and El-Sayed M. A. (1995) The Ca^{2+} binding to deionized monomerized and retinal removed Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **69**, 2056-2059.
- Zhang Y. N., Sweetman L. L., Award E. S. and El-Sayed M. A. (1992) Nature of the individual Ca^{2+} binding sites in Ca^{2+} -regenerated Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **61**, 1201-1206.
- Zhang N. Y. and El-Sayed M. A. (1993a) The C-Terminus and the Ca^{2+} low-affinity binding sites in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **32**, 14173-14175.
- Zhang Y. N., El-Sayed M. A., Stern L. J., Marti T., Mogi T and Khorana H. G. (1993b) Effects of mutagenic substitution of prolines on the rate of deprotonation and reprotonation of the Schiff Base during the photocycle of Bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **57**, 1027-1031.
- Zimányi L., Cao Y., Chang M., Ni B., Needleman R. and Lanyi J. K. (1992a) The two consecutive M substrates in the photocycle of Bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue replacements. *Photochem. Photobiol.* **56**, 1049-1055.
- Zimányi L., Váró G., Chang M., Ni B., Needleman R. and Lanyi J. K. (1992b) Pathways of proton release in the Bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* **31**, 8535-8543.
- Zscherp C. and Heberle J. (1997) Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N and O of the Bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **101**, 10542-10547.
- Zscherp C., Schlesinger R., Tittor J., Oesterhelt D. and Heberle J. (1999) In situ determination of transient pK_a changes of internal amino acids of Bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 5498-5503.
- Zscherp C., Schlesinger R. and Heberle J. (2001) Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reaction in the E194Q mutant of Bacteriorhodopsin. *Biochem. Biophys. Research Communications* **283**, 57-63.