

*Universitatea de Medicină și Farmacie
“Carol Davila” București*

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

STUDIUL PROTEINELOR RETINALE CU TRANSPORT DE IONI PRIN MEMBRANĂ

(BR-bacteriorodopsină, HR- halorodopsină, PR- proteorodopsină)

Conducător științific:

Prof. Dr. Constanța Ganea

Doctorandă:

Szakács Juliánna

2007

CUPRINS

Mulțumiri	3
I.1. Introducere	5
I.2. Generalități privind proteinele retinale și importanța lor biologică	5
I.2.1. Bacteriorodopsina	6
I.2.2. Halorodopsina	8
I.2.3. Proteorodopsina	8
I.2.4. Studiul comparativ al proteinelor retinale	8
I.3. Aplicații ale proteinelor retinale	10
Partea II. Contribuții originale	10
II.1. Introducere	10
II.2. Metode	11
II.2.1. Măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp (Spectroscopie optică tranzitorie multicanal)	11
II.2.2. Măsurătorile de cinetică de absorbție	12
II.2.3. Măsurarea semnalelor electrice	13
II.3. Studiul fotociclului proteorodopsinei (PR) la pH scăzut	14
II.3.1. Titrarea spectrofotometrică a PR.	14
II.3.2. Spectrele intermediarilor	16
II.3.3. Modelul fotociclului	19
II.3.4. Schema energetică a fotociclului	22
II.3.5. Deplasarea de sarcină în PR	23
II.4. Cinetica fotociclurilor bacteriorodopsinei (BR), halorodopsinei pharaonis (pHR) și proteorodopsinei deuterate	23
II.4.1. Materiale și condiții de măsurare	23
II.4.2. Rezultate și discuții	24
III. Concluzii generale	27
IV. Bibliografie	28

Mulțumiri

Teza de față este rezultatul unei colaborări științifice dintre Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București și Institutul de Biofizică din Szeged Ungaria, de asemenea și sprijinului acordat de către Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș.

Mulțumesc în mod deosebit doamnei **Prof. Dr. Constanța Ganea**, șefa Catedrei de Biofizică a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, conducătoarea mea științifică pentru îndrumarea constantă în realizarea acestei lucrări și sfaturile sale.

Doresc să mulțumesc și grupului de biofizică de la Institutul de Biofizică Szeged – Ungaria, în mod deosebit domnului **Dr. Doc. Váró György**, care mi-au oferit posibilitatea de a efectua măsurătorile prezentate în această teză, în cadrul unei colaborări științifice fructuoase.

Mulțumesc de asemenea domnului **Dr. Lányi K. János** de la Universitatea din California, Irvine, USA, Catedra de Fiziologie și Biofizică pentru sprijinul acordat în timpul măsurărilor.

Pe parcursul elaborării acestei teze m-am bucurat și de susținerea și îndrumarea continuă a doamnei profesoare **Dr. Eva Katona** de la Catedra de Biofizică a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, căreia îi aduc mulțumirile mele sincere.

Doresc să mulțumesc foarte mult domnului **Prof. Dr. Nicolaescu Ioan**, șeful Disciplinei de Biofizică și Biotehnică Medicală de la Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, pentru încurajarea continuă, înțelegere și sprijinul acordat pe parcursul elaborării acestei teze.

De asemenea aduc mulțumiri colectivului Catedrei de Biofizică de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, Grupului de Biofizică de la Institutul de Biofizică Szeged – Ungaria și colectivului Disciplinei de Biofizică și Biotehnică Medicală de la Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș.

Mulțumesc din suflet sprijinul permanent, răbdarea și înțelegerea familiei mele, căreia îi dedic această lucrare.

Abrevieri

BR	bacteriorodopsina
HR	halorodopsina
sHR	salinarum halorodopsin
pHR	pharaonis halorodopsin
PR	proteorodopsina
ATP	adenozintrifosfat
mp	membrană purpurie
CNN	rețea celulară neuronală neliniară („cellular nonlinear neural network”)
POAC	computere analogice optoelectronice programabile („Programmable Opto-Electronic Analogic CNN Computers”)
JTC	corelator de transformare („joint transform correlator”)
CNN-UM	mașină universală CNN („CNN Universal Machine”)
SLM	modulator de lumină spațial („spatial light modulator”)
ESLM	SLM adresat electronic („electronically addressed spatial light modulator”)
OASLM	SLM adresabil optic („optically addressable spatial light modulator”)
WORM	scrie o dată, citește de mai multe ori („write-once read-many”)
TEA	trietanolamine
OD	densitate optică sau absorbanță („optical density”)
CCD camera	cameră digitală („charge coupled device camera”)

Partea I. Bazele teoretice ale lucrării

1.1. Introducere

Proteinele retinale, care conțin șapte α -helixuri transmembranare, sunt atotprezente în celulele fotoreceptoare din ochii tuturor reprezentanților regnului animal. Sunt prezente, de asemenea, și în alte organisme și locații, cum ar fi procariotele archeale, microbii eucariotici unicelulari, țesutul dermatic al broaștelor, glandele pineale ale șopârlelor și păsărilor, în hipotalamusul broaștei râioase și în creierul uman. Funcția lor include transportul de ioni activat de lumină, semnalul fototactic din microorganisme și diferite tipuri de traducere a semnalului luminos întâlnite la diferite specii de animale superioare.

Cunoașterea în detaliu a structurii proteinelor retinale și a dinamicii lor moleculare, permite modificarea lor (biologică, chimică și fizică) moleculară controlată, cu obținerea unor forme cu utilizări practice deosebite. Printre acestea pot fi amintite: memorii în strat subțire cu accesare aleatorie, porți logice neuronale, numărătoare de fotoni și convertoare fotovoltaiici, medii holografice reversibile, reține artificiale, fotodetectoare în regimul picosecundelor, modulate spațiale de lumină, memorii asociative, memorii volumetrice bifotonice, corelatoare holografice, filtre optice neliniare, interferometre dinamice de timp mediu, limitatoare optice, sisteme de recunoaștere a formelor, porți logice cu nivele multiple, memorii volumetrice cu fotociclu ramificat etc. (Váró și Keszthelyi, 1985; Dyukova și col., 1997; Vsevolodov, 1998; Birge și col., 1999; Imam și col., 1995; Joseph și col., 1996; Huang și Wagner, 1993; Sánchez-de-la-Llave și Fiddy, 1999; Miyasaka, 1995; Okamoto și col., 1997; Mikaelian, 1996).

Dintre proteinele retinale, cele mai multe rezultate în acest sens au fost obținute pe bacteriorodopsină, aplicând variate tehnici instrumentale. Utilitatea informațiilor obținute a motivat studierea proprietăților și a altor proteine retinale, cea mai recent studiată fiind xantorodopsina.

Ținând cont de cele prezentate anterior, teza de față își propune un studiu comparativ al fotociclului proteinelor retinale BR (bacteriorodopsină), pHR (halorodopsină pharaonis) și PR (proteorodopsină) apelând la trei metode de investigare, și anume: măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp, măsurători de cinetică de absorbție și măsurători electrice.

1.2. Generalități privind proteinele retinale și importanța lor biologică

Proteinele retinale ca bacteriorodopsina, halorodopsina și proteorodopsina aparțin familiei de proteine transmembranare cu șapte segmente helicoidale. După excitarea cu lumină ele trec printr-o reacție fotociclică în timpul căreia transportă un ion (H^+ , Cl^- sau NO_3^-) prin membrana celulară (A. Matsuno-Yagi and Y. Mukohata, 1977; B. Schobert and J. K. Lanyi, 1982; O. Beja et al., 2000). Bacteriorodopsina (BR), găsită în *Halobacterium salinarum*, folosește energia luminoasă pentru a transporta protoni de pe partea citoplasmatică pe partea extracelulară a membranei (T. G. Ebrey, 1993; J. K. Lanyi and G. Váró, 1995; J. K. Lanyi 2004). Halorodopsina salinarum (sHR) a fost descoperită de asemenea în *Halobacterium salinarum*. Această proteină membranară transportă ionul de clor în interiorul celulei (B. Schobert and J. K. Lanyi, 1982). O pompă de clor similară, pharaonis halorhodopsin (pHR), a fost identificată în *Natronobacterium pharaonis* (A. Duschl et al., 1990; J. K. Lanyi et al., 1990). Spectrul intermediarilor și cinetica fotociclului ambelor HR (sHR și pHR) prezintă similarități cu cele ale BR, cu excepția intermediarului M care nu a putut fi identificat (G. Váró, 2000). Proteorodopsina PR a fost identificată în γ -proteobacterium, un bacterioplancton marin. Proteina a fost descoperită funcțional în *Escherichia coli* (O. Beja et al., 2000 ; O. Beja et al., 2001).

I.2.1. Bacteriorodopsina

În urmă cu 30 de ani, a fost descoperită bacteriorodopsina (BR), pompa de protoni activată de lumină, în *Halobacterium salinarum* (Oesterhelt and Stoeckenius, 1973). În acest organism, membrana purpurie (mp), o parte a membranei celulare, conține numai BR, într-o formă cristalină hexagonală, bidimensională perfect ordonată (75%) și lipide (25%) (Henderson, R. and P.N. Unwin, 1975).

Bacteriorodopsina transformă energia luminii “verzi” (500-650 nm, maximul de absorbție la 568 nm) într-un gradient electrochimic de protoni. BR conține 248 aminoacizi aranjați într-o structură transmembranară heptahelicoidală și un cromofor retinal legat la Lys-216 în helixul G printr-o bază Schiff protonată. Helixul C conține gruparea acceptoare de protoni (Asp-85) și gruparea donoare (Asp-96). Complexul protogen (proton donor), format din Arg-82, Glu-194, Glu-204 și câteva molecule de apă legată, este situat în canalul extracelular. Complexul ionic, protofil, format din Asp-212 și Arg-82 stabilizează baza Schiff protonată (Needleman et al., 1991; Balashov et al., 1992; Cao et al., 1993; Krebs et al., 1993). Retinalul separă semicanalul citoplasmatic de cel extracelular bordat de aminoacizi de importanță crucială pentru transferul eficient de protoni prin BR (în special Asp-96 în semicanalul citoplasmatic și Asp-85 în semicanalul extracelular). În BR adaptată la întuneric, 35% din retinal este în configurația trans în toate centrele, iar 65% este în configurația 13-cis (Scherrer et al., 1987). În timpul adaptării continue la lumină, conținutul în retinal aflat în configurația “all-trans” crește la aproape 100% (Konishi and Packer, 1976; Dencher et al., 1990) și astfel, proba devine omogenă în ceea ce privește configurația retinalului. După excitație luminoasă, BR intră într-un fotociclu având câțiva intermediari diferiți din punct de vedere spectral (K, L, M, N, O) (Lozier et al., 1975; Gergely et al., 1997) (Fig. 1).

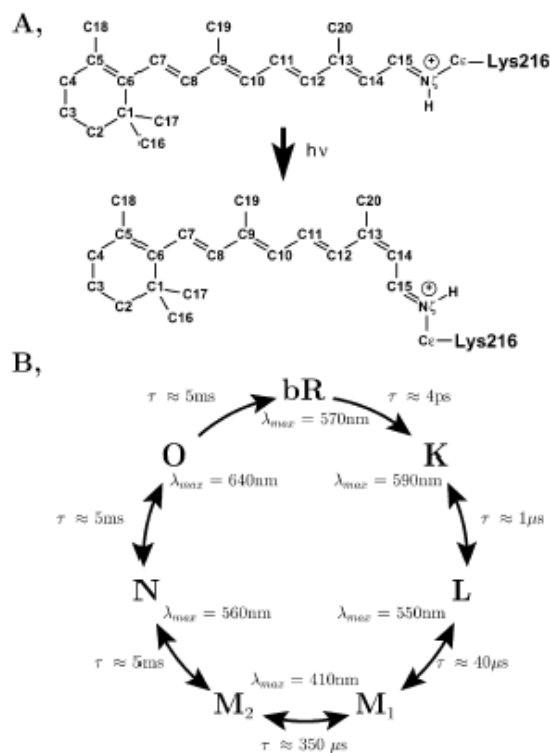


Fig.1. Reprezentarea schematică izomerizării retinalului indus de lumină și fotociclu BR.

(A) Cromoforul retinalului este legat covalent printr-o bază Schiff protonată la Lys216.

(B) Izomerizarea retinalului este primul eveniment în fotociclu. Intermediarii spectrali, maximele de absorbție și timpul lor de viață la temperatura camerei

Între valorile de pH 4 și 9 funcționarea BR poate fi descrisă cu un model care conține reacții reversibile într-un singur fotociclu (Váró and Lanyi, 1990; Ames and Mathies, 1990; Lozier et al., 1992; Ludmann et al., 1998b). Din electrogenicitatea intermediarilor s-au obținut informații asupra etapelor deplasării protonului în cursul fotocicluului (Ludmann et al., 1998a; Dér et al., 1999). După excitare luminoasă, retinalul cu configurația “all-trans” va trece în configurația 13-cis. Formarea intermediarului deplasat spre roșu (“red-shifted”) K este urmată de formarea intermediarului deplasat spre albastru (“blue-shifted”) L. Transferul primar de protoni de la baza Schiff la Asp-85 determină tranziția spectrală L→M, iar protonul este cedat de gruparea protogenă, ceea ce induce o deplasare puternică a maximului de absorbție spre albastru. Aceasta este urmată de rearanjarea structurală a părții citoplasmatică a proteinei, iar baza Schiff va fi reprotonată de la Asp-96, în intermediarul N. Apoi, Asp-96 este reprotonată, maximul de absorbție va fi iar deplasat spre roșu, iar retinalul se reizomerizează termic, pentru a reface configurația “all-trans”, formându-se astfel intermediarul O. În final, se reface starea inițială prin transferul unui proton de la Asp-85 la gruparea protogenă reală (presupusă reală) de pe partea extracelulară prin intermediul Arg-82 (Fig.2).

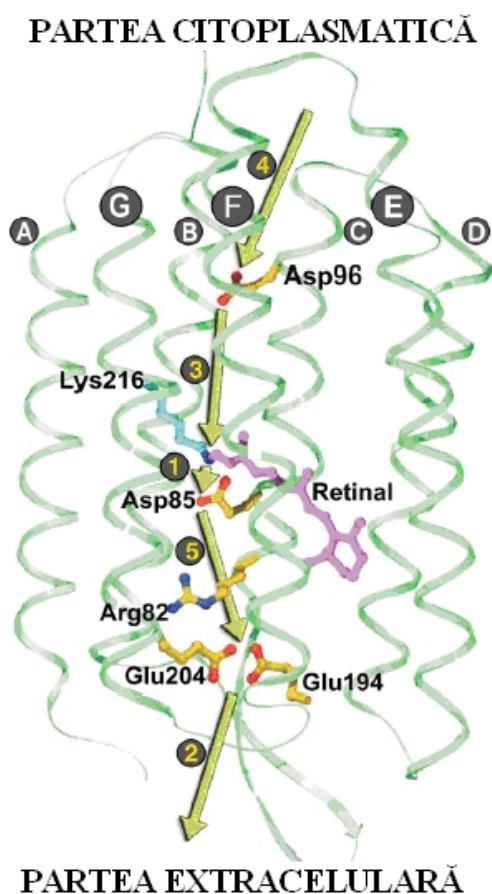


Fig.2. Reprezentarea shematică a etapelor transferului de protoni în fotocicluul BR.

I.2.2. Halorodopsina

Proteina retinală Halorodopsina - HR- folosește energia luminii “ verzi” (naturale) (500-650 nm, maximul de absorbție la 578 nm) pentru a transporta ionii de clor în celulă împotriva gradientului lor electrochimic. De la descoperirea acesteia s-au studiat mai multe tipuri de HR (Otomo et al., 1992; Soppa et al., 1993; Mukohata et al., 1999). Cel mai intens studiat dintre ele, salinarum halorodopsin (**sHR**) și pharaonis halorodopsin (**pHR**) se găsesc în *Halobacterium salinarum* respectiv în *Natronobacterium pharaonis*.

Structura primară a sHR (Blanck and Oesterhelt, 1987) și a pHR (Lanyi et al., 1990) a fost determinată din secvențele lor genetice. Există o identitate de 25% între cele două HR și BR. În sHR retinalul este legat covalent printr-o bază Schiff la Lys-242 aflată pe helixul G. Grupările protofile (Asp-85) și protogene (Asp-96) caracteristice BR, sunt schimbate în HR cu grupări neutre. Prin spectroscopie de rezonanță Raman s-a dovedit că clorul legat în HR este aproape de baza Schiff (Maeda et al., 1985; Pande et al., 1989) și aceasta face parte din complexul ionic de sarcină opusă (Ames et al., 1992). S-a demonstrat că ionul de clor ia locul grupării protofile (acceptoare de protoni) din BR, Asp-85 (Kolbe et al., 2000), astfel baza Schiff nu se deprotonează în fotociclu. În schimb mobilitatea ionului de semn opus facilitează mișcarea ionului de clor, astfel acesta poate urmări schimbarea orientării legăturii N-H din baza Schiff dinspre partea extracelulară spre cea citoplasmică (Oesterhelt et al., 1986). Mișcarea acestuia este etapa critică din transport, modificând specificitatea translocării ionice de la protoni la anioni.

Tăria ionică și prezența anionilor transportați influențează fotocicluul HR. Secvența intermediară în prezența ionilor de clor este K, L, N, O, HR', HR. Diferența principală dintre fotociclurile lui pHR și sHR constă în faptul că în sHR, starea O nu se acumulează (Váró et al., 1995), probabil din motive cinetice.

HR poate transloca (deplasa), în afară de ionii de clorură și alți anioni ca bromul, iodul și nitratul, cu diferite eficacități, spre interiorul celulei (Bamberg et al., 1984; Duschl et al., 1990). În prezența azidei baza Schiff se deprotonează (Hegemann et al., 1985) iar pompa de halogenuri se transformă în pompă de protoni direcționată extracelular (Váró et al., 1996).

I.2.3. Proteorodopsina

Proteorodopsina PR, pompa de protoni activată de lumină recent descoperită în planctonele marine, aparține familiei proteinelor retinale de tip I, rodopsinele de tip archeic (Spudich et al., 2000). Funcționarea ei este foarte asemănătoare cu cea a bacteriorodopsinei BR, fiind, deci, tot o pompă de protoni. Proteorodopsina fost descoperită în genomul bacteriei marine necultivate din grupul filogenetic “SAR 86”, care este prezentă în apele oceanice de suprafață.

I.2.4. Studiul comparativ al proteinelor retinale

Bacteriorodopsina și halorodopsina aparțin familiei proteinelor retinale, cu o asemănare a secvențelor aminoacide de 25%. Ambele proteine au 7 α helixuri care pătrund în membrană înconjurând retinalul. Fotoexcitarea transretinalului produce fotociclurile de transport ionic, care arată multe asemănări între cele două proteine (BR, HR), chiar dacă ionii transportați diferă (Fig. 3).

Spectrele intermediarilor K, L, N și O calculate din datele măsurătorilor spectroscopice cu rezoluție de timp sunt foarte asemănătoare în ambele proteine (Váró, 2000). Măsurătorile de cinetică de absorbție arată că fotocicluul de transport pentru ionii de Cl⁻ al halorodopsinei nu conține intermediarul M, caracteristic bazei Schiff deprotonate, iar intermediarul L domină procesul (Fig. 4).

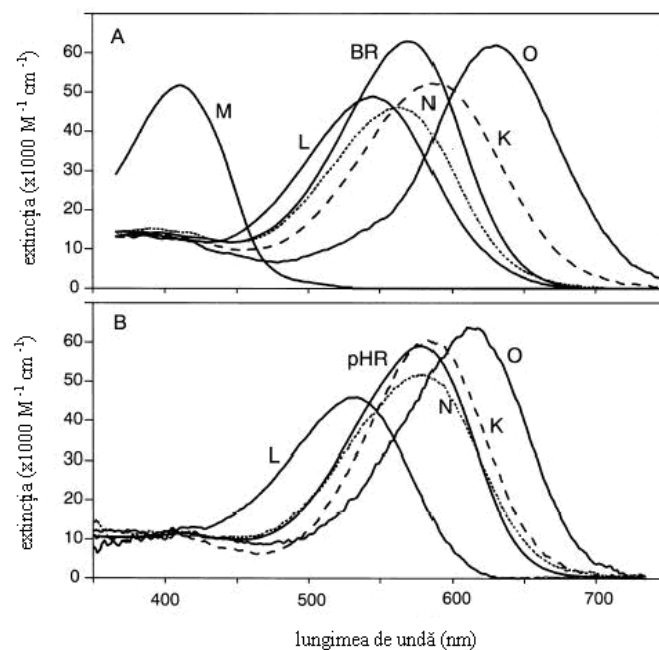


Fig. 3. Spectrele intermediarilor fotociclor BR și pHR.

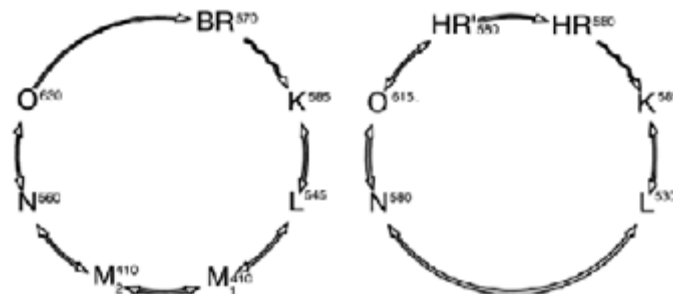


Fig. 4. Fotociclul BR și HR. Sunt indicate lungimile de undă al absorbției maxime.

Energetic, fotociclul bacteriorodopsinei este condus în mare parte de scăderea entropiei, în timp ce fotociclul halorodopsinei este condus de entalpie. Etapele transportului de ioni sunt caracterizate prin electrogenicitatea intermediarilor, calculată prin măsurarea semnalelor electrice induse de lumină. Funcționarea ambelor proteine poate fi descrisă cu modelul “accesului local”, dezvoltat pentru bacteriorodopsină (Lányi J.K., 2004). Cu ajutorul acestui model este ușor de înțeles că bacteriorodopsina poate fi transformată într-o pompă de Cl^- și halorodopsina într-o pompă de protoni, prin schimbarea specificității ionice cu ioni adăugați sau cu mutagenză direcționată.

I.3. Aplicații ale proteinelor retinale

Bacteriorodopsina (BR) a devenit cea mai populară proteină retinală complexă și un obiect de bază pentru investigații într-un domeniu nou: electronica biomoleculară.

Datorită proprietăților fotocromice, electrocromice, fotoelectrice și fotochimice împreună cu stabilitatea chimică extraordinară, moleculele BR sunt materiale optime pentru multe dispozitive opto-și bioelectronice (Wilkinson et al.,1999; Volperdinger and Hampp,1995; Batori-Tartsi et al.,1999; Tőkés et al.,2000; Seitz and Hampp,2000; Zeisel and Hampp,1992; Dér et al.,1999).

S-a dovedit că BR poate fi utilizată pentru materiale holografice reversibile tranzitorii în timp real. (Volperdinger and Hampp,1995; Batori-Tartsi et al.,1999; Tőkés et al.,2000; Seitz and Hampp,2000; Zeisel and Hampp,1992; Dér et al.,1999

I.4. Metode de investigare a proteinelor retinale cu transport de ioni prin membrană

Membranele purpurii (mp) ce conțin BR sunt ușor separabile de celule și își mențin funcția. Sunt remarcabil de stabile pentru un timp îndelungat. Schimbarea de culoare și fenomenele electrice în timpul fotociclului sunt calități care pot fi folosite în diverse aplicații tehnice.

Pentru o mai bună înțelegere a acestor fenomene, s-au aplicat măsurători de cinetică de absorbție, măsurători spectroscopice tranzitorii (măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp) și măsurători ale semnalului electric. Primele două tipuri de măsurători sunt complementare una alteia și pot fi combinate pentru raportul semnal/zgomot optim, atât în domeniul timp, cât și ca lungime de undă. Ambele tipuri de măsurători furnizează informații despre modificările de absorbție din timpul funcționării proteinei și permit elaborarea unui model cinetic al etapelor fotociclului.

În afara acestor metode de investigare accesibile și ușor de aplicat, în literatura de specialitate sunt descrise rezultate obținute și prin alte tehnici instrumentale, cum ar fi spectroscopie IR cu transformata Fourier, analiza termală diferențială ATD, difracția de raze X, în ultima perioadă microscopia de forță atomică revoluționând cunoașterea în acest domeniu.

Partea II. Contribuții originale

II.1. Introducere

Proteinele retinale ca bacteriorodopsina, halorodopsina și proteorodopsina aparțin familiei de proteine transmembranare cu șapte segmente helicoidale. După excitarea cu lumină ele trec printr-o reacție fotociclică în timpul căreia transportă un ion (H^+ , Cl^- sau NO_3^-) prin membrana celulară (A. Matsuno-Yagi and Y. Mukohata, 1977; B. Schobert and J. K. Lanyi, 1982; O. Beja et al., 2000). Bacteriorodopsina (BR), găsită în *Halobacterium salinarum*, folosește energia luminoasă pentru a transporta protoni de pe partea citoplasmatică pe partea extracelulară a membranei (T. G. Ebrey, 1993; J. K. Lanyi and G. Váró, 1995; J. K. Lanyi 2004). Halorodopsina salinarum (sHR) a fost descoperită de asemenea în *Halobacterium salinarum*. Această proteină membranară transportă ionul de clor în interiorul celulei (B. Schobert and J. K. Lanyi, 1982). O pompă de clor similară, pharaonis halorhodopsin (pHR), a fost identificată în *Natronobacterium pharaonis* (A. Duschl et al., 1990; J. K. Lanyi et al., 1990). Spectrul intermediarilor și cinetica fotociclului ambelor HR (sHR și pHR) prezintă similarități cu cele ale BR, cu excepția intermediarului M care nu a putut fi identificat (G. Váró, 2000). Proteorodopsina PR a fost identificată în γ -proteobacterium, un bacterioplancton marin. Proteina a fost descoperită funcțional în *Escherichia coli* (O. Beja et al., 2000 ; O. Beja et al., 2001).

În scopul de a înțelege detaliile fotociclului, deci a procesului de translocare a ionilor prin membrane, au fost efectuate măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp, de absorbție cinetică și măsurători de semnale electrice.

În continuare, descriu metodele prin care am studiat fotociclul proteinelor retinale cu transport de ioni prin membrană, fotociclul proteorodopsinei la pH scăzut (Lakatos et al., 2003), respectiv fotociclul bacteriorodopsinei (BR), halorodopsinei pharaonis (pHR) și proteorodopsinei deuterate (Szakács et al., 2005).

II.2. Metode

II.2.1. Măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp (Spectroscopie optică tranzitorie multicanal)

Spectrele diferențiale cu rezoluție de timp au fost măsurate cu un analizor multicanal optic cu poartă OMA (Optical multichannel analyzer) (Zimányi, L. et al., 1989 ; Zimányi, L. and J.K. Lanyi, 1993).

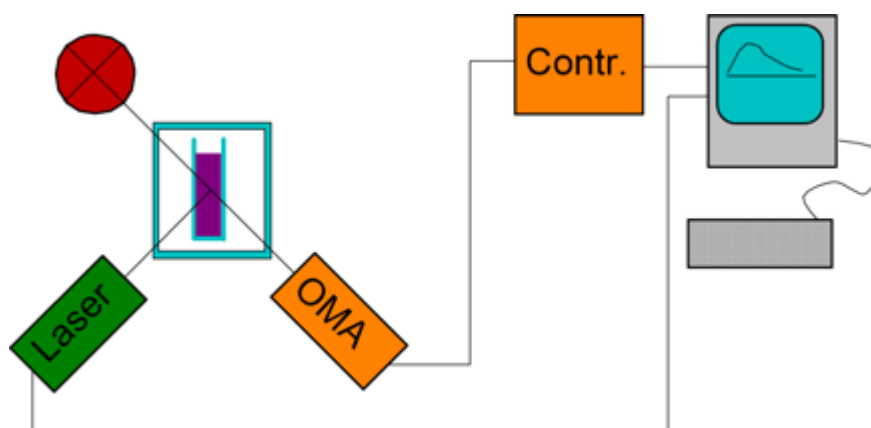


Fig.5. Schema analizatorului optic cu canale multiple

Excitarea laser este realizată cu un laser Nd-YAG cu frecvență dublă (Surelite I0, Continuum, Santa Clara, CA), cu o densitate energetică de $1,5\text{--}2\text{ mJ/cm}^2$ la lungimea de undă de 523 nm . O lampă halogen de 250 W a furnizat lumina necesară măsurătorii printr-un filtru de căldură - Fig.5. Pentru titrările spectrale, spectrul absolut al probelor în vizibil s-a măsurat cu un spectrometru Unicam (UV 4).

Probele au fost plasate într-o cuvă de $4\text{ mm} \times 10\text{ mm}$. După trecerea luminii de măsurare prin probă, ea a fost focalizată pe fanta de intrare a spectroscopului. Spectrul a fost proiectat pe un detector de tip șir de diode cu prag de intensitate, conectat la o placă de achiziție. Pragul detectorului este realizat cu un generator de puls de întârziere în domeniul ns până la ms.

II.2.2. Măsurătorile de cinetică de absorbție

Probele conținând proteina incorporată în gel au fost plasate într-o cuvă de cuarț și excitate cu un laser Nd-YAG cu dublu frecvență, densitate energetică de 1,5-2 mJ/cm² la 523 nm. Perpendicular pe direcția de excitare s-a aplicat lumina de măsurare, această lumină fiind furnizată de o lampă halogen 250W cu filtru de căldură. Flashul laserului a indus în probă o schimbare de absorbție care produce o modificare în intensitatea luminoasă a luminii de măsurare la o anumită lungime de undă. Semnalul trece printr-un monocromator la fotomultiplicator și este înregistrat cu o placă PC de înregistrare tranzitorie cu o memorie de 16MB (NI-DAQ PCI-5102 National Instruments, Austin, TX) (Fig. 6).

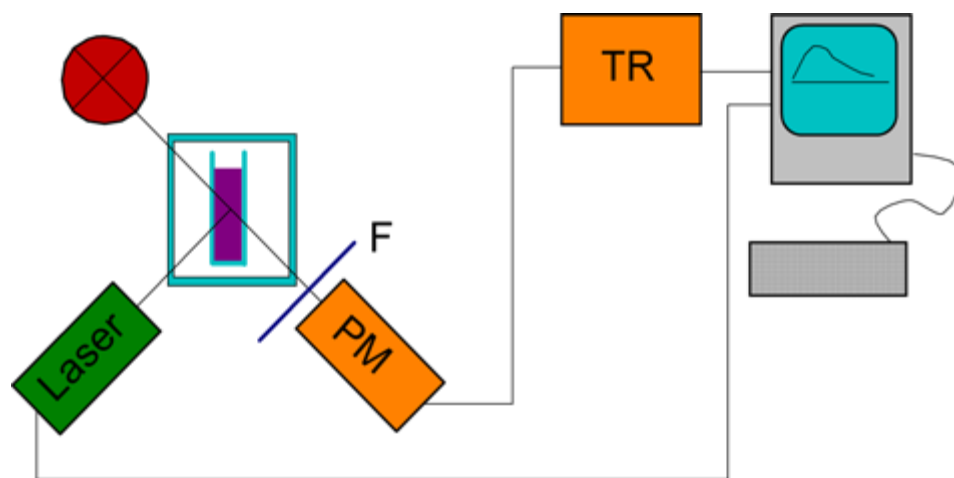


Fig.6. Schema aparatului de măsurare pentru cinetica de absorbție

Pe baza măsurătorilor cinetice de absorbție la diferite valori de temperatură, din graficele Eyring pot fi calculați parametrii termodinamici ai fotociclului și aceștia permit reprezentarea energetică a fotociclului.

Datele obținute la o viteză de 50 ns au fost transpuse într-o scală logaritmică de timp, prin calcularea mediilor valorilor echidistante logaritmice. Fiecare măsurătoare a fost o medie de 100-200 de semnale. Variațiile absorbției înregistrate la câteva lungimi de undă conțin constantele de viteză aparente. Analiza semnalului cinetic de absorbție a fost efectuată cu programele RATE și EYRING (Kulcsár et al., 2000). În cursul analizei (fitării) cu ajutorul programului RATE, modificările spectrale au fost transformate în variații de concentrații dependente de timp, ale intermediarilor, după următoarea ecuație:

$$\Delta A_{\lambda}(t) = \sum_i \Delta \varepsilon_{\lambda i} \cdot C_i(t) \quad (1)$$

unde $\Delta A_{\lambda}(t)$ este matricea de coloană a modificărilor spectrale măsurate la diferite lungimi de undă; $\varepsilon_{\lambda i}$ este matricea coeficienților de extincție (Gergely et al., 1997), și $C_i(t)$ este matricea de coloană formată din concentrația intermediarilor fotociclului.

Dependența de timp al concentrației intermediarilor poate fi calculată cu ajutorul următoarei ecuații:

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=i+1} (k_{ji} \cdot C_j - k_{ij} \cdot C_i) \quad (2)$$

unde k_{ij} și k_{ji} sunt constantele de viteză. Din aceste regresii s-au obținut parametrii cinetici ai fotociclului dat. Parametrii termodinamici au fost calculați cu ajutorul ecuațiilor următoare, utilizând programul EYRING:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^*}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^*}{R} + \ln \frac{k_B \cdot T}{h} \quad (2)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \cdot \Delta S^* \quad (3)$$

unde k este constanta de viteză, k_B - constanta lui Boltzmann, h - constanta lui Planck, T - temperatura absolută, R - constanta universală a gazelor, ΔH^* , ΔS^* și ΔG^* reprezintă valorile entalpiei, entropiei și energiei libere. Modelul a fost acceptat sau respins în funcție de valorile regresiei și de corectitudinea prezicerii comportamentului parametrilor cinetici la variația condițiilor externe, ca temperatura sau umiditatea.

II.2.3. Măsurarea semnalelor electrice

La măsurarea semnalului de răspuns electric al proteinelor retinale sunt necesare două cerințe:

- mecanism de declanșare sincronizată a funcționării
- probele să fie anizotrope din punct de vedere electric, așa cum sunt probele orientate.

Sistemul de măsurare este similar cu cel al sistemului de măsurători ale semnalelor de cinetică de absorbție (Fig.7).

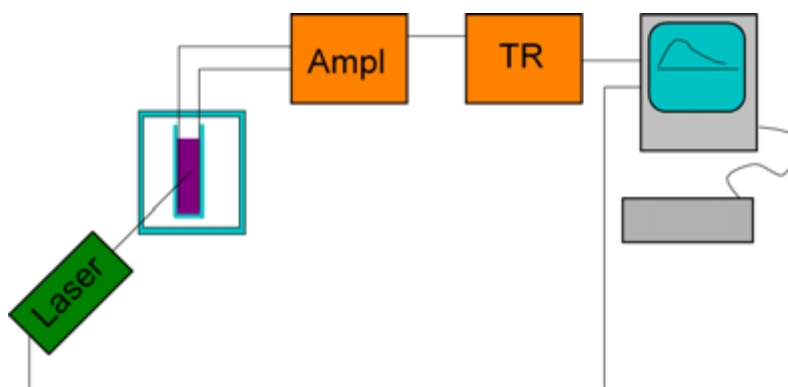


Fig. 7. Schema aparatului pentru măsurarea semnalului electric (de curent și tensiune)

Semnalele electrice au fost măsurate cu ajutorul aparatului descris mai sus (Gergely et al., 1993) cu mici modificări.

În cuva de cuarț lângă proba încorporată în gel a fost plasată o pereche de electrozi de platină. După excitarea cu laser au fost înregistrate deplasările de sarcină cu un înregistrator de semnale tranzitorii. Semnalele colectate au fost reprezentate într-o scală logaritmică de timp la fel ca în cazul măsurătorilor de cinetică de absorbție. Rezoluția de timp a sistemului a fost de ~100 ns. Integrala semnalului măsurat, care este proporțională cu tensiunea generată pe membrană de către deplasarea de sarcină din interiorul proteinei, poate fi redată ca suma concentrațiilor înmulțită cu electrogenicitatea lor. Electrogenicitatea intermediarilor este definită ca schimbarea momentului dipolar pe direcția perpendiculară membranei (Ludmann et al., 1998a). Electrogenicitatea este suma tuturor deplasărilor de sarcină, deplasări ce se datorează pe de o parte ionului transportat și pe de alta modificării poziției unor aminoacizi ai proteinei în timpul de viață al intermediarului. Acest tip de măsurători de semnal electric este insensibil la deplasarea de sarcină în electrolitul din afara membranei din cauza ecranării de către sarcinile libere existente.

Semnalele electrice au fost prelucrate folosind concentrația intermediarilor, calculată din măsurătorile de cinetica absorbției. Tensiunea generată prin membrană este proporțională cu integrala curentului măsurat și poate fi descrisă cu ecuația următoare:

$$U(t) = A \cdot \sum_i C_i(t) \cdot E_i \quad (4)$$

unde $U(t)$ este tensiunea aplicată, A este o constantă ce conține condițiile de măsurare, E_i este electrogenicitatea și $C_i(t)$ este concentrația intermediarului i .

II.3. Studiul fotociclului proteorodopsinei (PR) la pH scăzut

Studiile preliminare referitoare la proteorodopsină (PR), au demonstrat că datorită luminii se produce o fotoizomerizare în retinal și se desfășoară un fotociclu, în cursul căruia un proton este transportat prin membrană din celulă în partea extracelulară.

În cazul studiului fotociclului proteorodopsinei prin măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp și măsurători cinetice de absorbție, s-au preparat probe de gel de acrilamidă (Mowery et al., 1979). Membranele au fost purificate prin centrifugare în apă distilată. Măsurătorile semnalelor electrice au fost efectuate pe probe gelatinoase orientate (Dér et al., 1985). În timpul preparării probelor nu s-a utilizat sare, pentru a evita agregarea membranelor. În cazul fotociclului la pH ridicat (Váró et al. 2003), înainte de măsurători, probele gelatinoase au fost îmbibate în timpul nopții într-o soluție ce conținea 100 mM NaCl și 50 mM acid 3-ciclohexilamino-2-hidroxi-1-propansulfonic (CAPSO) la pH 9,5. Pentru măsurătorile la pH scăzut (Lakatos et al. 2003), gelurile au fost echilibrate cu o soluție care conținea 100 mM NaCl și 50 mM tampon de acid 2-N –morfolino-etansulfonic (MES) la pH=5.

II.3.1. Titrarea spectrofotometrică a PR.

Determinarea pK_a -ului PR native s-a efectuat cu ajutorul titrărilor spectrofotometrice în domeniul de pH 4.5-10. Cu creșterea pH-ului spectrul PR este deplasat de la 546 nm la 517 nm (Dioumaev et al., 2002). În spectrele diferențiale, după scăderea spectrului la pH 4.5 din celelalte, s-a observat un maxim de absorbție la 500 nm și un minim la 570 nm (datele nu sunt prezentate).

Deplasările spectrale relative și amplitudinile diferențiale conduc la aceeași curbă de titrare. În proba gelatinoasă proaspăt preparată, pK_a –ul aparent s-a găsit a fi 7.1 ± 0.1 , cu un coeficient Hill de 0.8 ± 0.05 protoni, în acord cu rezultatele obținute anterior de alți autori (Dioumaev et al., 2002). Dacă proba a fost ținută la temperatura camerei câteva zile, pK_a –ul măsurat s-a deplasat către valori de pH mai ridicate (Friedrich et al., 2002). Se presupune că aceasta este cauzată de oxidarea a uneia sau mai multor cisteine din proteină, acest efect lipsind în cazul mutantului cu cisteină triplă. Importanța mutațiilor cisteinei a fost prezentată anterior (Krebs et al., 2002). Pentru a evita deplasarea pK_a –ului, s-au folosit probe proaspăt preparate la toate măsurătorile.

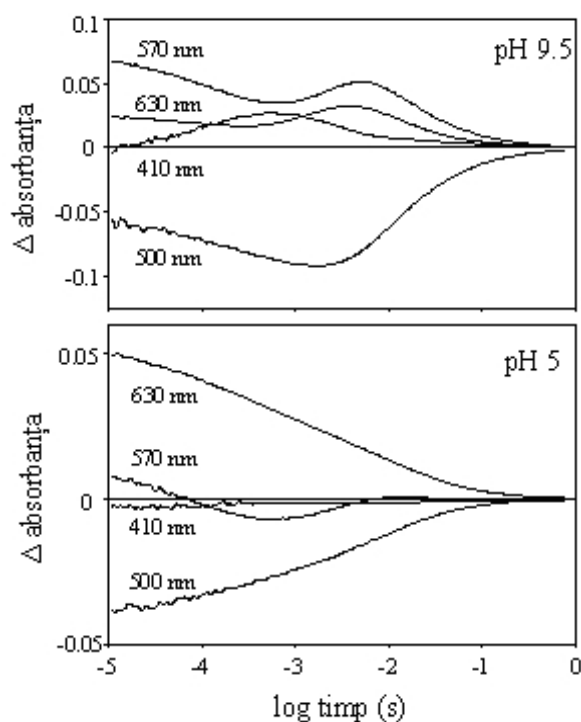


Fig.8. Semnalele de cinetica de absorbție măsurate la patru lungimi de undă caracteristice, la pH 5 și pH 9.5. (Condițiile de măsurare sunt identice cu cele din Fig.49.)

Măsurătorile de cinetică de absorbție s-au efectuat la câteva lungimi de undă caracteristice, atât la pH scăzut, cât și la pH ridicat (Fig.8.). Pentru a studia fotociclul la pH înalt, măsurătorile s-au efectuat la pH 9.5, cu peste 2 unități față de pK_a –ul Asp-97, acceptorul de protoni din PR (Dioumaev et al., 2002). La acest pH s-a putut observa un semnal de tip M. La pH 5 curbele de cinetica absorbției sunt total diferite. Nu apare absorbție pozitivă de tip M la 410 nm, ceea ce indică absența unui intermediar cu bază Schiff deprotonată (Dioumaev et al., 2002; Friedrich et al., 2002). Odată cu creșterea pH-ului, se poate observa o absorbție pozitivă mică deja la pH 5.5. În analizele următoare pentru fotociclul la pH scăzut, toate măsurătorile s-au efectuat la pH 5.

II.3.2. Spectrele intermediarilor

Spectrele intermediarilor din fotociclul la pH ridicat și scăzut s-au determinat prin măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp. La pH ridicat s-au măsurat 18, la pH scăzut 14 spectre diferite în intervale de timp între 200 ns și 50 ms, respectiv 200 ns și 100 ms, la timpi distanțați egal logaritmici. Fiecare spectru este media a 100 de măsurători. La început și după fiecare al șaselea spectru s-a înregistrat un spectru de control, cu o întârziere de 100 μ s. Procentul fotodistrugerii probei, estimat din aceste spectre de control este de cca. 20% la sfârșitul măsurătorilor. S-a putut elimina acest inconvenient prin multiplicarea fiecărui spectru cu factorul de decolorare. Spectrele diferențiale au fost filtrate de zgomot prin descompunere în valori singulare (SVD). Pentru a aprecia importanța componentelor spectrale, s-a luat în considerare ponderea spectrului respectiv și rezultatul autocorelării calculate din spectrul de bază și amplitudinea acestuia.

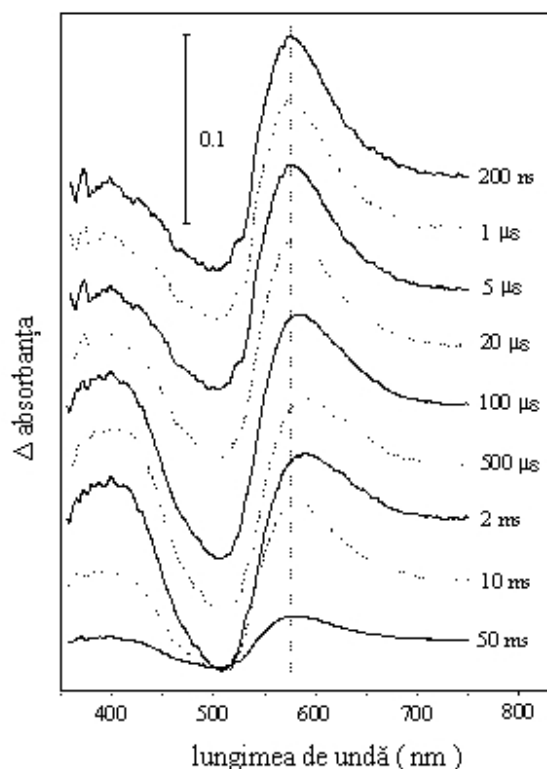


Fig.9. Spectrele diferențiale ale PR, prin filtru (filtrate), măsurate la intervalele de timp indicate la excitarea cu laser. Condiții de măsurare: 100 mM NaCl, 50 mM CAPSO, pH 9.5 și 20 °C.

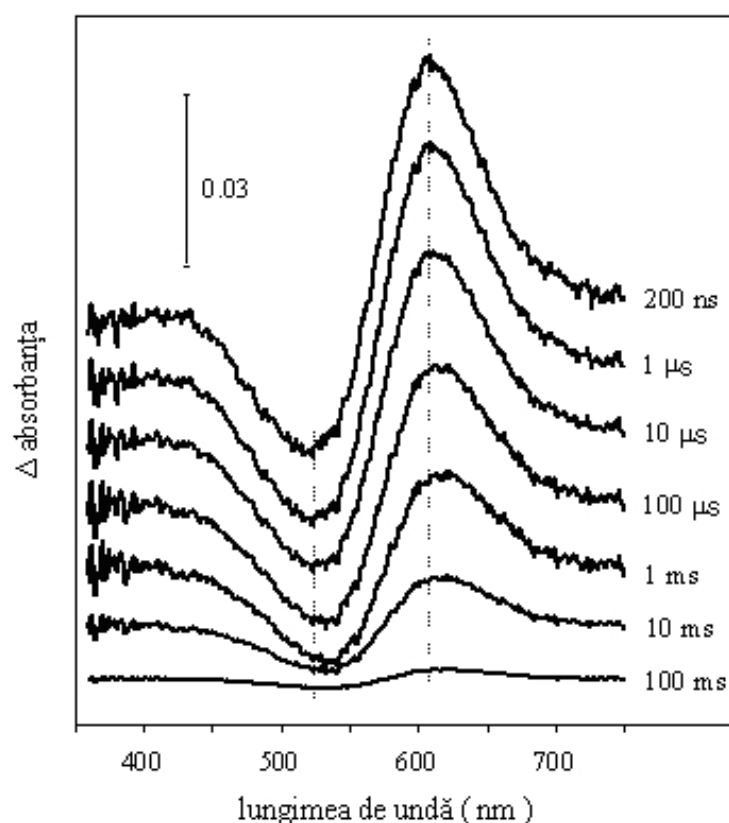


Fig.10. Spectrele diferențiale ale PR, filtrate SVD, măsurate la diferențele de timp indicate după excitarea cu laser. Condițiile de măsurare: 100 mM NaCl, 50 mM MES, pH 5 și 20 °C.

La pH 9.5 primele două spectre de bază sunt considerate diferite de zgomot. Acestea au produsele de autocorelare de 0.914 și respectiv 0.891 (al treilea are doar 0.0068) și ponderi de 2.42 și, respectiv, 0.63 (al treilea 0.12). Se poate concluziona faptul că în fotociclu există cel puțin doi intermediari diferiți din punct de vedere spectral. Deoarece spectrele de bază au formă (structură) complexă, iar amplitudinile corespunzătoare prezintă dependențe de timp complexe, se poate spune că există mai mult de două spectre intermediare. Spectrele diferențiale filtrate de zgomot, s-au reconstituit din cele două spectre de bază, și din factorii de amplitudine (Fig.9.)

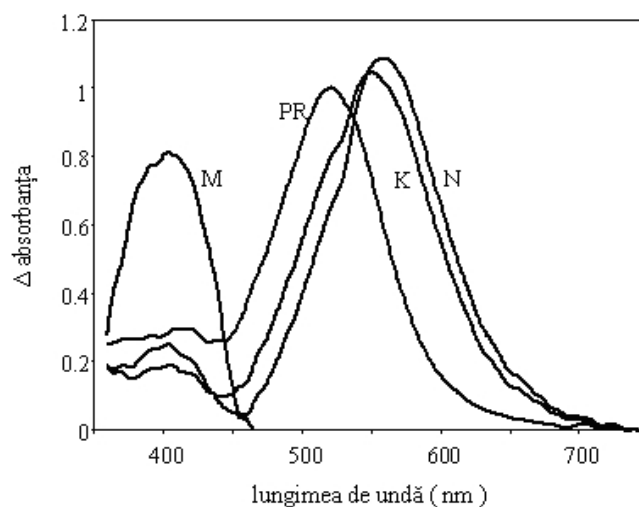


Fig.11. Spectrele intermediarilor fotocicului PR la pH ridicat, calculate din spectrele diferențiale date în Fig.9.

În cazul probelor la pH 5.0, primele două spectre au avut factori de greutate (ponderi) de 1.17 și 0.04 și produsul autocorelării de 0.948 și 0.129. Toate celelalte ponderi și produse de autocorelare au fost mai mici. Astfel, și în acest caz s-au considerat primele două spectre de bază ca fiind diferite de zgomot. Spectrele diferențiale au fost reconstituite din componentele SVD (Fig.10.). Forma complexă a spectrelor de bază și componentele de amplitudine sugerează, și în acest caz, prezența a mai mult de doi intermediari.

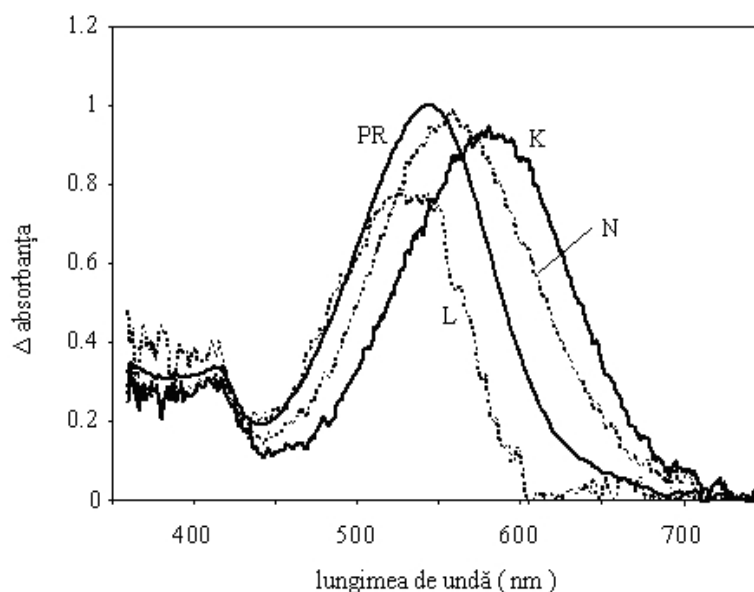


Fig.12. Spectrele intermediarilor fotocicului PR la pH scăzut calculate din spectrele diferențiale din Fig.10.

S-a efectuat o cercetare independentă de model asupra spectrelor intermediarilor fotociclului la pH ridicat și scăzut (Gergely et al., 1997). La pH ridicat, cu numai doi intermediari diferiți spectral s-a putut obține un singur maxim. Spectre cu formă acceptabilă (Zimányi and Lanyi, 1993) s-au obținut numai în cazul în care cercetările s-au efectuat pe trei intermediari. I-am denumit pe aceștia intermediari K, M și N, similar cu intermediarii BR, bazându-ne pe succesiunea lor în timp și pe poziția maximului de absorbție (Fig.11). Din calcule spectrale s-a estimat că spotul laser a excitat ~24% din PR. Crescând intensitatea luminii laser, mărimea semnalului a crescut liniar la peste 30%, ceea ce ne asigură de faptul că măsurătorile s-au efectuat în domeniul liniar al dependenței de lumină. Deoarece spectrele par să conțină ceva mai multă absorbție în partea roșie decât s-a așteptat (Fig. 11), am cercetat posibilitatea introducerii unui al patrulea component spectral, dar modelul potrivit pentru variațiile concentrației dependente de timp nu mai era corect.

În cazul probelor la pH scăzut, cercetările independente de model asupra spectrelor intermediarilor s-au efectuat printr-o metodă similară. Cu doi intermediari a fost imposibilă obținerea unor spectre cu un singur maxim. După introducerea celui de-al treilea intermediar, spectrele au luat formă acceptabilă (Fig.12).

II.3.3. Modelul fotociclului

La pH ridicat, creșterea multiexponențială a semnalului cinetic de absorbție la 410 nm și scăderea complexă a tuturor semnalelor cinetice de absorbție (Fig. 13A, *linii continue*), ne-au sugerat faptul că modelul trebuie să conțină mai mult decât trei intermediari. Diferitele modele au fost corelate cu ajutorul programului RATE. Coeficienții relativi de absorbție ai intermediarilor la lungimea de undă folosită s-au determinat din spectrele calculate (Fig.11). Cea mai bună corelare s-a obținut prin introducerea a două stări M, și un intermediar de tip PR, spectral inactiv (neutru), notat cu PR'. Varianta cu doi intermediari de tip N în loc de M, cu o tranziție spectral inactivă, a condus la o corelare mult mai scăzută. Cu toate că analizele globale ale semnalelor cineticii de absorbție indicau existența a șapte componente (Dioumaev et al., 2002), introducerea unor intermediari adiționali nu a îmbunătățit semnificativ corelația.

Folosind metoda descrisă mai sus (Ludmann et al., 1998b) s-au corelat o serie de fotocicluri secvențiale și paralele. Condiția de acceptare a modelului era de a se preta (a răspunde) corespunzător la toate condițiile de măsurare, alături de corelarea semnalului electric măsurat. Liniaritatea graficelor Eyring ($\ln k$ în funcție de $1/T$) s-a dovedit a fi criteriul cel mai stringent. Singurul model care a îndeplinit și toate cerințele a conținut următoarele succesiuni de reacții:



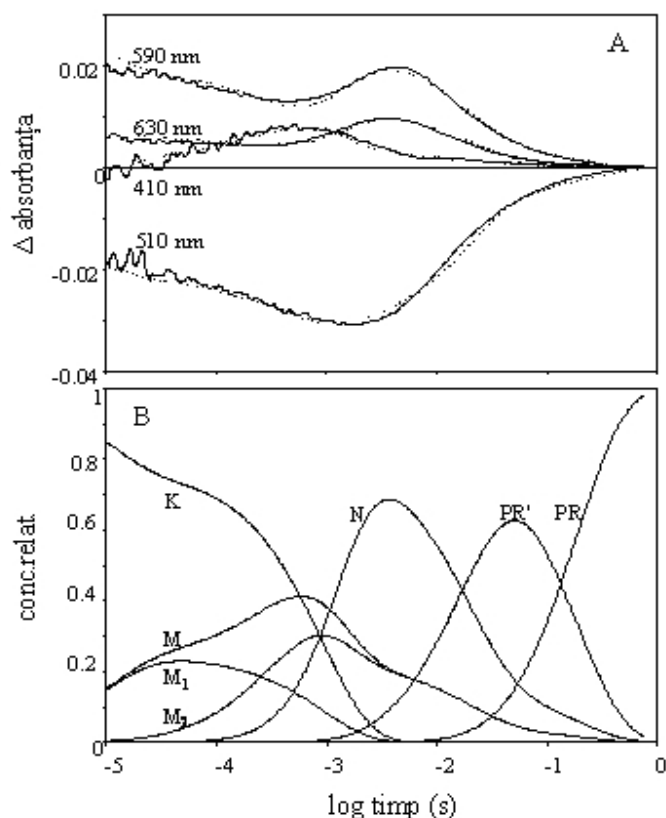


Fig.13. (A) Semnalele cineticii de absorbție dependente de timp, măsurate la lungimile de undă ale proteorodopsinei (linie continuă) și corelarea cu modelul descris în text (linii punctate). (B) Dependența de timp a concentrațiilor în modelul ajustat al fotocicluului. Condițiile de măsurare sunt identice cu cele din Fig.9.

Tranziția M_1 la M_2 și scăderea concentrației lui PR' sunt unidirecționale, toate celelalte tranziții fiind reversibile, rezultând un amestec de intermediari în fiecare moment (Fig.13B). Corelarea modelului la semnalele de cinetică de absorbție este redată în Fig.13 A (linii punctate). Scăderea lentă a concentrației intermediarului K și apariția rapidă (înaintată) a lui N conduce la o concentrație scăzută a intermediarului M.

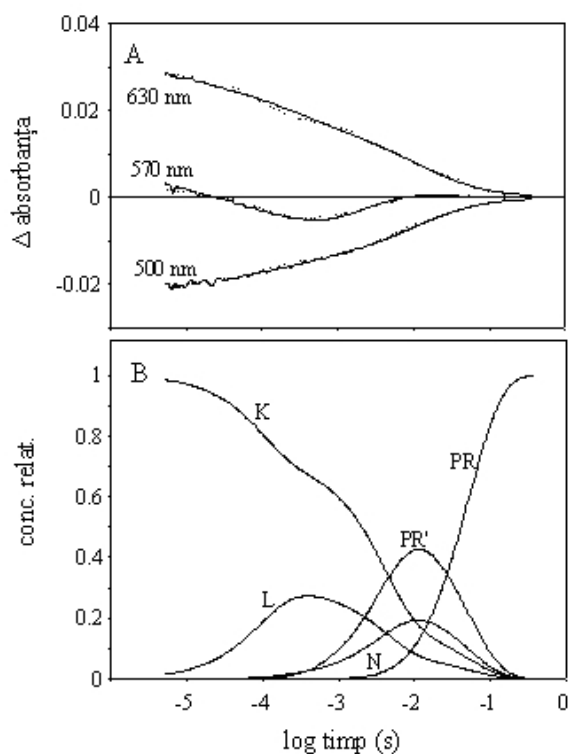


Fig.14. Semnalele de cinetică de absorbție măsurate la trei lungimi de undă (A, linii continue), corelația modelului cu secvența reacțiilor de echilibru (A, linii punctate) și dependența de timp a concentrațiilor intermediarilor din fotociclu corelat. Condițiile de măsurare sunt aceleași ca în cazul Fig. 10.

La pH scăzut scăderea multifazică a semnalului cinetic (Fig. 14A) a indicat existența unui intermediar spectral neutru (inactiv), PR', cu spectru similar cu cel al PR, ca și în cazul pH-ului ridicat. La semnalele cineticii de absorbție s-au corelat mai multe modele succesive și paralele, dar numai unul dintre modelele cu reacții secvențiale:



Acest model a dat rezultate bune (Fig.14B) la toate temperaturile de măsurare. Timpii de viață ai modelului ales, la 20°C, sunt prezentate în TABELUL 1.

TABELUL 1. Timpii de viață ai reacțiilor succesive, corelate cu semnalele cinetice ale proteorodopsinei. Condițiile de măsurare au fost: 100 mM NaCl, 50 mM MES, pH 5 și 20 °C.

Tranziția	K-L	L-K	L-N	N-L	N-PR'	PR'-N	PR'-PR
Timp de viață (ms)	0.32	0.14	1.52	5.53	0.12	0.26	27.7

II.3.4. Schema energetică a fotociclului

Graficele Eyring ale constantelor de viteză ($\ln k$ în funcție de $1/T$), calculate din modelul ce conține reacții de echilibru succesive, au fost liniare într-un domeniu de eroare de 2% . În cazul modelelor ce conțineau reacții în lanț ramificat ori reacții paralele, deviația de la liniaritate ale graficelor Eyring în cazul câtorva constante de reacții a fost mai mare (a depășit) de 20%, deci aceste modele au fost respinse. Parametrii termodinamici, calculați din aceste grafice, au dat naștere schemei energetice a fotociclului (Fig. 15). Tranziția M_1 la M_2 este unidirecțională, ceea ce lasă nivelul energetic al M_2 nedeterminat. Acesta este indicat prin linie punctată (Fig15) iar nivelul lui M_2 este luat arbitrar având aceeași valoare ca nivelul lui K. Energiile libere ale lui K și M, sau ale lui M_2 , N și PR' au aproape aceleași valori, ceea ce conduce la un echilibru (aproape de echilibru) între acești intermediari.

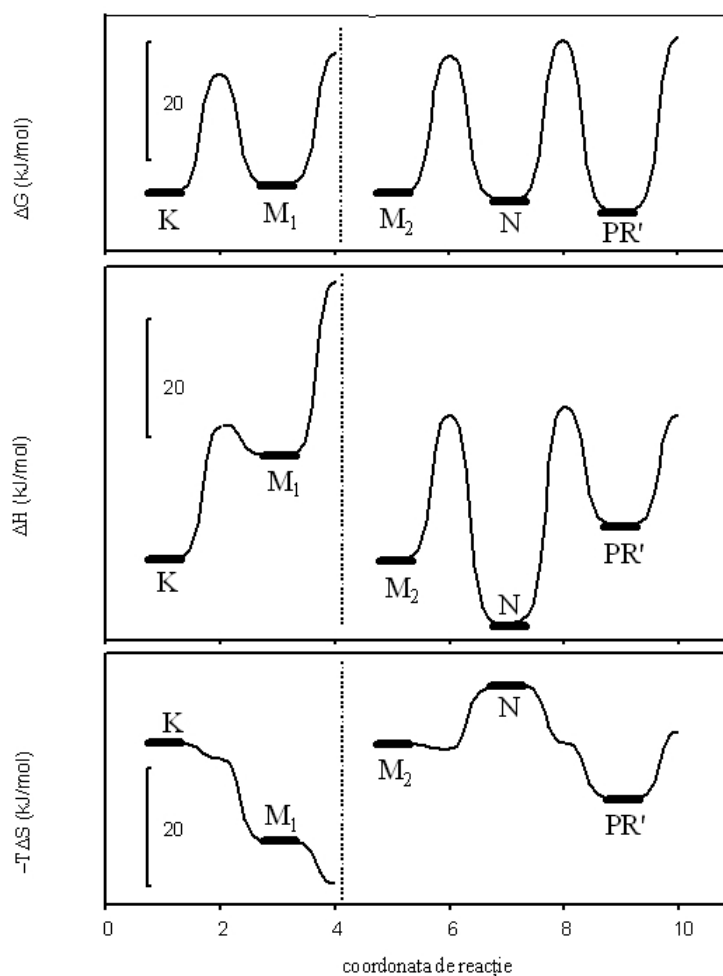


Fig. 15. Diagrama energiei libere, entalpiei și entropiei în fotociclul PR la pH ridicat.

Energiile libere ale intermediarilor K, L, N și PR' au aproape aceleași valori, deci aceștia prezintă un nivel aproape de echilibru. Diagrama entropiei și entalpiei arată că fotociclul este în mare parte condus de entropie.

II.3.5. Deplasarea de sarcină în PR

Deplasările de sarcină în interiorul proteinei pot fi determinate cu ajutorul probelor orientate, așezate în gel (Gergely et al., 1993; Ludmann et al. 1998a). Deoarece nu avem informații asupra formei și momentului dipolar permanent al fragmentelor de membrană conținând PR, orientarea acestora nu s-a putut corela (compara) cu aceea a membranelor purpurii care conțin BR. Câmpul electric extern, aplicat în timpul polimerizării probei de gel a produs o orientare adecvată a membranei și s-au putut măsura semnale electrice bine definite (Fig.16).

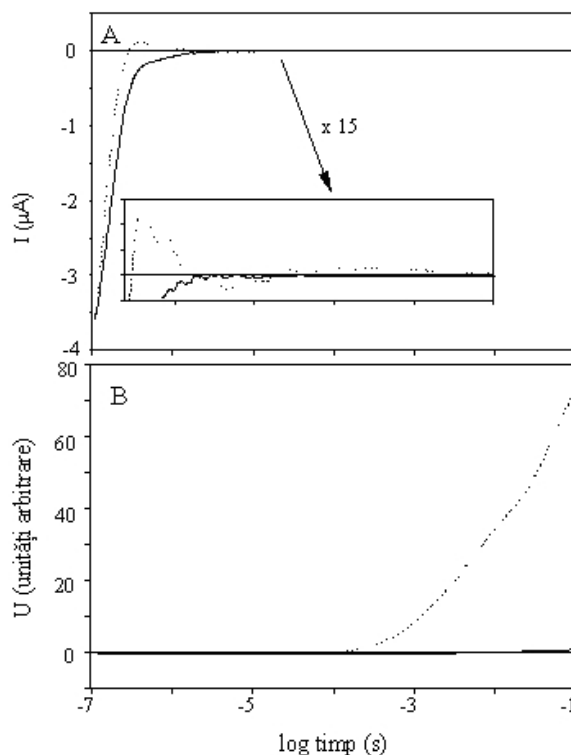


Fig. 16. Semnalele intensității de curent (A) și a tensiunii (B) măsurate în probe de gel orientat la pH 5 (linii continue) și la pH 9.5 (linii punctate).

II.4. Cinetica fotociclurilor bacteriorodopsinei (BR), halorodopsinei pharaonis (pHR) și proteorodopsinei deuterate

II.4.1. Materiale și condiții de măsurare

BR a fost preparată din *Halobacterium salinarum* (specia L33) (J. K. Lanyi and G. Váró, 1995; J. K. Lanyi 2004), pHR a fost preparată din *Natronobacterium pharaonis* (G. Váró et al., 1995), PR naturală a fost preparată din *Escherichia coli* (specia UT5600) (Beja et al., 2000; Dioumaev et al., 2002). Celulele au fost distruse cu ajutorul unei prese de tip Aminco French la 12 MPa.

Măsurătorile au fost efectuate pe membrane încorporate în gel de poliacrilamidă (G. Váró et al., 1995; P. C. Mowery et al., 1979) pe probe având densitatea optică în de 0.5 la 570 nm. Pentru a asigura un bun schimb a H₂O cu D₂O și aceleași condiții de măsurare, înaintea măsurătorilor toate

probele au fost uscate cu P_2O_5 și reumezite cu soluția de sare corespunzătoare. Soluția de sare a fost proaspăt preparată din reactiv uscat ($NaCl$, $NaNO_3$ sau NaN_3 , după necesități) și H_2O sau D_2O . pH-ul a fost ajustat cu HCl , DCl , $NaOH$ și respectiv, cu $NaOD$. pD-ul soluției de apă grea a fost luat cu 0.4 unități mai mare decât pH-ul măsurat (L. S. Brown et al., 2000). În probe similare, comparate în apă și apă grea, pH-ul și pD-ul au fost egalizate, rezultând aceeași concentrație de protoni și deuteriu. Deoarece nu s-a folosit nici un tampon, pH(pD)-ul soluției a fost verificat înainte și după măsurători și numai acele semnale au fost luate în considerare unde schimbarea de pH(pD) a fost sub 0.2 unități. Nu au fost observate modificări spectrale între perechile de probe (pereche H_2O/D_2O ajustat cu HCl/DCl) preparate în acest mod. În timpul măsurătorilor, probele au fost ținute în cuve de 4 mm x 10 mm la temperaturi controlate.

II.4.2. Rezultate și discuții

La pH neutru BR prezintă un efect izotopic cinetic slab în intervalul de timp de câteva μs , pe când la pH ridicat partea încetinită a fotociclului nu este afectată de schimbul cu deuteriu. La pH neutru, în domeniul de timp de μs apare numai tranziția K la L și se acumulează o cantitate mare de intermediar L. La pH înalt, tranziția L-M devine mult mai rapidă și atenuează acumularea intermediarului L (Fig. 17, A). Tranziția K-L este o rearanjare locală a lanțurilor de aminoacizi.

Această tranziție nu necesită rearanjarea pe o scală mare a legăturilor de H și/sau mișcarea protonului (L. Keszthelyi and P. Ormos, 1980; K. Ludmann et al., 1998) și prezintă, de aceea, un efect izotopic moderat, așa cum s-a găsit anterior (L. Keszthelyi and P. Ormos, 1980; A. Fahr et al. 1981; R. Korenstein et al. 1976). Tranziția K-L devine de 1.3 ori mai lentă în timpul interschimbului proton-deuteriu.

Toate tranzițiile următoare au fost puternic afectate de această perturbație, în concordanță cu primele observații (A. Fahr et al. 1981; R. Korenstein et al. 1976; L. S. Brown et al. 2000), sugerând implicarea protonului în toate etapele fotociclului. Cea mai mare schimbare este în tranziția L-M, care este legată de deprotonarea bazei Schiff și etapa de eliberare a protonului.

Această etapă devine cu un ordin de mărime mai înceată prin schimbarea protonului cu deuteriu. Studiile cristalografice arată că de-a lungul acestei etape are loc restructurarea legăturii de H (H. J. Sass et al. 2000; J. K. Lanyi and B. Schobert, 2003; L. S. Brown et al. 2000). Când la pH înalt această tranziție devine dominantă în domeniul de timp de μs (Fig. 17, A), partea de început a fotociclului devine mult mai sensibilă la interschimbări de proton-deuteron, iar tranziția devine de 5 ori mai lentă.

La pH ridicat de 10.5 revenirea fotociclului la starea de bază devine mult mai lentă și mai puțin sensibilă la schimbul izotopic.

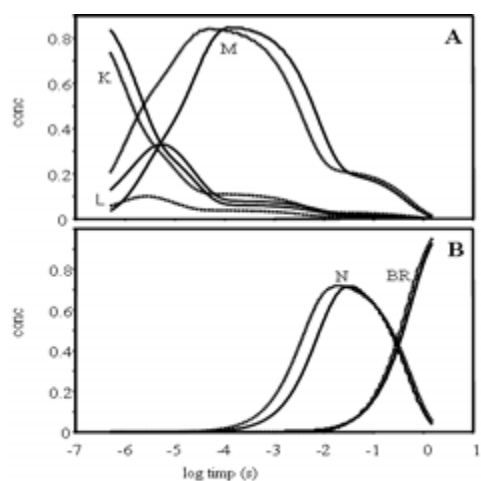


Fig.17. Evoluția în timp a intermediarilor fotocicluului BR în H_2O (linii punctate) și D_2O (linii continue) la pH (pD) 10.5.

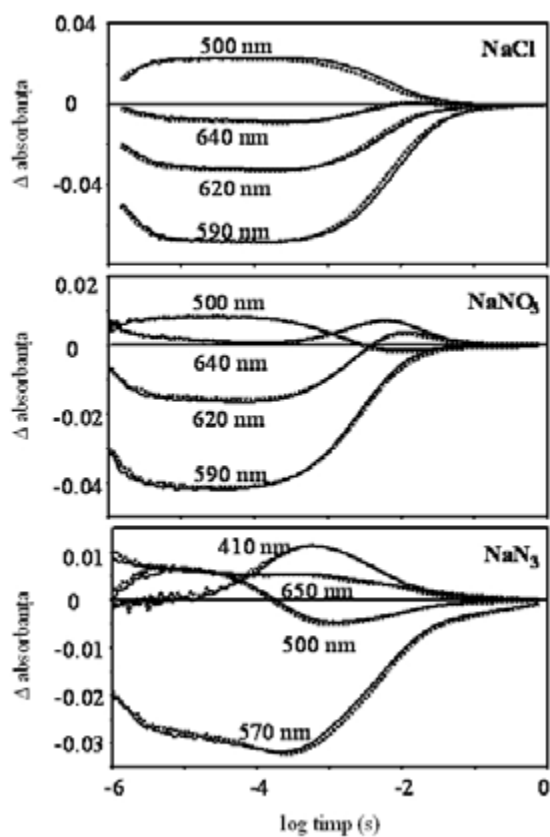


Fig.18. Semnalele cinetice de absorbție măsurate în cazul pHR la patru lungimi de undă. Condițiile de măsurare: 1 M NaCl, 200 mM NaNO₃ și NaN₃ în H_2O (linii punctate) și D_2O (linii continue) la pH (pD) 6.

Din analiza modelului reiese că la pH neutru succesiunea destul de complicată de la M la BR - ce implică intermediarii N și O – devine simplă la pH ridicat, având doar intermediarul N (Fig.17 B). Tranziția M-N, reprotonarea bazei Schiff, este dependentă izotopic la ambele valori de pH, devenind de cca. 2 ori mai lentă în D₂O.

Efectele schimbului izotopic hidrogen-deuteriu au fost studiate pe pHR în trei condiții de transport ionic diferite. Este important de notat că nu s-a observat nici un efect izotopic în niciunul din cazurile ionilor transportați. În cazul clorurii s-a putut observa o ușoară încetinire a fotociclului (Fig. 18, NaCl), dar în cazul transportului de nitrat, pe câteva curbe se manifestă un efect invers (Fig. 18, NaNO₃). Acesta înseamnă, probabil, că schimbările mici s-ar putea datora erorilor de măsurare. Bazându-ne pe aceste rezultate se poate trage o concluzie generală în cazul pHR și anume faptul că în timpul transportului ionic nu au loc mișcări de proton majore și/sau rearanjări ale legăturii de hidrogen în proteină sau în partea proteinei care este accesibilă schimbului proton-deuteriu.

III. Concluzii generale

- Utilizarea cu succes a BR ca material de înregistrare holografic dinamic pentru procesarea optică a motivat extinderea cercetării științifice în domeniul aplicațiilor proteinelor retinale.
- Există mai mult de 200 de patente și proiecte pe aplicații ale BR și, din această cauză, se pot obține progrese importante și în studiul altor proteine ce conțin analogi de retinali și mutații BR în vederea obținerii unui fotomaterial cu parametri doriți.
- Cerințele principale la folosirea BR-ului sau a mutațiilor în aplicațiile tehnologice se referă, în primul rând, la înțelegerea mecanismelor fotociclului în diferite condiții. Aceasta poate fi realizată prin diverse metode.
- Există alte două proteine retinale de tipul BR care, de asemenea, transportă ioni prin membrane. Una din acestea este halorodopsina (HR) care pompează ionul de clor (dar în prezența azidei poate fi transformată într-o pompă de protoni) și o altă proteină retinală, proteorodopsina (PR) care a fost descoperită recent (un omolog BR din bacterioplancton marini) este, de asemenea, o pompă protonică. Aceste două proteine au fost descoperite mult după BR și de aceea funcționarea lor nu este bine cunoscută, totuși și ele pot candida cu succes în aplicații tehnice.
- Pentru a studia proprietățile cinetice ale proteinelor retinale, s-au efectuat măsurători spectroscopice cu rezoluție de timp, de cinetica absorbției și de semnal electric. Măsurătorile s-au efectuat în membrane fixate în gel de acrilamidă. Pentru măsurătorile de semnal electric s-au preparat probe orientate. Analiza semnalelor s-a realizat computerizat în Matlab, cu ajutorul unei aplicații create la Institutul de Biofizică din Szeged, Ungaria.
- Principalele rezultate ale măsurătorilor sunt:

a) În cazul fotociclului la pH scăzut al PR :

Cu ajutorul măsurătorilor de spectroscopie cu rezoluție de timp și cinetică de absorbție s-au identificat trei intermediari spectral diferiți K, L și N, și un intermediar spectral inactiv, PR', în fotociclul PR. S-a arătat că semnalul de absorbție de la 410 nm, reprezentând intermediarul de tip M, ce conține baza Schiff deprotonată, nu se acumulează.

S-a determinat modelul fotociclului:

- $$K \Leftrightarrow L \Leftrightarrow N \Leftrightarrow PR' \Rightarrow PR.$$

S-a demonstrat că toate reacțiile dintre intermediari sunt de echilibru (aproape de echilibru), exceptând ultima tranziție PR' la PR, când proteina ajunge la starea inițială, neexcitată, printr-o reacție cvasi-unidirecțională.

Măsurătorile semnalului electric arată că deși în interiorul proteinei au loc mișcări de sarcină detectabile, dislocația lor netă este zero, indicând faptul că la pH scăzut nu are loc transport de particule încărcate prin membrană, contrar rezultatelor comunicate anterior.

b) În cazul cineticii fotociclurilor BR, pHR și PR deuterate:

S-au efectuat măsurători cinetice de absorbție pentru a studia etapele dependente de proton ale procesului de transport al fotociclului PR comparativ cu cel al BR în H₂O și D₂O. Pentru BR la pH normal toți pașii fotociclului au prezentat un puternic efect izotopic. Într-o manieră similară PR atât la pH normal, cât și la pH scăzut, prezintă un important efect de deuterizare. Efectele măsurate pe PR au fost comparabile cu cele măsurate pe BR. Structura și funcționarea proteorodopsinei este similară cu cea a bacteriorodopsinei.

În cazul HR în toate condițiile de transport al Cl⁻, NO₃⁻ și H⁺ fotociclul nu a fost afectat semnificativ de schimbul cu deuteriu. Această constatare ne-a condus la presupunerea că nu protonii, ci ionii de hidroxil, OH⁻, sunt transportați în timpul fotociclului pHR în prezența azidei. HR pompatoare de Cl⁻ are un intermediar asemănător cu M și transportă OH⁻ dacă soluția conține ioni de azidă.

- Aceste proteine retinale pot fi utilizate cu succes în nanotehnologie.

IV. Bibliografie

1. Ames, J.B. and R.A. Mathies. 1990. The role of back-reactions and proton uptake during the N⁺→O transition in bacteriorhodopsin's photocycle: A kinetic resonance Raman study. *Biochemistry* 29:7181-7190.
2. Balashov, S.P., R. Govindjee, M. Kono, E.P. Lukashev, T.G. Ebrey, Y. Feng, R.K. Crouch, and D.R. Menick. 1992. Arg82ala mutant of bacteriorhodopsin expressed in *H. halobium*: drastic decrease in the rate of proton release and effect on dark adaptation. In *Structures and Functions of Retinal Proteins*. J.L. Rigaud, editor. John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge. 111-4.
3. Bálint Z., A. G. Végh, A. Popescu, M. Dima, C. Ganea and Gy. Váró. Direct observation of protein motion during the photochemical reaction cycle of bacteriorhodopsin. *Langmuir*. **23** (2007): 7225-7228.
4. Bamberg, E., P. Hegemann, and D. Oesterhelt. 1984. Reconstitution of the light-driven electrogenic ion pump halorhodopsin into black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 773:53-60.
5. Batori-Tartsi Z., K. Ludmann, Gy. Váró, The effect of chemical additives on bacteriorhodopsin photocycle, *J. Photochem. Photobiol. B*. **49** (1999) 192-197.
6. Beja O., E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, and E. F. DeLong, Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*, **411** (2001) 786-789.
7. Blanck, A. and D. Oesterhelt. 1987. The halorhodopsin gene II. Sequence, primary structure of halorhodopsin, and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO. J.* 6:265-273.
8. Dancsházy, Z. and B. Karvaly. 1976. Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane; a photoelectric-spectroscopic study. *FEBS. Lett.* 72:136-138.
9. Dencher, N.A., G. Papadopoulos, D. Dresselhaus, and G. Büldt. 1990. Light- and dark-adapted bacteriorhodopsin, a time-resolved neutron diffraction study. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Membr.* 1026:51-56.
10. Dér, A., P. Hargittai, and J. Simon. 1985. Time-resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membranes immobilized in gel. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 10(5-6):295-300.
11. Dér, A., R. Tóth-Boconádi, and L. Keszthelyi. 1989. Bacteriorhodopsin as a possible chloride pump. *FEBS Lett.* 259:24-26.
12. Dioumaev, A.K., J.M. Wang, Z. Bálint, G. Váró, and J.K. Lanyi. 2003. Proton transport by proteorhodopsin requires that the retinal Schiff-base counter-ion Asp-97 be anionic. *Biochemistry* 42:6582-6587.
13. Duschl A., J. K. Lanyi, and L. Zimányi, Properties and photochemistry of a halorhodopsin from the haloalkalophile, *Natronobacterium pharaonis*, *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 1261-1267.
14. Dyukova T., B. Robertson, H. Weetall, Optical and electrical characterization of bacteriorhodopsin films, *BioSystems* **41** (1997) 91-98.
15. Friedrich, T., S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard, and E. Bamberg. 2002. Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality. *J. Mol. Biol.* 321:821-838.
16. Gergely, C., L. Zimányi, and G. Váró. 1997. Bacteriorhodopsin intermediate spectra determined over a wide pH range. *J. Phys. Chem. B* 101:9390-9395.
17. Gergely, C., C. Ganea, G.I. Groma, and G. Váró. 1993. Study of the photocycle and charge motions of the bacteriorhodopsin mutant D96N. *Biophys. J.* 65:2478-2483.
18. Gerwert, K. Molecular reaction mechanism of photosynthetic proteins as determined by FTIR-spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1101:147-153, 1992.

19. Gerwert, K. (1988). Intramolekulare Proteindynamik untersucht mit zeitaufgelöster Fourier Transform Infrarot-Differenzspektroskopie. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 92,978.
20. Gerwert, K., B. Hess, J. Soppa, and D. Oesterhelt. Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:4943-4947, 1989.
21. Gerwert, K., G. Souvignier, and B. Hess. 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, 1990.
22. Golub, G. and W. Kahan. 1992. Calculating the singular values and pseudo-inverse of a matrix. *SIAM J.Num.Anal.* 2:205-224.
23. Groma G.I., F. Ráksi, G. Szabó, Gy. Váró, Picosecond and nanosecond components in bacteriorhodopsin light-induced electric response signal, *Biophys. J.* **54** (1988) 77-80.
24. Groma G.I., G. Szabó, Gy. Váró, Direct measurement of picosecond charge separation in bacteriorhodopsin, *Nature*, **308** (1984) 557-558.
25. Groma, G.I., J. Hebling, C. Ludwig, and J. Kuhl. 1995. Charge displacement in bacteriorhodopsin during the forward and reverse bR-K phototransition. *Biophys.J.* 69:2060-2065.
26. Groma, G.I., L. Kelemen, A. Kulcsár, M. Lakatos, and G. Váró. 2001. Photocycle of dried acid purple form of bacteriorhodopsin. *Biophys.J.* 81:3432-3441.
27. Imam H., L.R. Lindvold, P.S. Ramanujam, Photoanisotropic incoherent-to-coherent converter using a bacteriorhodopsin thin film, *Optics Letters*, **20(2)**, (1995) 225-227
28. Javidi B., J.L. Horner, Single SLM joint transform optical correlator, *Appl. Opt.* **28(5)** (1989) 1027-1032.
29. Joseph J., F.J. Aranda, D.V. Rao, J.A. Akkara, M. Nakashima, Optical Fourier processing using photoinduced dichroism in a bacteriorhodopsin film, *Optics Letters*, **21(18)**, (1996) 1499-1501
30. Keszthelyi, L. 1980. Orientation of membrane fragments by electric field. *Biochim.Biophys.Acta* 598:429-436.
31. Keszthelyi, L. and P. Ormos. 1980. Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 109:189-193.
32. Khorana, H.G., G.E. Gerber, W.C. Herlihy, C.P. Gray, R.J. Anderegg, K. Nihei, and K. Biemann. 1979. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:5046-5050.
33. Kodate K., A. Hashimoto and R. Thapliya, Binary zone-plate array for a parallel joint transform correlator applied to face recognition, *Appl. Opt.* **38(14)** (1999) 3060-3067.
34. Kolbe,M., H.Besir, L.O.Essen, and D.Oesterhelt. 2000. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* 288:1390-1396.
35. Konishi,T. and L.Packer. 1976. Light-dark conformational states in bacteriorhodopsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:1437-1442.
36. Korchemskaya E.Y., D.A. Stepanchikov, A.B. Druzhko, T.V. Dyukova, Mechanism of Nonlinear Photoinduced Anisotropy in Bacteriorhodopsin and its Derivatives, *Journal of Biological Physic* **24** (1999) 201-215.
37. Kulcsár, A., G.I. Groma, J.K. Lanyi, and G. Váró. 2000. Characterization of the proton transporting photocycle of pharaonis halorhodopsin. *Biophys.J.* 79:2705-2713.
38. Lakatos, M., G.I. Groma, C. Ganea, J.K. Lanyi, and G. Váró. 2002. Characterization of the azide-dependent bacteriorhodopsin-like photocycle of *Salinarum* halorhodopsin. *Biophys.J.* 82:1687-1695.
39. Lakatos,M., J.K.Lanyi, **J.Szakács**, and G.Váró. 2003. The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH. *Biophys. J.* 84:3252-3256.

40. Lányi J. K., A. Duschl, G. W. Hatfield, K. M. May, and D. Oesterhelt, The primary structure of a halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: structural, functional and evolutionary implications for bacterial rhodopsins and halorhodopsins, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 1253-1260.
41. Lányi J. K., Bacteriorhodopsin, *Annual Review of Physiology*, 66 (2004) 665-688.
42. Lányi J.K., Gy. Váró, The Photocycles of bacteriorhodopsin, *Israel Journal of Chemistry*, 35 (1995) 365-385.
43. Ludmann K., Cs. Gergely, and Gy. Váró: Kinetic and Thermodynamic Study of the Bacteriorhodopsin Photocycle over a Wide pH Range, *Biophys. J.* 1998a. 75:3110-3119
44. Ludmann K., C. Ganea, Gy. Váró, Back photoreaction from intermediate M of bacteriorhodopsin photocycle, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 49 (1999). 23-28.
45. Ludmann K., Cs. Gergely, A. Dér, and Gy. Váró: Electric Signals during the Bacteriorhodopsin Photocycle, Determined over a Wide pH Range. *Biophys. J.* 1998b. 75:3120-3126
46. Luecke H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, and J. K. Lanyi. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 291 (4):899-911, 1999.
47. Muller, D.J., M. Kessler, F. Oesterhelt, C. Moller, D. Oesterhelt, H. Gaub. 2002. Stability of bacteriorhodopsin alpha-helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophys.J.* 83:3578-3588.
48. Nathans,J., D.Thomas, and D.S.Hogness. 1986. Molecular-genetics of human color-vision: The genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232:193-202.
49. Needleman,R., M.Chang, B.Ni, G.Váró, J.Fornes, S.H.White, and J.K.Lanyi. 1991. Properties of asp212-asn bacteriorhodopsin suggest that asp212 and asp85 both participate in a counterion and proton acceptor complex near the Schiff base. *J. Biol. Chem.* 266:11478-11484.
50. Oesterhelt D., C. Brauchle, N. Hampp, Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing , *Quarterly Review of Biophysics*. 24(4) (1991) 425-478.
51. Oesterhelt, D. and W. Stoerkenius. 1974. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods.Enzymol.* 31:667-678.
52. Ormos, P., L. Reinisch, and L. Keszthelyi. 1983. Fast electric response signals in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim.Biophys.Acta* 722:471-479.
53. Ormos, P., Z. Dancsházy, and L. Keszthelyi. 1980. Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys.J.* 31:207-213.
54. Otomo,J., H.Tomioka, and H.Sasabe. 1992. Properties and the primary structure of a new halorhodopsin from halobacterial strain mex. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Membr.* 1112:7-13.
55. Ovchinnikov, Yu.A., N.G. Abdulaev, M.Y. Feigina, A.V. Kiselev, and N.A. Lobanov. 1979. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. *FEBS Lett.* 100:219-224.
56. Palmer, R.A, Manning, C.J., Chao, J.L., Noda, I., Dorwrey, A.E., and Marcott, C. (1991). Application of step-scan interferometry to two-dimensional Fourier transform infrared (2D-FT-IR) correlation spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 45, 12.
57. Soppa,J., J.Duschl, and D.Oesterhelt. 1993. Bacterioopsin, haloopsin, and sensory opsin I of the halobacterial isolate *Halobacterium* sp. strain SG1: Three new members of a growing family. *J. Bacteriol.* 175:2720-2726.
58. Souvignier, G. and K. Gerwert. 1992. Proton uptake mechanism of bacteriorhodopsin as determined by time-resolved stroboscopic FTIR spectroscopy. *Biophys.J.* 63:1393-1405.
59. Spudich,J.L., C.S.Yang, Jung K.H., and E.N.Spudich. 2000. Retinylidene proteins: structures and functions form archea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 365-392.
60. Subramaniam S. and R. Henderson. Electron crystallography of bacteriorhodopsin with millisecond time resolution. *J.Struct.Biol.* 128 (1):19-25, 1999.

61. Subramaniam, S. 1999. The structure of bacteriorhodopsin: an emerging consensus. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 9:462-468.
62. Szakács J., M. Lakatos, C. Ganea and Gy. Váró: Kinetic isotope effects in the photochemical reaction cycle of ion transporting retinal proteins, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79 (2005) 145-150.
63. Thoma R., N. Hampp, Adaptive bacteriorhodopsin-based holographic correlator for speed measurement of randomly moving three-dimensional objects, *Optics Letters* **19**(17) (1994) 1364-66.
64. Tokaji,Z., A.Dér, and L.Keszthelyi. 1997. N-like intermediate in the photocycle of the acid purple form of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 405:125-127.
65. Tőkés Sz., L. Orzó, Cs. Rekeczky, Á. Zarándy, T. Roska, An optical CNN implementation with stored programmability, Proc. IEEE International Symposium on Circuits and Systems, May 2000, Geneva, pp. II-136 – II-139.
66. Trissl, H.W. and M. Montal. 1977. Electrical demonstration of rapid light-induced conformational changes in bacteriorhodopsin. *Nature* 266:655-657.
67. Uhmman, W., Becker, A., Taran, C., and Siebert, F. (1991). Timeresolved FT-IR absorption spectroscopy using a step-scan interferometer. *Appl. Spectrosc.* 45, 390.
68. Váró G. L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Binding of calcium ions to bacteriorhodopsin. *Biophys.J.* 76:3219-3226, 1999.
69. Váró G., Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bio-Energetics*, 1460 (2000) 220-229.
70. Váró Gy., L. Keszthelyi, Arrhenius parameters of the bacteriorhodopsin photocycle in dried oriented samples, *Biophys. J.* **47** (1985) 243-246.
71. Váró, G. 1981. Dried oriented purple membrane samples. *Acta Biol.Acad.Sci.Hung.* 32:301-310.
72. Váró,G. and J.K.Lanyi. 1989. Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH. *Biophys. J.* 56:1143-1151.
73. Váró,G. and J.K.Lanyi. 1990. Pathways of the rise and decay of the M photointermediate of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 29:2241-2250.
74. Váró,G., L.S.Brown, M.Lakatos, and J.K.Lanyi. 2003. Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biophys. J.* 84:1202-1207.
75. Váró,G., L.S.Brown, R.Needleman, and J.K.Lanyi. 1996. Proton transport by Halorhodopsin. *Biochemistry* 35:6604-6611.
76. Váró,G., L.Zimányi, X.Fan, L.Sun, R.Needleman, and J.K.Lanyi. 1995. Photocycle of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*. *Biophys. J.* 68:2062-2072.
77. Volperdinger M., N. Hampp, Bacteriorhodopsin variants as versatile media in optical processing, *Biophys. Chem.* **56** (1995) 189-192.
78. Vsevolodov N.N., T.V. Dyukova, Retinal-protein complexes as optoelectronic components, *Trends in Biotechnology* **12** (1994) 81-88.
79. Vsevolodov Nikolai, Biomolecular Electronics: An introduction via Photosensitive Proteins Birkhauser Boston, 1998
80. Yu F.T.S., Q.W. Song, Y.S. Cheng, D.A. Gregory, Comparison of detection efficiencies for VanderLugt and joint transform correlators, *Appl. Opt.* **29** (1990) 225-232
81. Zeisel D., N. Hampp: Spectral Relation of Light-induced Refractive Index and Absorption Changes in Bacteriorhodopsin Films Containing Wild type BR_{WT} and the Variant BR_{D96N}. *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 7788-7792.

82. Zimányi L. and J.K. Lanyi. 1993. Deriving the intermediate spectra and photocycle kinetics from time-resolved difference spectra of bacteriorhodopsin. The simpler case of the recombinant D96N protein. *Biophys.J.* 64:240-251.
83. Zimányi L., L. Keszthelyi, and J.K. Lanyi. 1989. Transient spectroscopy of bacterial rhodopsins with optical multichannel analyser. 1. Comparison of the photocycles of bacteriorhodopsin and halorhodopsin. *Biochemistry* 28:5165-5172.