

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



**“USO DE LA ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA EN LA
DETERMINACIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA RODOPSINA
BOVINA”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Br. Sheerly Rodríguez, para
optar al título de Licenciada en
Química

Caracas, Mayo, 2011

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

**“USO DE LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN LA
DETERMINACIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA RODOPSINA
BOVINA”**

Presentado por la Br. Sheerly Rodríguez, C.I 16.412.024, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química

Prof. Edgardo Leal
(Director)

Dr. José Bubis
(Director)

Prof. Carlos Márquez
(Jurado)

Prof. Julio Herrera
(Jurado)

Profesor Edgardo Leal, investigador de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y Dr. José Bubis, Investigador del Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Simón Bolívar.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“USO DE LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN LA
DETERMINACIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA RODOPSINA
BOVINA”**

Ha sido revisado por nosotros y el mismo cumple con los requisitos establecidos en las normativas internas de la CTEG de la Escuela de Química y por ello autorizamos su presentación

Caracas, Mayo de 2011

Prof. Edgardo Leal
(Director)

Dr. José Bubis
(Director)

RESUMEN

La rodopsina es la proteína fotorreceptora de los bastoncillos de la retina. Esta, en presencia de luz, experimenta cambios conformacionales que se traducen en una serie de fotointermediarios, uno de los cuales es el responsable de transmitir la señal luminosa al resto de las proteínas de la cascada visual. De forma interesante, la fosforilación de la rodopsina fotoactivada constituye parte esencial en el mecanismo de inactivación o desensibilización de la rodopsina. El objetivo del presente trabajo es aplicar la espectroscopía de fluorescencia extrínseca para la detección de cambios conformacionales en la rodopsina. Para lograr tal cometido, se procedió en primera instancia, a aislar segmentos externos de los bastoncillos (SEB) a partir de retinas bovinas; los cuales contenían rodopsina con un alto grado de pureza de acuerdo al cociente de absorbancia $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$. La rodopsina bovina fue purificada mediante cromatografía de afinidad a través de Concanavalina A sefarosa, evidenciándose así que el detergente n-dodecil- β -D- maltósido solubilizaba a esta proteína de los SEB. Las cisteínas expuestas de la rodopsina fueron entonces marcadas con el fluoróforo monobromobimano (mBBr), bajo condiciones de oscuridad o luz, en presencia o ausencia de Mg^{+2} -ATP y rodopsina quinasa. Las muestras resultantes del marcaje, fueron aisladas y analizadas fluorimetricamente. Se pudo evidenciar que el cambio de conformación que se produce en la rodopsina fotoactivada no ejerció ningún tipo de impedimento para que las cisteínas en la región citoplasmática quedasen disponibles para el marcaje con mBBr. Adicionalmente, se comprobó que los sitios de fosforilación de la rodopsina se encuentran próximos a las cisteínas modificadas con mBBr, puesto que la señal de la fluorescencia, se vio significativamente disminuida en las muestras que contenían rodopsina fosforilada.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme las fuerzas para culminar esta etapa de manera exitosa.

A mi madre, Hirma Acosta, por su continuo e incondicional apoyo y por ser la base fundamental de mí ser.

A mi familia: Irving, José, Carmen, Amry, Sra María y Ginger; siempre pendientes de mi progreso.

Al Prof. José Bubis, excelente tutor, quien me brindó las herramientas necesarias para encontrarle respuestas a los problemas difíciles. Es usted, un digno ejemplo de calidad humana.

Al Prof. Edgardo Leal, por haberme enseñado que la paciencia es una gran virtud que se debe practicar en el largo camino de la vida.

A la Prof. Deisy Perdomo, quien me ayudo día a día, brindándome su apoyo desinteresadamente. Igualmente a todas las personas del laboratorio de química de proteínas de la Universidad Simón Bolívar: Leo, Liomary, María, Milagros y Nicida.

A Gera, amiga de toda una trayectoria académica, por compartir conmigo todas las noches de estudio. Dos líneas no son suficientes para demostrarte mi cariño y mi agradecimiento.

A mis grandes y queridos amigos: Suhaill, Pao, Pepe, por sus palabras de aliento, protagonizadas por un 'CONTINUA QUE TU PUEDES' y expresadas mediante llamadas y mensajes constantes. Son mi regalo personal.

A Felaurys, sencillamente una de las mejores personas que he conocido. Gracias por tantas enseñanzas regaladas.

Anita Javier, por compartir conmigo su sabiduría e intercambiar experiencias de crecimiento humano.

A los amigos que conocí y con los cuales compartí durante este camino: Nataly, Dayanita, Dori, Mara, Sandrin, Marialy, Neydher, Anepin, Bernardo

A la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Estructura y función de la rodopsina.....	3
2.2. Estructuras cristalinas de la opsina, rodopsina y meta II	10
2.3. Aplicación de métodos espectroscópicos en el estudio de cambios conformacionales de las proteínas	12
2.4. Principios fundamentales y aplicación de la espectroscopía de fluorescencia en el estudio de cambios conformacionales de proteínas	13
2.5. Cisteínas en la rodopsina	15
3. ANTECEDENTES	16
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo General.....	26
4.2. Objetivos Específicos.....	26
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
5.1. Reactivos	29
5.2. Equipos.....	30
5.3. Disoluciones	31
5.4. Colección del material biológico	33
5.5. Extracción de las retinas bovinas	33
5.6. Aislamiento de los segmentos externos de los bastones (SEB), a partir de las retinas bovinas.....	35
5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio..... (SDS-PAGE).....	37
5.8. Western Blots	37
5.9. Determinación de los espectros de absorción y concentración de rodopsina en las membranas de los SEB.....	38

5.10. Determinación de proteínas.....	38
5.11. Preparación de una fracción enriquecida en rodopsina quinasa (RK)	39
5.12. Preparación de la rodopsina fosforilada.....	39
5.13. Proteólisis con proteasa V8 del <i>Staphylococcus aureus</i>	40
5.14. Purificación de la rodopsina bovina a partir de los SEB y cuantificación por UV-V	41
5.15. Escogencia del fluoróforo para el marcaje de las cisteínas en la rodopsina.	42
5.16. Marcaje de cisteínas 140 y 316 en la rodopsina	43
5.17. Marcaje selectivo de la rodopsina en la Cys 140	44
5.18. Marcaje selectivo de la rodopsina en la Cys-316.....	44
5.19. Análisis por espectroscopía de fluorescencia	45
5.20. Análisis computacionales utilizando las estructuras tridimensionales de la rodopsina en su estado inactivo y en su estado activo	45
5.21. Determinación “In Silico” de las distancias aproximadas entre las cisteínas modificadas con mBBr y las serinas fosforiladas	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1. Aislamiento de los segmentos externos de los bastones (SEB) a partir de las retinas bovinas.....	47
6.2. Determinación de los espectros de absorción de rodopsina en las membranas de los SEB.....	51
6.3. Purificación de la rodopsina bovina a partir de los SEB.....	53
6.4. Preparación de la rodopsina fosforilada para su posterior marcaje	56
6.5. Escogencia del fluoróforo para el marcaje de las cisteínas de la rodopsina...	59
6.6. Marcaje de las cisteínas asequibles de la rodopsina con mBBr bajo condiciones de luz y oscuridad	62
6.7. Marcaje de las cisteínas de la rodopsina fosforilada	64

6.8. Fosforilación de la rodopsina luego de ser marcada con mBBr en las cisteínas asequibles.....	66
6.9. Marcaje preferencial de la Cys 140 y Cys 316 de la rodopsina	67
6.10. Fosforilación de la rodopsina marcada	68
6.11. Análisis por espectroscopía de fluorescencia	69
6.12. Análisis computacionales utilizando las estructuras tridimensionales de la rodopsina en su estado inactivo y en su estado activo	80
6.13. Determinación “In Silico” de las distancias aproximadas entre las cisteínas modificadas con mBBr y las serinas fosforiladas	85
7. DISCUSIÓN	89
8. CONCLUSIONES	94
9. BIBLIOGRAFÍA	96
10. APÉNDICE.....	101
10.2. Tabla 1a. Nombre, estructura y abreviaturas uno y tres letras para los 20 aminoácidos.....	103
10.3. Marcadores utilizados en la electroforesis	105
10.4. Determinación de la concentración de rodopsina en las membranas de los SEB	106

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la ubicación de la rodopsina en la membrana de los segmentos externos de los bastoncillos de la retina ^[2]	3
Figura 2. Estructuras orgánicas mostrando los cambios configuracionales del cromóforo y la base de Schiff que el cromóforo forma con la Lys 296 en la rodopsina.	4
Figura 3. Determinación espectroscópica del cambio de conformación de la rodopsina.	5
Figura 4. Modelo de la estructura secundaria de la rodopsina bovina basado en su estructura cristalina	7
Figura 5. Región citoplasmática de la rodopsina. Los sitios que se fosforilan preferencialmente son los residuos de serina 334, 338 y 343	9
Figura 6. Estructuras cristalinas	10
Figura 7. Análisis computacional de la superposición de la estructura cristalina.....	11
Figura 8. Formación del espectro de fluorescencia resultado de la absorción de la radiación electromagnética	13
Figura 9. Estructuras derivados de bimanio	14
Figura 10. Cisteínas de la rodopsina	15
Figura 11. Interacción de la transducina con la rodopsina y la fosforodopsina	16
Figura 12. Residuos de cisteína introducidos en la rodopsina por mutagénesis	17
Figura 13. Estudio por fluorescencia en la rodopsina mutante V250C marcada con mBBr	18
Figura 14. Proceso de activación y marcaje de cisteínas con TET	19
Figura 15. Espectros de RMN-19F de la rodopsina bovina marcada con TET.....	20
Figura 16. Los residuos de la lisina de la rodopsina que fueron sustituidos por cisteínas.....	21
Figura 17. Espectros de RMN-19F de las rodopsinas mutadas y marcadas con TET.	22

Figura 18. Marcaje de las cisteínas asequibles de la rodopsina utilizando el reactivo TET, fosforilación y marcaje de las serinas de la cola C-terminal de la proteína con ^{31}P	23
Figura 19. Espectros de RMN (REDOR) de ^{31}P observado con espectro de RMN (REDOR) de ^{19}F desfasado	24
Figura 20. Esquema experimental.....	27
Figura 21. Esquema de extracción de las retinas bovinas	34
Figura 22. Gradientes de sacarosa	36
Figura 23. Representación esquemática de los sitios donde se rompe la molécula de rodopsina por la proteasa V8	40
Figura 24. Marcaje de grupos tiol con reactivos derivados de bimano mBBr, dmBBr y qmBBr	42
Figura 25. Gel teñido con azul de coomassie mostrando la separación electroforética de las fracciones obtenidas durante la preparación de los SEB.	47
Figura 26. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante el aislamiento de los SEB.	49
Figura 27. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante el aislamiento de los SEB.	50
Figura 28. Espectro de absorción en oscuridad y en luz de la rodopsina en los SEB	51
Figura 29. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante la purificación de la rodopsina por cromatografía de afinidad.	54
Figura 30. Espectros UV-V del proceso de purificación de de la rodopsina.	55
Figura 31. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por los anticuerpos antirodopsina e ID4.	56
Figura 32. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por el anticuerpo anti-fosfoserina.....	57
Figura 33. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por al anticuerpo anti-fosfotronina.	58
Figura 34. Escogencia del fluoróforo a utilizar para el marcaje posterior de las cisteínas de la rodopsina.....	59

Figura 35. Proteólisis con la proteasa V8 de la rodopsina marcada con dmBBr, mBBr y qmBBr.	60
Figura 36. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada con los tres fluoróforos derivados del bimanio	61
Figura 37. Marcaje con mBBr de la Cys 140 y Cys 316 de la rodopsina bajo condiciones de oscuridad y luz.	63
Figura 38. Marcaje con mBBr de la rodopsina fosforilada.	64
Figura 39. Proteólisis con V8 de la rodopsina fosforilada y marcada con mBBr a fin de analizar si se modificaron la Cys 140 y la Cys 316	65
Figura 40. Fosforilación de la rodopsina luego de marcada con mBBr.	66
Figura 41. Marcaje preferencial de la Cys 140 y la Cys 316 de la rodopsina con mBBr.	67
Figura 42. Fosforilación de la rodopsina marcada preferencialmente en la Cys 140 y Cys 316 con mBBr.	68
Figura 43. Espectros de fluorescencia de la rodopsina	70
Figura 44. Espectros de fluorescencia de los reactivos.....	70
Figura 45. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 140 y 316.	71
Figura 46. Espectros de fluorescencia de la rodopsina inicialmente marcada en las cisteínas 140 y 316 y luego fosforilada por RK.	72
Figura 47. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada preferencialmente en las cisteínas 140.	74
Figura 48. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 140 luego fosforilada por RK.....	75
Figura 49. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada preferencialmente en las cisteínas 316.	76
Figura 50. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 316 luego fosforilada por RK.....	77
Figura 52. Estructura tridimensional de la rodopsina en oscuridad y en luz.	81
Figura 53. Estructura tridimensional de la rodopsina en luz.	82

Figura 54. Modelo siguiendo la estructura tridimensional de la rodopsina dimérica	84
Figura 55. Estructura del mBBr mostrando las distancias entre varios átomos de carbono.	86
Figura 56. Estructura del fosfato mostrando las distancias entre varios átomos de oxígeno.	88

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del tratamiento para las muestras marcadas.....	28
Tabla 2. Reactivos	29
Tabla 3. Equipos	30
Tabla 4. Disoluciones empleadas en cada uno de los procesos efectuados	31
Tabla 5. Determinación de la concentración de la rodopsina en las membranas de los SEB.....	52
Tabla 6. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad, luz y fosforilada.....	69
Tabla 7. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y luz, marcada en la Cys 140 y Cys 316	71
Tabla 8. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys 140 y Cys 316	72
Tabla 9. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y luz, marcada en la Cys 140	73
Tabla 10. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys 140	75
Tabla 11. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y en luz, marcada en la Cys 316	76
Tabla 12. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys316	77
Tabla 13. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina marcada en oscuridad y la rodopsina fosforilada luego marcada en Cys 140 y Cys 316.....	78
Tabla 14. Distancias entre las cisteínas estudiadas y los sitios fosforilados en el estado activado de la rodopsina.....	83
Tabla 15. Aproximación de la distancia entre las cisteínas modificadas con mBBr en oscuridad y luz	86
Tabla 16. Aproximación de las distancias entre las cisteínas modificadas activadas en luz y las serinas fosforiladas	88

1. INTRODUCCIÓN

El proceso visual comienza con la conversión de paquetes de energía electromagnética, llamados fotones o cuantos de luz, en una señal que puede ser analizada por el cerebro. Esta conversión es llevada a cabo por las células fotorreceptoras del ojo, un conjunto de células especializadas que se localizan en la retina ^[1], y está asociada con eventos biológicos mediados por cascadas de interacciones proteína-proteína, que conducen a cambios conformacionales de las proteínas involucradas ^[2].

La rodopsina (R), es una proteína fotorreceptora que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G o GPCR (*G-Protein Coupled Receptor*). Embebida en la membrana lipídica de los discos, en los segmentos externos de los bastoncillos de la retina, se encuentra la R. Esta es una proteína que posee un peso molecular estimado de 40KDa ^[3], representa el 80% de las proteínas celulares totales, y aproximadamente el 95% del total de las proteínas de membrana de los segmentos externos de los bastones (SEB) ^[1].

La R experimenta cambios conformacionales por la incidencia de la luz, formando un intermediario estable denominado metarodopsina II ^[4-5], que corresponde a la R activada (Meta II o R^{*}), e interacciona con otra proteína denominada transducina que se encuentra en su forma inactiva unida a guanósín difosfato (GDP) ^[1]. La R^{*} acoplada a la transducina promueve el intercambio de GDP por guanósín trifosfato (GTP), lo cual dispara una cascada de reacciones bioquímicas que genera finalmente un impulso nervioso transmitido al sistema nervioso central ^[6].

El mecanismo de desactivación del proceso visual comienza con la fosforilación de la R^{*} por la enzima rodopsina quinasa (RK), lo cual desensibiliza al receptor disminuyendo su afinidad por la transducina. Posteriormente, otra proteína conocida

como arrestina se une a la rodopsina fosforilada desacoplando por completo su interacción con la transducina^[6].

La técnica de espectroscopía de fluorescencia puede ser utilizada en el estudio de los cambios conformacionales que ocurren en las proteínas. En el presente estudio se plantea la aplicación de la espectroscopía de fluorescencia extrínseca en la detección de los cambios conformacionales que suceden durante la activación y desactivación de la rodopsina bovina. Buscando lograr tal cometido, se procederá a marcar las dos cisteínas asequibles que están localizadas en la región citoplasmática de la rodopsina con el reactivo monobromobimano, y se analizarán las diferencias a nivel de intensidad de la señal de fluorescencia en muestras de rodopsina en sus estados inactivo, activo y fosforilado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estructura y función de la rodopsina

La rodopsina es una proteína fotorreceptora ubicada en el tejido que recubre el interior del ojo, llamado retina. La retina de los bovinos está mayoritariamente formada por células bastoncillos ^[7], los cuales son receptores de luz tenue ^[8]. Los segmentos externos de los bastones (SEB) están formados por una serie de discos agrupados, definidos como compartimentos cerrados que contienen a la rodopsina en su membrana ^[7] (Figura 1).

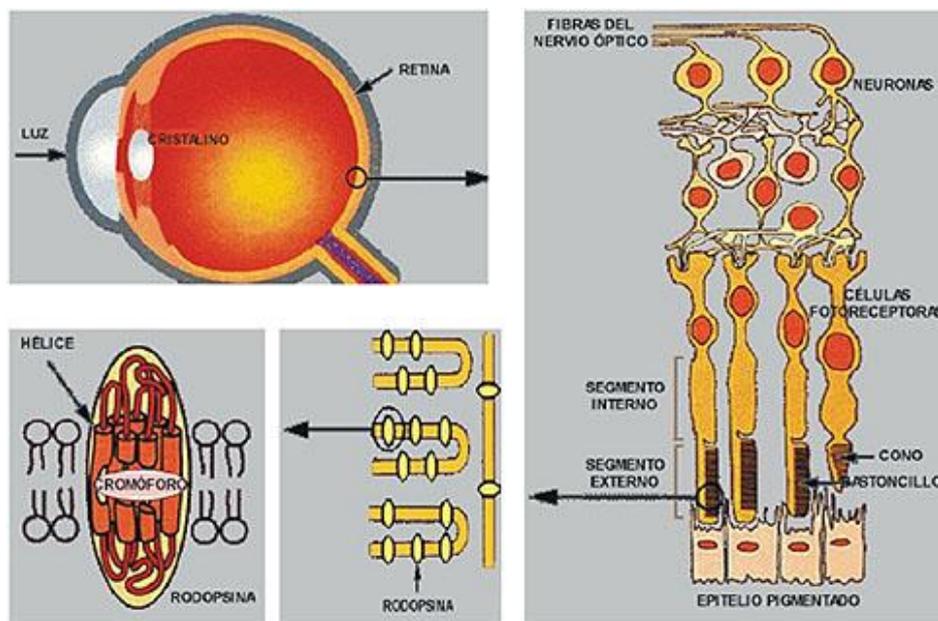


Figura 1. Esquema representativo de la ubicación de la rodopsina en la membrana de los segmentos externos de los bastoncillos de la retina ^[2].

La rodopsina presenta dos componentes, la opsina y el cromóforo 11-*cis*-retinal. El primero es una porción proteica formada por 348 aminoácidos y el segundo es un derivado de la vitamina A. Ambos componentes se encuentran unidos covalentemente, a través de una base de Schiff protonada entre el grupo ϵ -amino de una lisina (Lys 296) y el grupo aldehído del retinal^[2], (Figura 2C).

La clave en la química de la visión, fue la observación de que el 11-*cis*-retinal se convierte en el isómero todo-*trans*-retinal cuando está expuesto a la luz, (Figura 2, A y B)^[8], este dispara una serie de cambios conformacionales que produce el estado activado de la rodopsina (R^*) o metarodopsina II (Meta II)^[9].

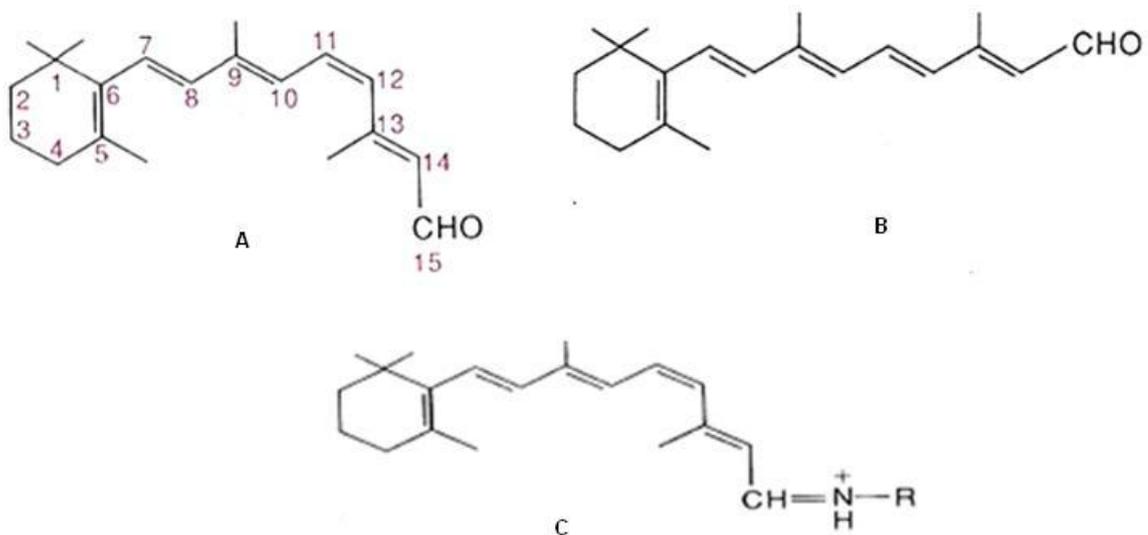


Figura 2. Estructuras orgánicas mostrando los cambios configuracionales del cromóforo y la base de Schiff que el cromóforo forma con la Lys 296 en la rodopsina.
A: Estructura del 11-*cis*-retinal, se indica el sistema de numeración empleado.
B: Estructura del todo-*trans*-retinal.
C: Base de Schiff o imina protonada formada entre el 11-*cis*-retinal y la lisina 296 de la opsina^[10].

Cuando la luz incide sobre la retina, se inicia una serie de reacciones bioquímicas que comprenden el proceso de fototransducción visual. El primer evento en este mecanismo, es la absorción de un fotón por el cromóforo 11-*cis*-retinal de la rodopsina, la cual en oscuridad presenta una banda de absorción a 500nm (Figura 3B). La luz es responsable de que la rodopsina sufra transformaciones fotoquímicas que conllevan a la aparición de diversos fotointermediarios, los cuales son estables sólo a muy bajas temperaturas. Finalmente cuando se llega al estado Meta II se desprotona la base de Schiff (Figura 3A), y se presenta una banda de absorción a 380nm (Figura 3B). Meta II corresponde a la forma enlazada de la proteína al isómero todo-*trans* del retinal. La cascada visual está mediada por Meta II, que es el fotointermediario responsable de transmitir la señal luminosa a las otras proteínas de la ruta de señalización visual^[1]. Luego este fotointermediario es hidrolizado a opsina y todo-*trans*-retinal^[3]. A continuación se muestra el orden de aparición de los fotointermediarios y su desaparición con el tiempo:

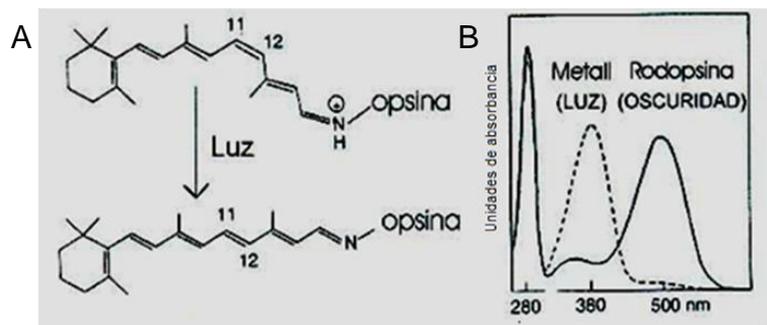
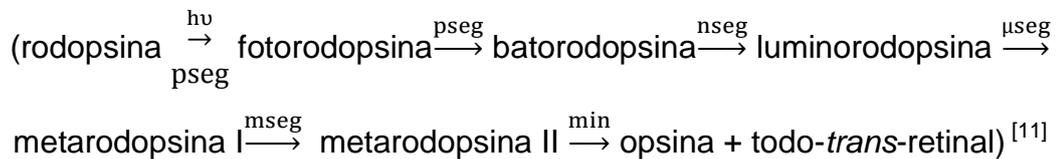


Figura 3. Determinación espectroscópica del cambio de conformación de la rodopsina.

A: Efecto del cambio de configuración del 11-*cis*-retinal inducido por la luz en la rodopsina y la consiguiente desprotonación de la base de Schiff.

B: Espectro UV-V de la conformación inactiva de la rodopsina en oscuridad y de la conformación activa o Meta II después de la iluminación^[6].

En la Figura 4 se muestra el modelo de la estructura secundaria de la rodopsina, donde se ilustra la manera en la cual la rodopsina se divide en tres regiones bien delimitadas: la región citoplasmática, la transmembranal y la intradiscal. La rodopsina presenta siete α -hélices transmembranales que varían de longitud de 20 a 33 residuos (I-VII) unidas por lazos. La región transmembranal comprende el 65% de los aminoácidos que constituyen a la rodopsina. La hélice VII contiene la Lys 296 que se une con el 11-*cis*-retinal para formar la base de Schiff protonada ^[12-13].

En la región citoplasmática, sobresale una hélice anfipática llamada H8 que se encuentra anclada a la membrana por dos cisteínas palmitoiladas (Cys 322 y Cys 323), además se hallan varios lazos peptídicos intracelulares que salen de las α -hélices llamados C-I, C-II y C-III y la cola C-terminal (Figura 4) ^[12-13].

En la región intradiscal se encuentra el dominio N-terminal (Figura 4), donde se ubican dos asparaginas (Asn) unidas a oligosacáridos (Asn 2 y Asn 15), la metionina 1 la cual está acetilada y contiene varios lazos extracelulares llamados E-I, E-II y E-III ^[12-13].

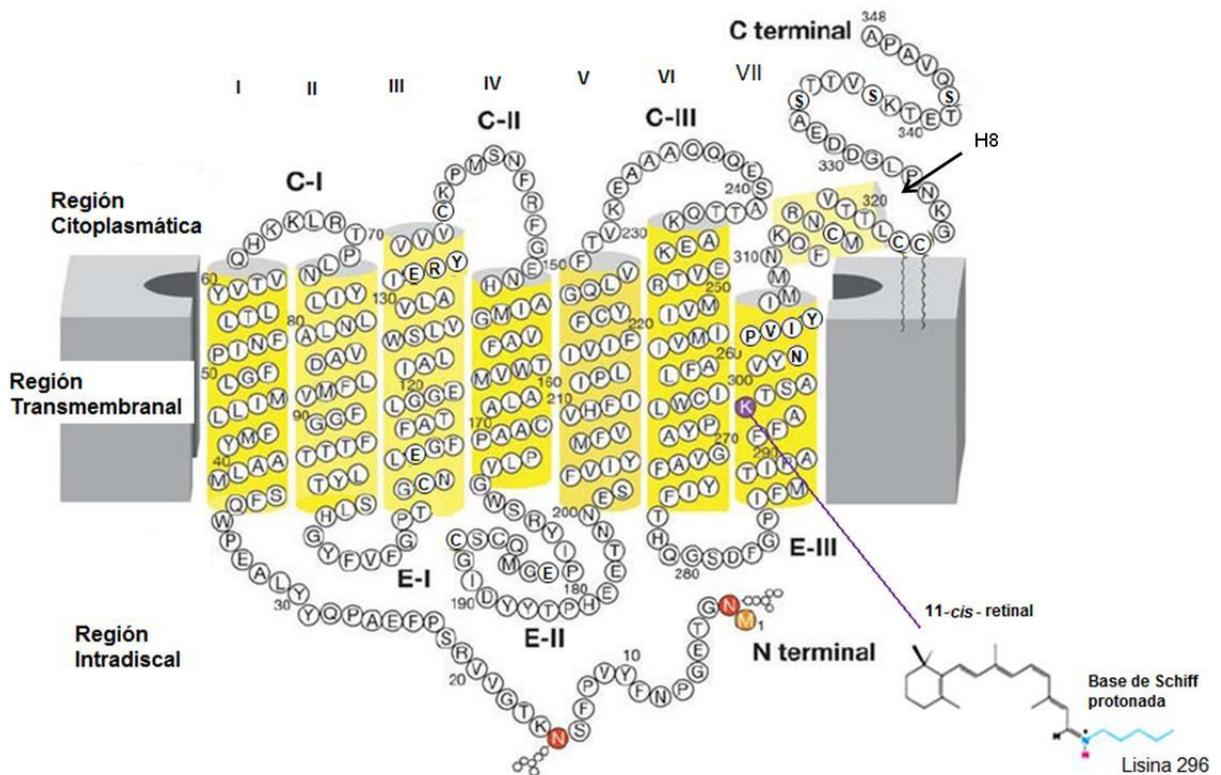


Figura 4. Modelo de la estructura secundaria de la rodopsina bovina basado en su estructura cristalina, en la Tabla 1a (apéndice 10.2) se muestran las abreviaturas de una y tres letras de los 20 aminoácidos. Las siete hélices transmembranales se muestran en cilindros de color amarillo. El cromóforo 11-*cis*-retinal, se une al residuo de lisina 296 (color morado). Se muestran los residuos de asparagina 2 y 15 (color rojo) que son los sitios de glicosilación y el residuo de metionina 1 (color naranja) ^[13].

En su estado activado, la R interacciona con la transducina, la cual es una proteína periférica asociada a la membrana que pertenece a la familia de las proteínas G heterotriméricas. La transducina posee tres cadenas polipeptídicas conocidas como las subunidades α ($T\alpha$), β ($T\beta$), y γ ($T\gamma$) [2]. En ausencia de luz, la transducina se encuentra en su forma inactiva, enlazada a GDP. Por efectos de la luz, la rodopsina activada (R^*), interacciona fuertemente con la transducina unida a GDP y promueve el intercambio de GDP a GTP sobre la subunidad $T\alpha$, formándose primero un intermediario en el cual R^* está unida a la transducina con su sitio de enlazamiento de nucleótidos vacío. $T\alpha$ -GTP constituye la forma activada de la transducina y en esta forma $T\alpha$ disminuye su afinidad tanto por la subunidad $T\beta$ y $T\gamma$, como por R^* , estos cambios de afinidades son críticos para el proceso de excitación. La liberación de la R^* , de su complejo con la transducina permite que R^* actúe catalíticamente e interaccione con otras transducinas activándolas [1].

Posteriormente, la subunidad T-GTP activa a una fosfodiesterasa de cGMP (PDE). La PDE promueve una disminución intracelular en los niveles de cGMP, lo que a su vez causa el cierre de unos canales catiónicos localizados en la membrana de los bastoncillos de la retina, lo que impide la entrada de iones Na^+ y Ca^{+2} . Esto se traduce en una hiperpolarización de la membrana de los bastoncillos y la generación de la señal que llega al cerebro a través del nervio óptico [14].

El cambio de conformación inducido por la absorción de la luz expone varios residuos de Ser (Ser 334, Ser 338 y Ser 343) en el dominio carboxilo-terminal de la R^* (Figura 5). Estos residuos se fosforilan rápidamente gracias a la acción de una enzima fosfotransferasa denominada rodopsina quinasa (RK), la cual transfiere grupos fosfato a partir del ATP a su sustrato específico, la R^* . Este proceso de fosforilación requiere un ión metálico divalente para transferir el grupo fosfato (Mg^{2+}) [8]. El dominio carboxilo-terminal fosforilado de la rodopsina se une a la proteína arrestina, una proteína abundante en los segmentos externos de los bastones

impidiendo que continúe la interacción entre la R^* y la transducina, produciendo la desactivación de la rodopsina con el subsecuente cierre de la señal bioquímica ^[13].

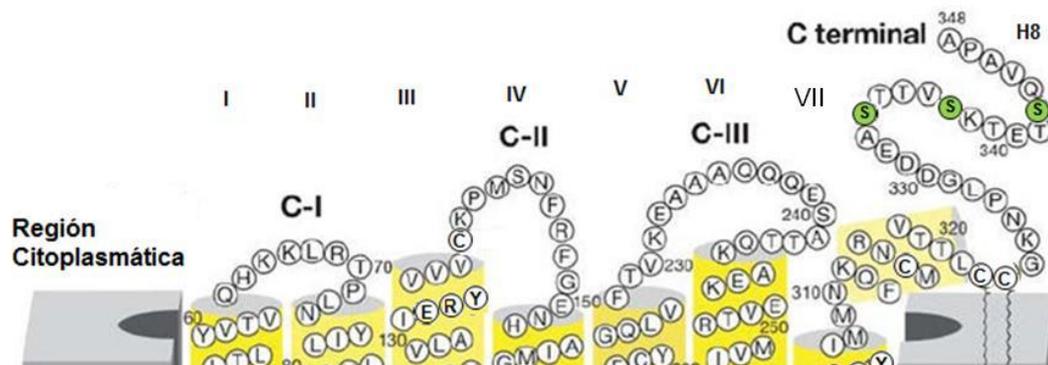


Figura 5. Región citoplasmática de la rodopsina. Los sitios que se fosforilan preferencialmente son los residuos de serina 334, 338 y 343 (color verde) ^[13].

La terminación de la activación de la PDE por la subunidad $T\alpha$ -GTP se produce cuando el GTP enlazado a $T\alpha$ es hidrolizado a GDP debido a la actividad GTPasa intrínseca de la sub unidad $T\alpha$.

2.2. Estructuras cristalinas de la opsina, rodopsina y meta II

Recientemente, se determinaron las estructuras cristalinas de la rodopsina en su estado inactivo, del fotointermediario activo, Meta II y de la porción proteica opsina (Figura 6). Estas estructuras permiten observar los cambios conformacionales que existen directamente en estas tres formas diferentes de la proteína ^[15].

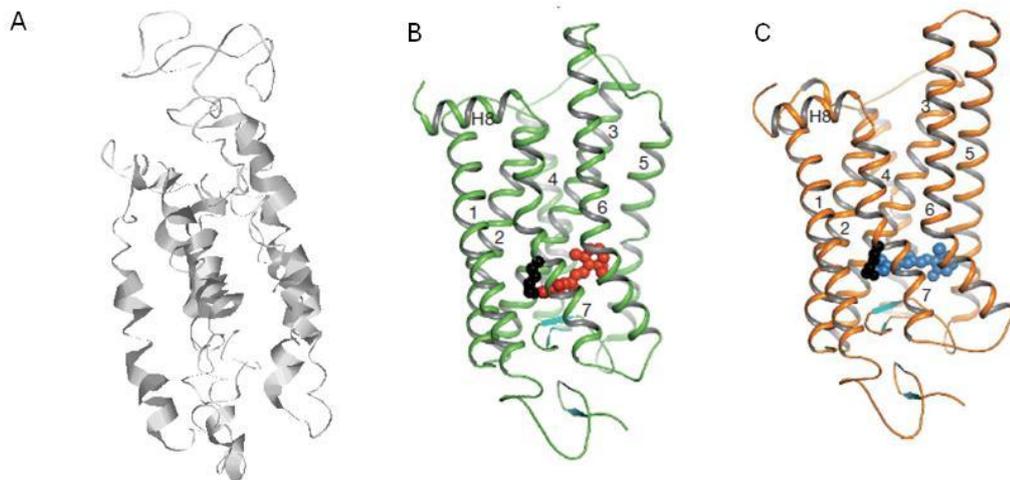


Figura 6. Estructuras cristalinas. **A:** Opsina. **B:** Rodopsina en su forma inactiva: opsina unida al cromóforo 11-*cis*-retinal (esferas rojas), enlace covalente unido a la Lys 296 (esferas negras). **C:** Rodopsina en su forma activa, meta II: opsina unida al cromóforo todo-*trans*-retinal (esferas azules), enlace covalente unido a la Lys 296 (esferas negras) ^[15].

En la Figura 7 se comparan las estructuras de la rodopsina en su estado inactivo y activo mostrando en forma de cilindro las siete hélices transmembranales y la hélice H8. En color verde se ilustra la rodopsina en su estado inactivo y en color naranja la rodopsina en su estado activo. En la Figura 7 se pueden observar que las regiones de mayor cambio en la rodopsina al pasar a su estado activo son las hélices V y VI, y que las hélices I, II, III, IV, VII y H8 sufren pocos cambios durante la activación de la proteína ^[15].

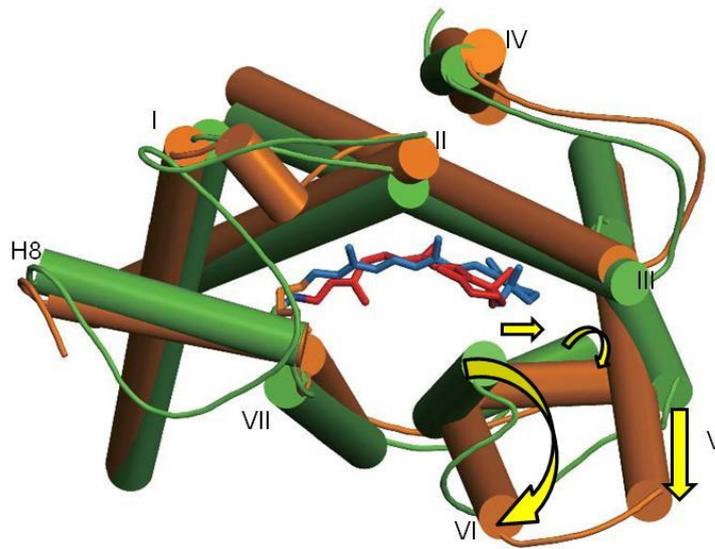


Figura 7. Análisis computacional de la superposición de la estructura cristalina del estado inactivo (color verde) con la estructura cristalina del estado activado (color naranja) en la rodopsina bovina ^[15].

2.3. Aplicación de métodos espectroscópicos en el estudio de cambios conformacionales de las proteínas

Los métodos espectroscópicos son métodos analíticos que se basan en las distintas interacciones de la radiación con la materia, midiendo la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro dispositivo electrónico relacionado con la radiación electromagnética ^[16]. Habitualmente, en estos métodos, el analito (muestra) se estimula en cierto modo al aplicar energía en forma de calor, energía eléctrica o luz. Antes de la aplicación del estímulo, la muestra está predominantemente en su estado de energía más bajo o estado fundamental. Luego, el estímulo hace que el analito experimente una transición a un estado de mayor energía o estado excitado. La información sobre el analito se obtiene al medir la radiación electromagnética emitida conforme regresa a su estado fundamental, o al cuantificar la radiación electromagnética que se absorbe como resultado de la excitación ^[17]. Generalmente las técnicas espectroscópicas son técnicas analíticas que funcionan con pequeñas cantidades de analito y no son destructivas ^[18].

2.4. Principios fundamentales y aplicación de la espectroscopía de fluorescencia en el estudio de cambios conformacionales de proteínas

La fluorescencia es un proceso en el que los átomos y moléculas, se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. La absorción puede causar la excitación del analito a estados energéticos de mayor energía (estados 1 ó 2), y después la especie excitada se relaja al estado fundamental, emitiendo su exceso de energía como fotones (líneas continuas) o por proceso no radiantes (líneas discontinuas). Esta conversión de radiación absorbida en energía, que se emite nuevamente es un proceso rápido (Figura 8) ^[17].

La fluorescencia se produce a menores frecuencias (mayores longitudes de onda) que las de la radiación incidente, debido a que la transición emisora tiene lugar luego de que parte de la energía vibracional ha sido disipada hacia el entorno ^[19].

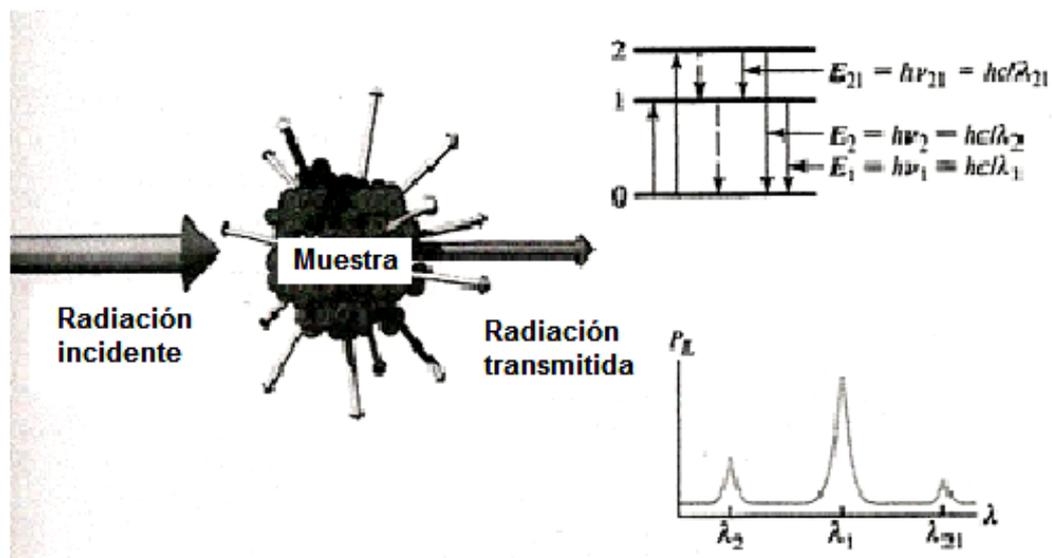


Figura 8. Formación del espectro de fluorescencia resultado de la absorción de la radiación electromagnética ^[17].

Los métodos de fluorescencia tienen una elevada sensibilidad, por lo que pueden ser utilizados a concentraciones bajas del analito. Las proteínas presentan fluorescencia intrínseca debido a su contenido de residuos aromáticos (Trp, Tyr y Phe). Adicionalmente las proteínas pueden adquirir fluorescencia extrínseca mediante la incorporación de marcadores químicos fluorescentes. Estos marcadores fluorescentes pueden emplearse para obtener información de procesos de transferencia de energía, polaridad en el ambiente de la proteína y distancias entre posiciones específicas de aminoácidos ^[16-17].

Una serie de marcadores fluorescentes que reaccionan selectivamente con los grupos tiol de las cisteínas de las proteínas para producir derivados fluorescentes, incluye a los compuestos heterocíclicos derivados del bimano. Los compuestos derivados de bimano 9,10-dioxabimanos que contiene bromo (Figura 9) no son fluorescentes, pero se convierten en compuestos altamente fluorescentes al reaccionar selectivamente con tioles de bajo peso molecular ^[20-21]. Adicionalmente, estos compuestos son relativamente pequeños, tienen una larga vida y son sensibles a cambios en la polaridad del ambiente que los rodea. Además, son estables durante la exposición al aire y a la radiación. Todas estas características han sido empleadas para detectar cambios conformacionales en las proteínas ^[5-21].

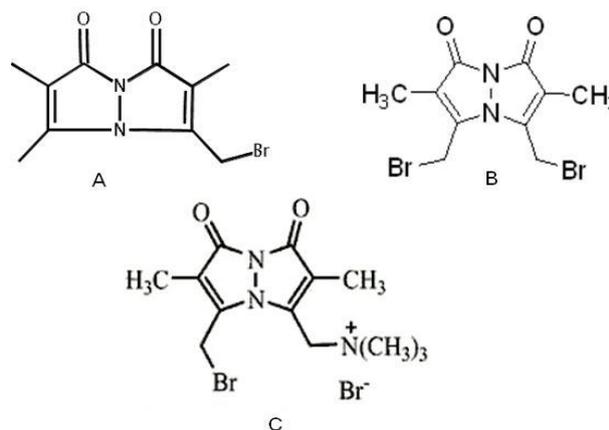


Figura 9. Estructuras derivados de bimano.

A: Estructura del monobromobimano (mBBr).

B: Estructura del dibromobimano (mBBr).

C: monobromotrimetilamonio-bimano (qmBBr) ^[20].

2.5. Cisteínas en la rodopsina

Una de las características de la rodopsina bovina es su baja frecuencia del aminoácido cisteína. La proteína contiene solo diez residuos de Cys que se muestran resaltados en la Figura 10, en las posiciones 110, 140, 167, 185, 187, 222, 264, 316, 322 y 323. Entre ellos, la Cys 110 y Cys 187 forman un puente disulfuro, el cual estabiliza la estructura plegada de la rodopsina. La Cys 185 se encuentra en la región intradiscal. Las Cys 322 y 323 se encuentran palmitoiladas. Las Cys 167, 222 y 264, se encuentran embebidas en la región transmembranal, lo que las hace inasequibles. Sin embargo, la Cys 140 y la Cys 316, se encuentran en la región citoplasmática y están expuestas y aseguibles [22].

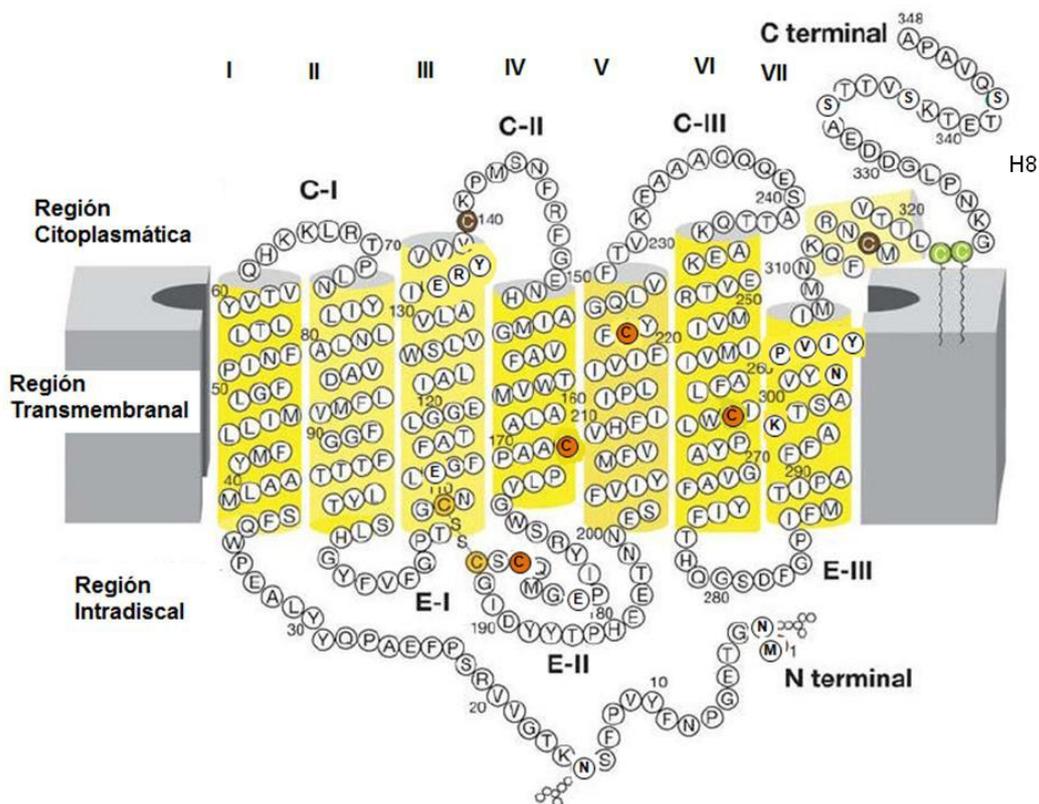


Figura 10. Cisteínas de la rodopsina. Cisteínas palmitoiladas (color verde), cisteínas unidas por puentes disulfuro (color amarillo), cisteínas no aseguibles (color naranja) [13].

3. ANTECEDENTES

En 1997, se comparó la interacción de la rodopsina activada y la rodopsina activada fosforilada (fosforodopsina) con la transducina ^[23]. Observándose que la interacción con la transducina de la fosforodopsina activada disminuyó significativamente con respecto a la de la rodopsina activada sin fosforilar. Análogamente la actividad GTPasa de la transducina disminuyó en presencia de la fosforodopsina (Figura 11). Estos resultados, sugieren que la fosforilación de los residuos de serinas localizados en la cola C-terminal de la rodopsina activada pudiera bloquear estéricamente los sitios de interacción con la transducina, y señalan que la cola C-terminal de la rodopsina fotolizada debe encontrarse próxima con las regiones citoplasmáticas de la proteína que se enlazan a la transducina ^[23].

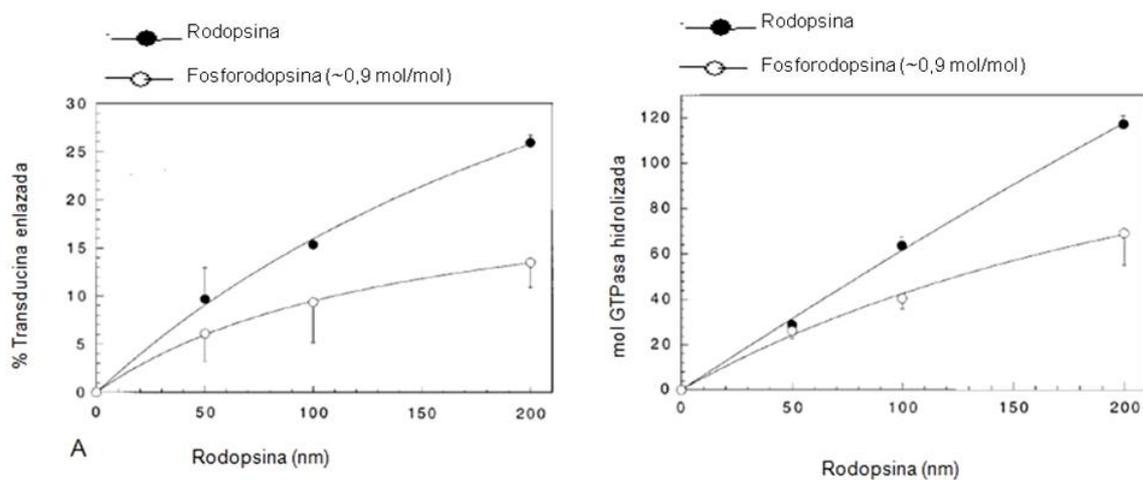


Figura 11. Interacción de la transducina con la rodopsina y la fosforodopsina. **A:** Efecto de la fosforilación en la rodopsina en el enlace entre rodopsina y transducina. **B:** Efecto sobre la actividad GTPasa en la transducina en función de la rodopsina fosforilada y sin fosforilar ^[23].

Los cambios conformacionales producidos en la rodopsina al pasar de su estado inactivo en oscuridad a su estado activo en luz, fueron estudiados por medio de la espectroscopía de fluorescencia, marcando la proteína con monobromobimano (mBBr). Estos estudios se llevaron a cabo introduciendo mediante mutagénesis sitio dirigida, una serie de cisteínas en la proteína para marcarlas posteriormente con mBBr. En la Figura 12 se muestran en color negro los sitios que fueron mutados por cisteínas y que corresponden a los siguientes residuos: K248, E249, V250, T251 y R252 ^[5].

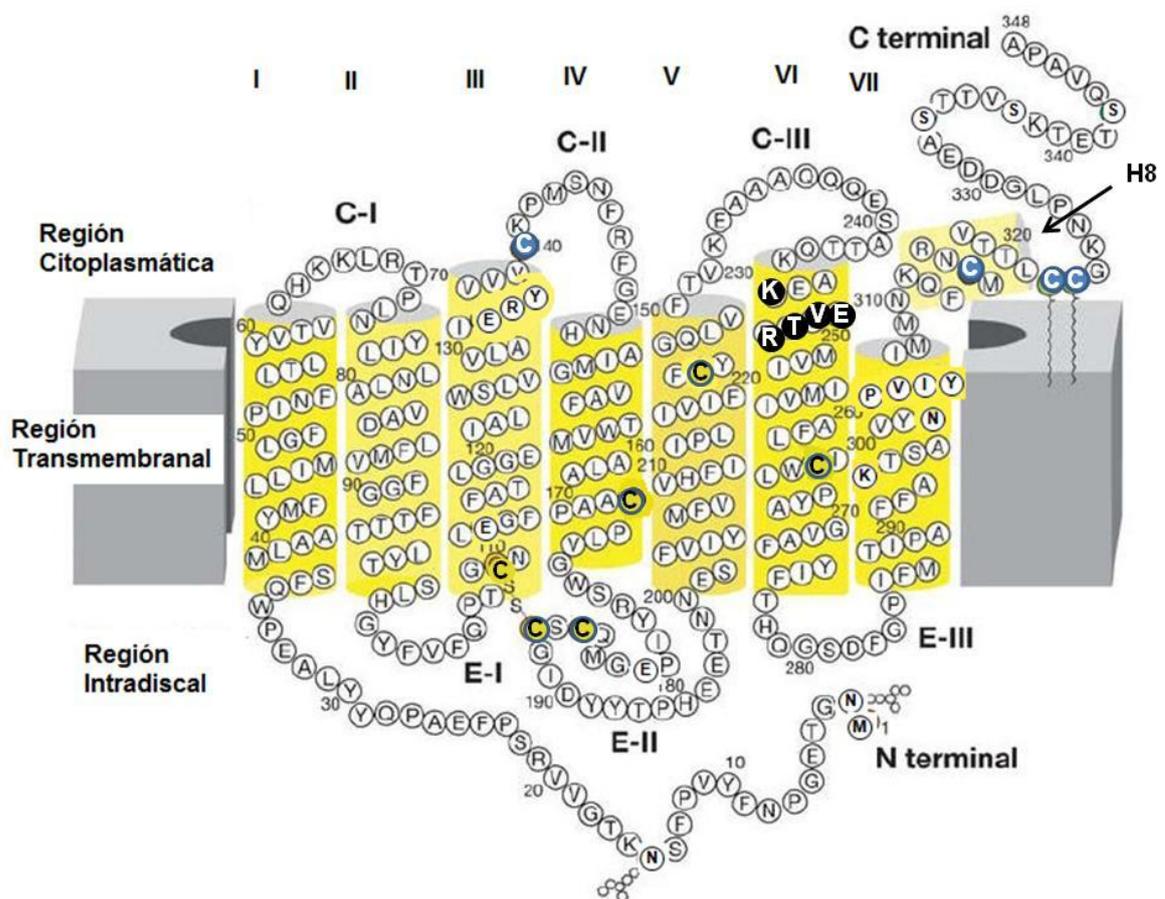


Figura 12. Residuos de cisteína introducidos en la rodopsina por mutagénesis, se muestran en color negro. En azul se muestran las cisteínas propias de la rodopsina en las posiciones 140, 316, 322 y 323 las cuales se encuentran en la región citoplasmática de la proteína ^[5].

En este sentido, el marcaje con mBBr fue capaz de detectar cambios conformacionales en la cara interior de la hélice VI causados por cambios en la polaridad de su entorno como consecuencia de la fotoactivación de la proteína. Los desplazamientos que se produjeron en las bandas máximas de excitación de fluorescencia al comparar la proteína en su estado inactivo y activo demostraron los cambios conformacionales dependientes de la luz que ocurrieron en la rodopsina.

Se observaron desplazamientos de +2,5nm en la rodopsina K248C, de -5,5nm en la rodopsina V250C (Figura 13), de -0,5nm en la rodopsina T251C y de -1nm en la rodopsina R252C. Por el contrario para la rodopsina E249C no se observó ningún desplazamiento. Estos resultados implican que existen cambios conformacionales en la hélice VI de la rodopsina al pasar de oscuridad a luz ^[5].

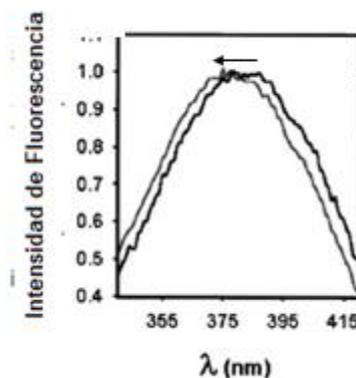


Figura 13. Estudio por fluorescencia en la rodopsina mutante V250C marcada con mBBr
Línea oscura: fluorescencia extrínseca de la rodopsina en oscuridad. **Línea clara:** fluorescencia extrínseca del fotointermediario Meta II ^[5].

Otro método para el estudio de los cambios conformacionales producidos por la luz en la rodopsina, es la espectroscopía de RMN de flúor (^{19}F). El método fue utilizado por *Seetharaman et al.* ^[4] El cual consistió en el marcaje selectivo de las cisteínas 140 y 316 situadas en la cara citoplasmática de la rodopsina, utilizando etiltiotrifluoruro (TET), marcado con ^{19}F según el mecanismo que se muestra en la Figura 14 ^[4].

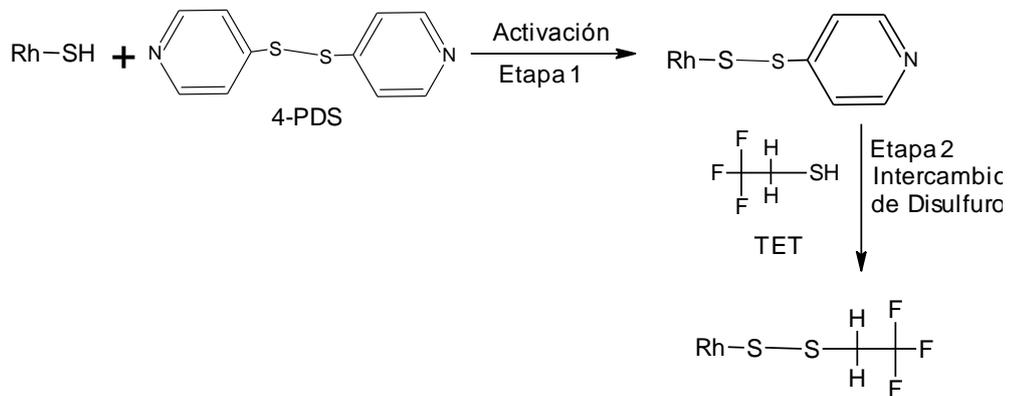


Figura 14. Proceso de activación y marcaje de cisteínas con TET. Rodopsina con cisteínas libre (Rh-SH), 4,4'-Ditiopiridina (4-PDS) ^[4].

Los datos obtenidos mostraron picos bien resueltos. En oscuridad, los valores de desplazamiento químico relativo al ácido trifluoracético (TFA) fueron de 10,6 ppm para la Cys-140 y de 10,0 ppm para la Cys-316. Al iluminar y encontrarse la rodopsina en su estado activado, se produjo un desplazamiento químico hacia campo alto de 10,2 ppm (-0,4 ppm) en la Cys-140 y hacia campo bajo de 10,1 ppm (+0,1 ppm) en la Cys-316 (Figura 15). Estos resultados sugieren cambios conformacionales en las hélices III y H8 respectivamente por efectos de la luz ^[4].

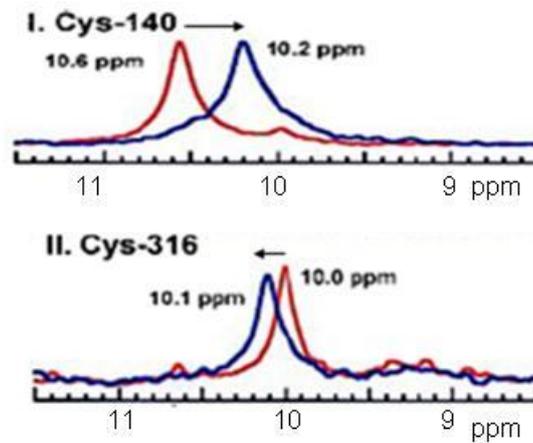


Figura 15. Espectros de RMN- ^{19}F de la rodopsina bovina marcada con TET. Efecto del desplazamiento químico ^{19}F en luz (línea azul) y oscuridad (línea roja). **I:** Cisteína 140 marcada con TET. **II:** Cisteína 316 marcada con TET ^[4].

El mismo grupo de investigación preparó mutantes de la rodopsina en las cuales los residuos K67, K245, K248 y K311 fueron sustituidos individualmente por cisteínas (Figura 16). Posteriormente estas proteínas mutadas fueron marcadas con ^{19}F , siguiendo el mecanismo presentado anteriormente (Figura 14) ^[4].

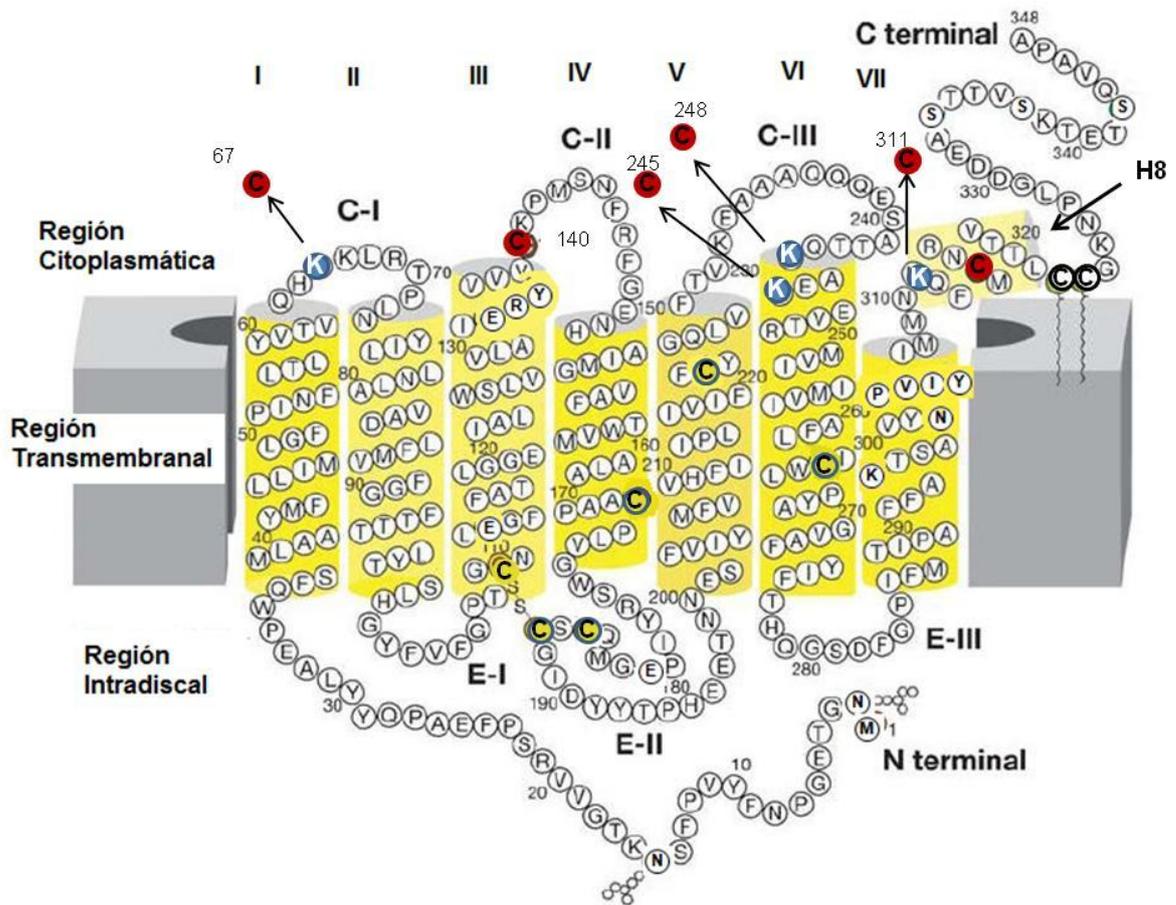


Figura 16. Los residuos de la lisina de la rodopsina que fueron sustituidos por cisteínas se muestran en color azul. Las cisteínas se muestran en color rojo ^[4].

Los espectros de RMN de las proteínas mutadas bajo condiciones de oscuridad y luz se muestran en la Figura 17. Para la mutación K67C, la cual está localizada en la hélice I, se observó un desplazamiento hacia campo alto de 9,8ppm a 9,6ppm. La mutación K245C no mostró desplazamiento en el espectro de RMN el cual tuvo una señal en 9,9ppm. Sin embargo, la mutación K248C cuyo residuo mutado también está situado en la hélice VI si mostró un cambio hacia campo bajo de 9,5ppm a 9,6ppm^[4].

Es importante resaltar que para la mutación K311C cuyo residuo mutado está ubicado en la hélice H8, no se observó cambio en el espectro de RMN, el cuál mostro una señal en 9,9 ppm. Sin embargo Cys 316, ubicada en la misma hélice H8 mostró un claro desplazamiento (Figura 15)^[4].

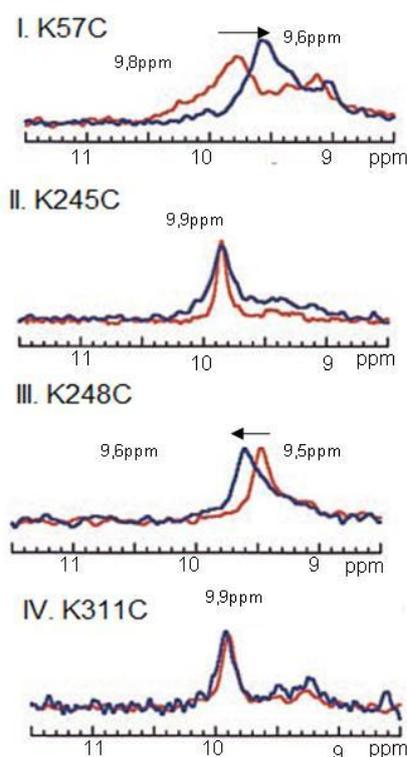


Figura 17. Espectros de RMN-19F de las rodopsinas mutadas y marcadas con TET. Comparación del desplazamiento químico obtenido en luz (línea azul) y oscuridad (línea roja). I: K67C marcada con TET. II: K245C marcada con TET. III: K248C marcada con TET. IV: K311C marcada con TET^[4].

En el 2004, se marcaron las cisteínas 140 y 316 de la región citoplasmática de la rodopsina con TET y las serinas de la cola C-terminal de la rodopsina con ^{31}P , mostrada en la Figura 18 [24].

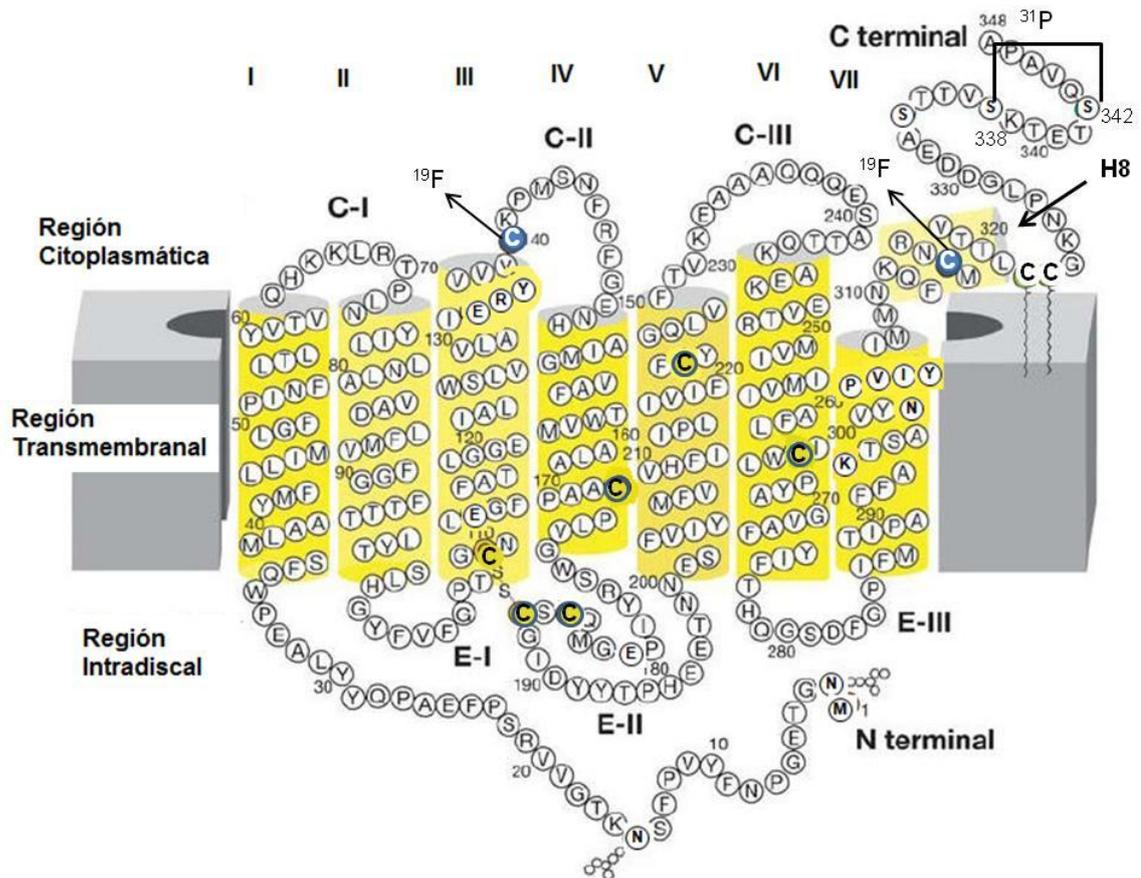


Figura 18. Marcaje de las cisteínas asequibles de la rodopsina utilizando el reactivo TET, fosforilación y marcaje de las serinas de la cola C-terminal de la proteína con ^{31}P [24].

Mediante experimentos de doble resonancia eco rotacional del estado sólido (REDOR), se pudo determinar la distancia internuclear entre los sitios marcados con ^{19}F y ^{31}P . La diferencia entre los espectros con REDOR total y REDOR desfasado obtenidos en luz y oscuridad no fue significativa, indicando que al fosforilarse el dominio C-terminal se mantiene separado de la cara citoplasmática a una distancia aproximada de 12 Å independientemente de su estado de activación (Figura 19) ^[24].

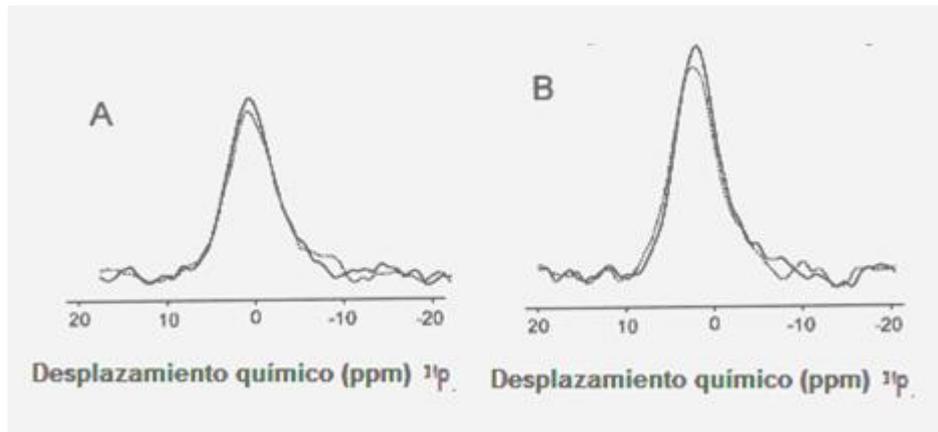


Figura 19. Espectros de RMN (REDOR) de ^{31}P observado con espectro de RMN (REDOR) de ^{19}F desfasado. **Línea oscura:** Espectro con REDOR total. **Línea clara:** Espectro REDOR con un pulso de rotación desfasado 60 ciclos **A:** Rodopsina en oscuridad **B:** Rodopsina iluminada o meta II ^[24].

Todas estas evidencias muestran que el cambio conformacional de la rodopsina bovina al pasar de su estado inactivo en oscuridad a su estado activo en luz, puede ser estudiado espectroscópicamente, ya sea por fluorescencia o por RMN al modificar los grupos sulfhidrilo de sus cisteínas con reactivos apropiados, es por ello que en el presente trabajo se utilizará la fluorescencia extrínseca producida cuando las cisteínas expuestas de la rodopsina son marcadas con derivados bromados de bimano, a fin de analizar los cambios conformacionales que se producen al comparar muestras de rodopsina fotoactivada y de rodopsina fotoactivada y fosforilada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aplicar la espectroscopía de fluorescencia para la detección de cambios conformacionales en el estudio de la rodopsina bovina.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Aislar los segmentos externos de los bastoncillos a partir de las retinas bovinas.

4.2.2. Purificar la rodopsina bovina por cromatografía de afinidad, a través de una columna de concanavalina A-sefarosa.

4.2.3. Aislar una fracción enriquecida en rodopsina quinasa, enzima responsable de fosforilar a la rodopsina.

4.2.4. Preparar rodopsina fosforilada.

4.2.5. Aplicar la espectroscopía de fluorescencia para estudiar cambios conformacionales entre la rodopsina fosforilada y la no fosforilada.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para detectar los cambios conformacionales en el estudio de la rodopsina bovina, mediante la aplicación de la espectroscopía de fluorescencia, se siguió el esquema experimental mostrado en la Figura 20.

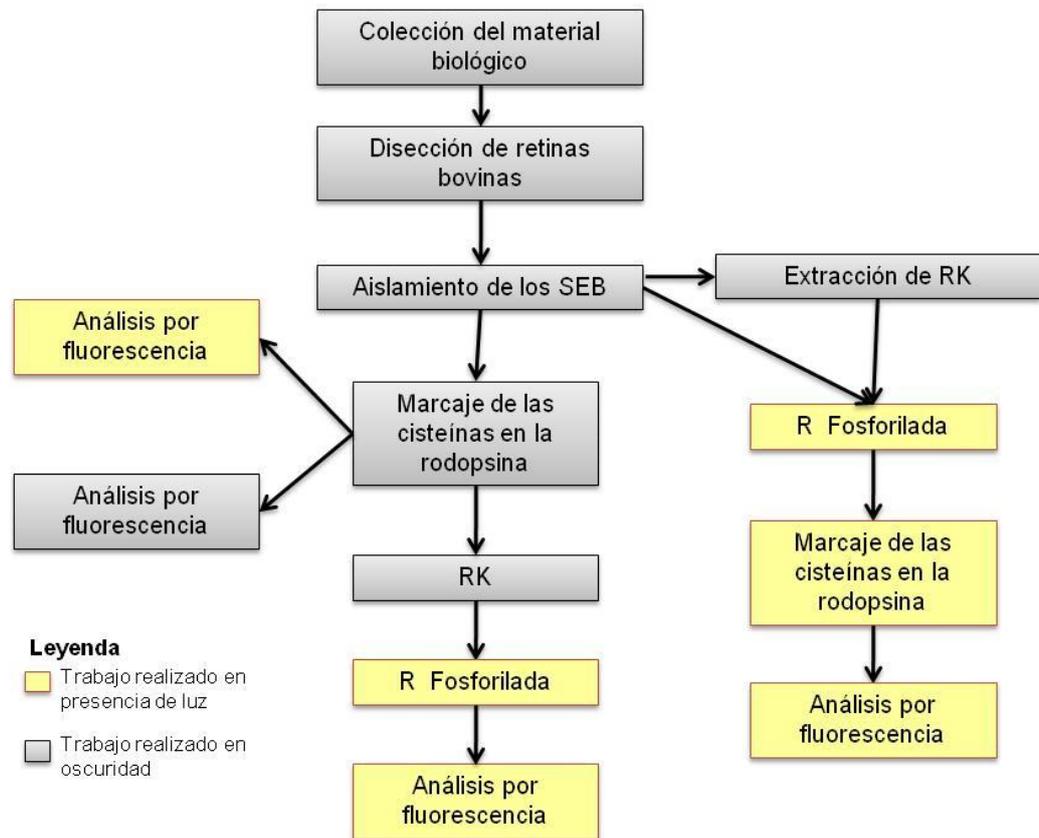


Figura 20. Esquema experimental

Inicialmente, para poder llevar a cabo la extracción de las retinas, fue necesario adquirir los ojos de bovinos en el matadero. Seguidamente y como se ilustra en la Figura 20, se aislaron los segmentos externos de los bastones (SEB), los cuales sirvieron como fuente para realizar los experimentos de marcaje de las cisteínas de la rodopsina con el fluoróforo, y para obtener una fracción enriquecida de rodopsina quinasa (RK).

Finalmente, se realizó el marcaje de los residuos de cisteínas de la rodopsina presentes en los SEB, de manera diferencial con el fluoróforo seleccionado bajo diferentes tratamientos (presentados en la Tabla 1). Estas muestras marcadas, fueron aisladas y analizadas fluorimetricamente.

Tabla 1. Condiciones del tratamiento para las muestras marcadas.

Muestras	Condiciones del tratamiento
A	Ausencia de luz (oscuridad) y marcada
B	Presencia de luz y marcada
C	Presencia de luz, marcadas y luego rodopsina quinasa (fosforilación)
D	Presencia rodopsina quinasa (fosforilación), y luego marcadas

5.1. Reactivos

Los reactivos en el siguiente trabajo de investigación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos

Marca	Reactivos
Amersham	concanavalina A sefarosa, albúmina de suero bovino (BSA)
Bio-Rad	acrilamida, N, N'-metilenbisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio(APS), reactivo de Bradford
Calbiochem	dibromobimano, monobromotrimetilamoniobimano
Himedia	Sacarosa
Invitrogen	marcadores de peso molecular preteñido, marcadores de peso molecular no preteñido, anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina, NP-40, anticuerpos anti IgG de ratón acoplados a peroxidasa
Merck	cloruro de sodio, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, ácido trifluoracético
Promega	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/ nitro azul de tetrazolio (BCIP/NBT), marcadores de peso molecular no preteñido, anticuerpos anti IgG de ratón conjugados a fosfatasa alcalina
Research Organic	fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Glicina
Riedel de Häen	ácido acético, 2-propanol, metanol
Sigma	ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris base), proteasa del Staphylococcus aureus (V8), n-dodecil-β-D-maltósido (DM), 2-mercaptoetanol, L-cisteína, monobromobimano, N-etilmaleimida, genapol X 100 (polietilen 10 tridecil éter), ácido sulfosalicílico
USB	dodecilsulfato de sodio, azul de coomasie R-250, tween-20, rojo de ponceau S, ácido N-(2-Hidroxietil)piperacina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), dodecil sulfato de sodio (SDS)

5.2. Equipos

En la Tabla 3, se pueden observar los diferentes equipos empleados durante la realización del presente estudio, así como también las casas comerciales en las cuales fueron manufacturados.

Tabla 3. Equipos

Marca	Equipos
Bekman	Espectrofotómetro UV-V (UD-40), Ultracentrífuga (rotor SW 32 Ti)
Hitachi	Fluorímetro
Owl Scientific	Cámaras de electroforesis, cámara de electrotransferencia
Polaroid Corporation	Cámara de fotografía NP-4
Sorvall	Centrífuga RC – Refrigered Superspeed (rotor SS-34)
UVP	Transiluminador luz blanca/ultravioleta
Adams Brand	Nutator (mezclador)

5.3. Disoluciones

Las disoluciones empleadas, variaron de acuerdo al proceso llevado a cabo (Tabla 4).

Tabla 4. Disoluciones empleadas en cada uno de los procesos efectuados

Proceso	Disoluciones
Purificación de los segmentos externo de los bastones (SEB)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Buffer Tris salino</i>: 25mM Tris-HCl (pH 7.4); 137mM NaCl; 2,68mM KCl. • <i>Buffer Isotónico A (moderada fuerza iónica)</i>: 100mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 6.8); 1mM Mg $(CH_3COO)_2$; 0,1mM PMSF; 5mM 2-mercaptoetanol. • <i>Soluciones de sacarosa</i>: 30% p/p en buffer isotónico A; 15% p/p en buffer isotónico A; 1,2 M ; 1,0M ; 0,84M y 0,64 M. en buffer isotónico A
Purificación de la rodopsina mediante resina Con A- Sefarosa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Buffer hipotónico</i>: 5mM Tris-HCl (pH 7.5); 5mM Mg $(CH_3COO)_2$; 5mM 2-mercaptoetanol. • <i>Buffer Yoshi</i>: 50mM HEPES (pH 6.6); 140mM NaCl; 3mM $MgCl_2$; 2mM $CaCl_2$; 20% v/v glicerol • <i>Buffer de solubilización</i>: Buffer Yoshi; 1% p/v n-dodecil-β-D-maltósido (DM). • <i>Buffer de la Columna</i>: Buffer Yoshi; 0, 1% p/v DM.
Separaciones por electroforesis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Buffer de muestra</i>: 62,5mM Tris-HCl (pH 6.8); 10% v/v glicerol; 2% p/v SDS; 5% v/v 2-mercaptoetanol; 0,001% p/v ; azul de bromofenol en agua. • <i>Buffer de corrida</i>: 25mM Tris-base; 192mM glicina; 0,1% p/v SDS; (pH 8.3). • <i>Solución colorante</i>: 0, 5% p/v azul de Coomassie; 25% v/v isopropanol; 10% v/v ácido acético glacial en agua en agua. • <i>Solución decolorante</i>: 25% v/v isopropanol; 10% v/v ácido acético glacial en agua. • <i>Gel de resolución</i>: 30% N,N'- metilen-bis-acrilamida (29,2% y 0,8%); 1,5M Tris-base (pH 8.8); 10% p/v SDS; 10% p/v APS; TEMED en agua. • <i>Gel de apilamiento</i>: 30% acrilamida-bis acrilamida; 1M Tris-base (pH 6.8); 10% p/v SDS; 10% p/v APS ; TEMED en agua.

Experimentos de Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Buffer transferencia:</i> 192mM glicina; 25mM Tris-HCl; 20% v/v metanol en agua; pH 8.3. •<i>Buffer Tris-salino con tween 20 (TBST):</i> 50mM Tris-HCl (pH 8.0); 150mM NaCl; 0,05 % v/v tween 20. •<i>Solución bloqueadora:</i> Buffer TBST con 5 %p/v leche descremada ó 3% p/v BSA. •<i>Buffer fosfatasa alcalina (AP):</i> 100mM Tris-HCl (pH 9.5); 100mM NaCl; 2mM MgCl₂. •<i>Solución de nitro azul de tetrazolio (NBT):</i>1,5% de NBT en 70% de DMF. •<i>Solución de 5-bromo-4-cloro-3-fosfatoindolin (BCIP):</i>1% de BCIP en 100% de DMF. •<i>Solución de tinción rojo ponceau:</i> 3% v/v ácido tricloroacético; 3% v/v ácido sulfosalicílico; 0,2% p/v rojo ponceau.
Marcaje de cisteínas con los fluoróforos	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Buffer de marcaje:</i> 5mM de MES; 50mM de HEPES; 1mM de EDTA; pH 6.7.
Fosforilación de la rodopsina	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Buffer de fosforilación:</i> 50mM Tris-HCl (pH 8.0); 5mM Mg (CH₃COO)₂; 20mM KF; 40mM ATP.
Solubilización de la rodopsina marcada	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Buffer de solubilización de la rodopsina:</i> buffer de marcaje en 1% p/v de DM

Es importante resaltar que el PMSF y el 2-mercaptoetanol se agregaron al momento de utilizar en los buffers que los contenía debido a que ambos se hidrolizan rápidamente en agua.

5.4. Colección del material biológico

Los ojos bovinos fueron trasladados desde la beneficiadora DIAGON C.A “Matadero Caracas” sector Las Adjuntas, carretera vieja de los Teques, hasta el Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Simón Bolívar, para ello se utilizaron bolsas plásticas negras colocadas en una cava con hielo. Antes de su disección los ojos fueron mantenidos durante 3 horas en oscuridad y en nevera a -4°C , tiempo requerido para que transcurriera la reconstitución metabólica de la rodopsina.

5.5. Extracción de las retinas bovinas

La disección de las retinas se realizó en un cuarto oscuro en presencia de luz roja. Cada ojo se sujetó fuertemente para así practicar una incisión de 1 a 2cm alrededor del iris con una hojilla, hasta proporcionar suficiente espacio y eliminar el humor vítreo. La cara interna del globo ocular de cada ojo fue rotada hacia el exterior, la cual se lavó con chorros fríos de buffer Tris salino hasta que se logró desprender dicho tejido, quedando el mismo suspendido como se muestra en la Figura 21. Posteriormente, las retinas fueron cortadas y colocadas en tubos de propileno. Los tubos contenían 25 retinas y fueron forrados en papel de aluminio y se almacenaron a -80°C .

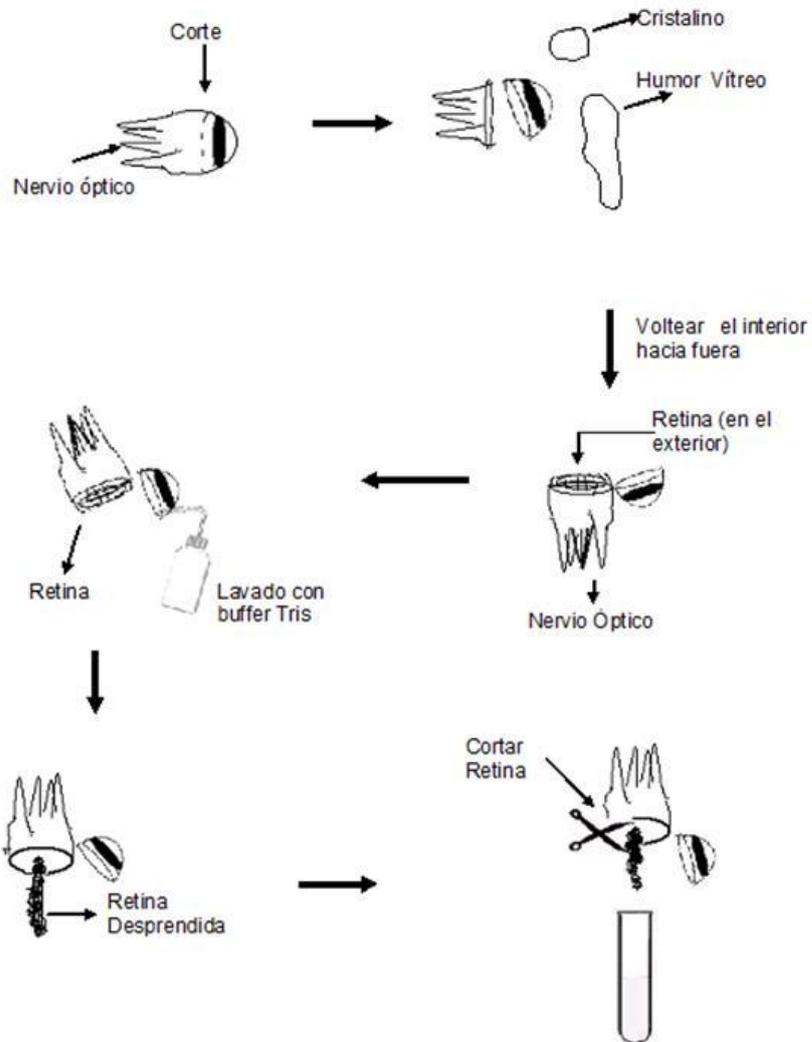


Figura 21. Esquema de extracción de las retinas bovinas

5.6. Aislamiento de los segmentos externos de los bastones (SEB), a partir de las retinas bovinas

Las membranas de los SEB fueron aisladas bajo luz roja a partir de las retinas bovinas por flotación y centrifugación en gradientes de sacarosa. Las soluciones de sacarosa fueron preparadas en buffer isotónico A ^[25].

Las retinas se descongelaron (100 retinas por cada preparación), agregándose 15ml de sacarosa al 30%p/p por cada 25 retinas presentes. Los tubos se homogenizaron con agitación vigorosa durante 1min en un Vortex, el homogenizado se centrifugó a 5000rpm (2987g) por 6min (Centrifuga RC-5B Sorvall con rotor SS-34). El sobrenadante obtenido, se colocó en un matraz conservado en hielo y oscuridad. Seguidamente se efectuó una reextracción con 15ml de sacarosa al 30%p/p sobre los sedimentos, y el nuevo sobrenadante obtenido se decantó en el mismo matraz ^[25].

Posteriormente, se duplicó el volumen de la suspensión final añadiendo lentamente buffer isotónico A (relación 1:1) mientras se agitaba lentamente, esto con la finalidad de reducir la concentración de sacarosa y evitar un choque osmótico. Se centrifugó a 10000rpm (11950g) por 10min (Centrifuga RC-5B Sorvall con rotor SS-34), el sedimento fue resuspendido en 40-50ml de sacarosa al 15%p/p y se dividió por igual en tubos de centrífuga de 50ml (4 tubos, en general). Con la ayuda de una inyectora de aguja larga (aguja N° 21) se añadió lentamente, de abajo hacia arriba, un volumen de sacarosa 0,64M igual que el volumen que originalmente contenía cada tubo de homogenizado y los tubos se volvieron a centrifugar a 10000rpm (11950 g) por 10min ^[25].

Los sedimentos que contenían los SEB, fueron resuspendido en 40-45ml de solución de sacarosa 0.64M mediante un homogenizador manual y pasándolo a través de una jeringa con aguja N° 21 ^[25].

Gradientes de Sacarosa:

Se prepararon seis gradientes de sacarosa en tubos de centrifuga (Tubos Ultra-Clear, 25x89mm de capacidad 40ml), colocando en el fondo de cada tubo 9ml de sacarosa 0,84M. Después se añadió lentamente, y por debajo de la solución de sacarosa 0,84M, 9ml de sacarosa 1,00M, para finalmente agregar lentamente 9ml de sacarosa 1,20M por debajo de la anterior, Figura 22.

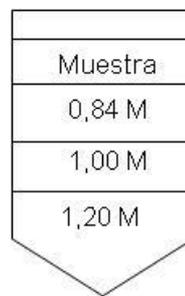


Figura 22. Gradientes de sacarosa

Luego se colocaron 9ml de los SEB resuspendidos en 0,64M de sacarosa en el tope del gradiente de sacarosa. Los tubos que contenían los gradientes, se centrifugaron a 25000rpm (64330g) por 35min a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman con un rotor SW 32 Ti.

Los SEB se reconocieron como una banda que se mantenía roja en oscuridad y cambiaba de color tornándose amarilla en presencia de luz, dicha banda se obtuvo en la interfase 0,84/1,00M de sacarosa. Esta interfase fue aspirada con una jeringa, introduciendo una aguja larga desde el tope del gradiente hasta el nivel donde esta interfase se encontraba. Las membranas de los SEB fueron diluidas con buffer isotónico A en una relación 1:1. Esta suspensión se centrifugó a 31100rpm (100000g) por 20min en una ultracentrífuga Beckman con un rotor SW 32 Ti, los sedimentos se resuspendieron en buffer isotónico A y se almacenaron en oscuridad a -80 °C hasta su manejo posterior.

5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

El análisis mediante SDS-PAGE se realizó según el método de Laemmli ^[26] con 10% ó 15% poliacrilamida en el gel de resolución. Para ello se emplearon los siguientes equipos y materiales: equipo de electroforesis para geles de poliacrilamida, placas de espesor igual a 1,5mm y marcadores de peso molecular (ver apéndice 10.3). La corrida de los geles se realizó a un voltaje constante igual a 80 voltios. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron teñidos en agitación constante con solución colorante y desteñidos con solución decolorante. Las imágenes de los geles fueron obtenidas mediante fotografías con una cámara de fotografía Analyst investigator eclipse con FOTDYNE incorporado.

5.8. Western Blots

Para la determinación específica de la rodopsina, el seguimiento de la rodopsina purificada y la rodopsina fosforilada, se siguió la metodología de electrotransferencia e inmunotinción ^[27]. Se electrotransfirieron las proteínas separadas en SDS-PAGE a papel de nitrocelulosa a 400mA por 2 horas, la presencia de las proteínas transferidas fue evidenciada mediante el uso de una solución de tinción conteniendo rojo Ponceau.

Antes de llevar a cabo la inmunotinción, fue necesario bloquear la membrana de nitrocelulosa con una solución que contenía leche descremada o BSA. Posteriormente se incubó el papel con un anticuerpo primario; y se realizaron varios lavados con buffer fosfatasa alcalina. Finalmente la nitrocelulosa fue incubada con un anticuerpo secundario, revelándose con una solución de BCIP/NBT y deteniéndose la reacción con agua. Para esta actividad, se emplearon marcadores preteñidos y así obtener el peso molecular de las proteínas separadas en el gel (ver apéndice 10.3).

5.9. Determinación de los espectros de absorción y concentración de rodopsina en las membranas de los SEB

La determinación de los espectros de absorción y la concentración de la rodopsina en los SEB, se realizó de la siguiente manera: a una alícuota de 50 μ l de los SEB se le agregó 50 μ l de una solución conteniendo 23,2mM de Nonidet-P40, 12,8mM de DM y 50 μ l de 1,5M de Genapol X-100 [28]. Esta mezcla se agitó en un vortex por 1min y se llevó a un volumen final de 500 μ l por adición de 350 μ l de agua destilada, obteniendo una dilución 1/10 de la muestra.

El espectro de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-V) de la rodopsina se realizó en un rango de 250-650nm en un espectrofotómetro Beckman en oscuridad. Una vez registrada la absorbancia, la muestra se expuso a irradiación intensa con un bombillo de 150Watt por 3min, registrando un segundo espectro bajo las mismas condiciones. La concentración de rodopsina en los SEB fue calculada a partir de la absorbancia a 500nm, utilizando su coeficiente de absortividad molar $\epsilon = 40700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y peso molecular igual a 39007,70 g/mol (ver apéndice 10.4 para un modelo de cálculo) [28].

5.10. Determinación de proteínas

La concentración de proteína fue determinada mediante el método de enlace de azul de coomassie. Este método está basado en el cambio de color del colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El cual inicialmente es de color rojo y cambia a azul cuando se une a la proteína (complejo colorante proteína) [29]. Se utilizó albumina de suero bovino (BSA) para preparar la curva de calibración, y se midió la absorbancia de las muestras a 595nm.

5.11. Preparación de una fracción enriquecida en rodopsina quinasa (RK)

Esta preparación se realizó el mismo día en que se requería la rodopsina fosforilada. Las membranas de los SEB conteniendo (15-20 μ g de rodopsina) se centrifugaron en buffer isotónico A, a 31100rpm (100000g) durante 30min en una ultracentrífuga Beckman con rotor SW 32 Ti, en oscuridad a 4 °C. Con una aguja larga se resuspendieron dos veces los sedimentos en 500 μ l de buffer hipotónico, y se centrifugaron por 20min a 100000g en oscuridad. Los sobrenadantes contenían los extractos enriquecidos en RK, los cuales se utilizaron frescos, debido a que con el tiempo de almacenamiento se observó la pérdida de la actividad de la quinasa^[30].

5.12. Preparación de la rodopsina fosforilada

Las muestras de rodopsina se fosforilaron empleando una mezcla que contenía 50 μ l de RK, 20 μ g de SEB y buffer de fosforilación. La mezcla se iluminó con un bombillo de 150Watt en agitación constante con un Nutator por 30min. Luego las muestras fosforiladas fueron centrifugadas a 31100rpm (100000g) durante 20min en una ultracentrífuga Beckman con rotor SW 32 Ti, obteniéndose los sedimentos fosforilados^[30].

5.13. Proteólisis con proteasa V8 del *Staphylococcus aureus*

La proteasa V8 es capaz de romper a la rodopsina entre los residuos Glu 239-Ser 240 y Glu 341-Thr 342 (Figura 23), generando los fragmentos F1 (27kDa) y F2 (13kDa) como los principales productos de proteólisis de la rodopsina ^[31]. La proteólisis se realizó usando rodopsina:proteasa V8 en una relación 20:1, y las muestras se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. La reacción se detuvo con buffer muestra, y la formación de los fragmentos F1 y F2 se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

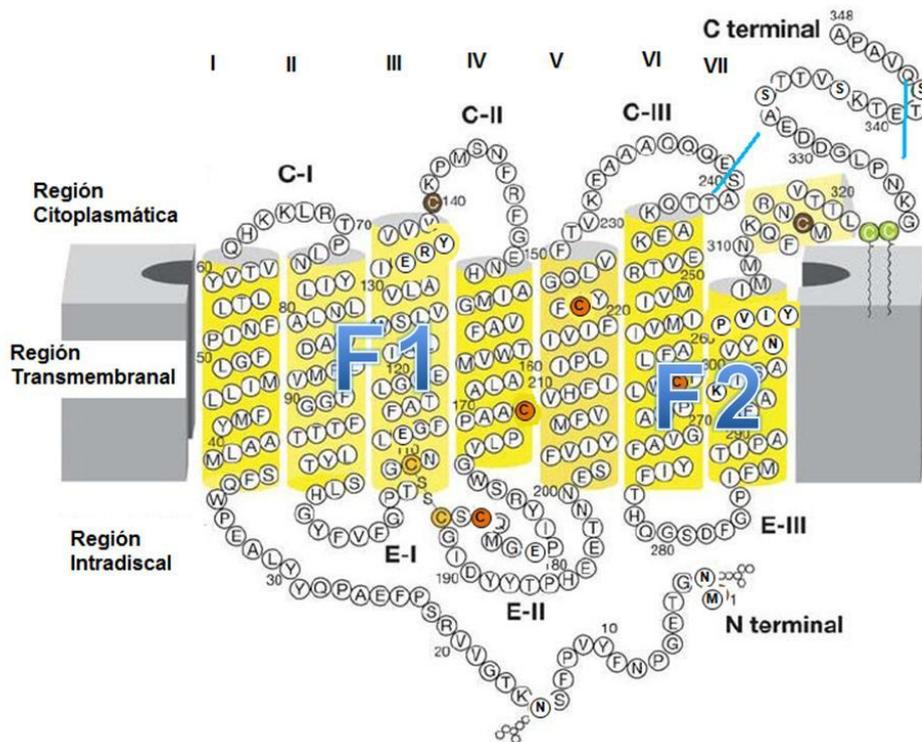


Figura 23. Representación esquemática de los sitios donde se rompe la molécula de rodopsina por la proteasa V8 (azul) ^[31]. Como se puede observar, la Cys 140 permanece en el fragmento F1 mientras que la Cys 316 permanece en el fragmento F2.

5.14. Purificación de la rodopsina bovina a partir de los SEB y cuantificación por UV-V

Antes de iniciar la purificación de los SEB, a 1ml de la resina Concanavalina A sefarosa se le realizaron 10 lavados de 1ml cada uno con buffer de columna.

Todo el procedimiento de purificación se realizó en un cuarto oscuro y bajo condiciones refrigeradas. Los SEB se lavaron una vez con buffer hipotónico para eliminar las proteínas periféricas. Esta muestra se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman en oscuridad, a 4 °C por 25min. El sobrenadante se descartó y el sedimento contenía los SEB lavados enriquecidos en rodopsina ^[32].

El sedimento se disolvió en 500µl de buffer de solubilización y se agitó con un vortex por 5 min. La solubilización de la rodopsina se determinó espectroscópicamente por UV-V, utilizándose como blanco 50µl de buffer de solubilización más 50µl de buffer hipotónico y 400µl de agua destilada. La fracción conteniendo a la rodopsina solubilizada fue diluida 1:10 con buffer Yoshi, para reducir la concentración de DM a 0,1 % v/v, y la mezcla se centrifugó a 100000g (31100rpm) durante 30min a 4 °C, El sedimento obtenido, fue re-extraído de la misma forma y la combinación de los sobrenadantes resultantes se mezcló con la resina Con A sefarosa, dejándose en agitación constante durante toda la noche en el Nutator. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 2500rpm por 5min, el sobrenadante fue descartado y la resina lavada 5 veces con buffer de columna ^[32].

Para extraer la rodopsina se mezcló la resina 1:1 con buffer columna que contenía 0,5M de α -metil- β -manopiranosido y se dejó agitando durante toda la noche a 4°C en oscuridad. Finalmente se centrifugó a 2500rpm por 5min, obteniendo la rodopsina purificada contenida en el sobrenadante, la cual fue determinada espectroscópicamente utilizándose como blanco 50µl α -metil- β -manopiranosido y 450µl de agua destilada ^[32].

5.15. Escogencia del fluoróforo para el marcaje de las cisteínas en la rodopsina

Para marcar los residuos de tioles en las proteínas fueron empleados el monobromobimano (mBBr), el dibromobimano (dmBBr) y el monobromotrimetilamoniobimano (qmBBr). Estos derivados de bimano, no tienen fluorescencia intrínseca, pero al reaccionar mediante marcaje covalente (Figura 24) con los grupos tiol de las cisteínas, se vuelven fluorescentes ^[21]. El seguimiento de este marcaje se llevó a cabo mediante la corrida de geles de poliacrilamida, y antes de ser teñidos se visualizaron en un transiluminador bajo luz la ultravioleta (UV).

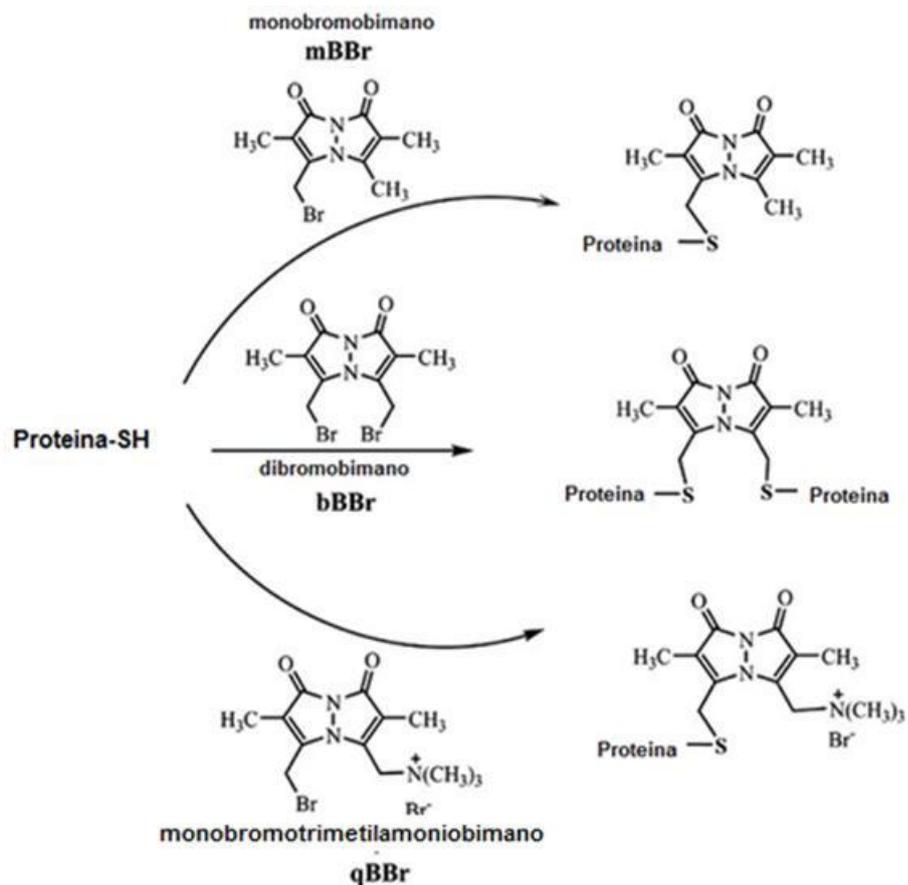


Figura 24. Marcaje de grupos tiol con reactivos derivados de bimano mBBr, dmBBr y qmBBr ^[21].

5.16. Marcaje de cisteínas 140 y 316 en la rodopsina

En oscuridad, los sedimentos de los SEB (2-4mg) fueron centrifugados y lavados en buffer de marcaje. La centrifugación se realizó a 31100rpm (100000g) por 20min en una ultracentrífuga Beckman, (todas las centrifugaciones posteriores se realizaron en la misma ultracentrífuga). El sedimento se incubó con el fluoróforo (mBBr, bBBr o qmBBr) en buffer de marcaje en un exceso de 20 veces la concentración molar de la rodopsina, durante toda la noche a 4°C en agitación constante en un Nutator. Al día siguiente, la mezcla de reacción se centrifugó a 100000g durante 20min, realizándose el primer lavado en buffer de marcaje, un segundo lavado en buffer de marcaje conteniendo una concentración de L-cisteína 20 veces mayor a la concentración de la rodopsina, para así eliminar el exceso del fluoróforo. Posteriormente, se efectuó un tercer lavado en buffer de marcaje y se centrifugó. El sedimento contenía los SEB marcados con el fluoróforo, los cuales fueron resuspendidos en buffer de solubilización de la rodopsina, para su posterior análisis en el fluorímetro ^[5].

La comprobación de los SEB marcados en las Cys 140 y Cys 316 se realizó tratando las muestras con proteasa V8 y mediante la corrida de un gel de SDS-PAGE. Al hacer incidir radiación UV a través de un transiluminador.

5.17. Marcaje selectivo de la rodopsina en la Cys 140

Los sedimentos de los SEB (2-4mg) fueron lavados en oscuridad con buffer de marcaje, para luego centrifugarlos durante 20min con el fin de bloquear el marcaje de la Cys 316, se procedió a incubar a los SEB lavados por 5min con N-etilmaleimida, en una concentración 100 veces mayor a la concentración molar de la rodopsina ^[4]. Posteriormente la muestra se incubó con mBBr de la manera descrita en la sección 5.15. La muestra fue finalmente centrifugada y analizada ^[4-5].

La comprobación del marcaje selectivo se realizó de la misma manera descrita en la sección 5.16.

5.18. Marcaje selectivo de la rodopsina en la Cys-316

Para este marcaje, se siguió el mismo procedimiento mencionado en el apartado 5.16, con la excepción de que el tiempo de incubación con el fluoróforo fue igual a 5min. A fin de detener la reacción, se agregó N-etilmaleimida en una concentración 100 veces mayor a la concentración molar de rodopsina ^[4-5].

La comprobación del marcaje selectivo se realizó de la misma manera descrita anteriormente.

5.19. Análisis por espectroscopía de fluorescencia

Los derivados de bimanos unidos a los grupos sulfhidrilos de las proteínas fluorescen y tienen una excitación máxima entre 300 y 400nm, y un pico de emisión por encima de los 450nm ^[33].

Los barridos de excitación de fluorescencia se realizaron en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) bajo la supervisión del Profesor Gustavo Benaím y la Licenciada May Li Silva. Este proceso se llevó a cabo en un Fluorímetro HITACHI F-700, con lámpara de Xenón a una temperatura de 37 °C mantenida mediante un baño Lauda Alpha A12.

A las diferentes muestras de rodopsina marcadas con el fluoróforo, se les determinó su espectro de fluorescencia, para lo cual fue necesario medir la excitación entre 300nm y 450nm y la emisión de 470nm en una cubeta de 500µl, utilizando como blanco, buffer de solubilización.

5.20. Análisis computacionales utilizando las estructuras tridimensionales de la rodopsina en su estado inactivo y en su estado activo

El análisis de las distancias moleculares entre los residuos de la rodopsina, fue realizado sobre la estructura cristalina de la R bovina depositada en el banco de datos de proteínas (BDP). Para ello, se emplearon los identificadores 1U19 y 1JFP, para la rodopsina y para el estado Meta II, respectivamente. Para llevar a cabo estos análisis fue necesario utilizar el programa de visualización y estudio de macromoléculas Rasmol versión 2.7.1.1 ^[30].

5.21. Determinación “In Silico” de las distancias aproximadas entre las cisteínas modificadas con mBBr y las serinas fosforiladas

Para analizar las distancias entre los residuos derivados de cisteínas y serinas se empleó el programa HyperChem 7.52 Molecular Modeling System.

6. RESULTADOS

6.1. Aislamiento de los segmentos externos de los bastones (SEB) a partir de las retinas bovinas

Durante el proceso de preparación de los SEB, a partir de las retinas bovinas, se tomaron fracciones de cada paso y se realizó un gel de SDS-PAGE, con el fin de determinar la fracción enriquecida en SEB.

En la Figura 25 puede observarse la imagen resultante del gel de SDS-PAGE de 10% de resolución, en el cual se identifica una banda de aproximadamente 40KDa en la FB, la cual corresponde a la fracción de los gradientes de sacarosa que flota en la interfase entre 0,84M/1,00M. Tomando como base que el peso molecular de la rodopsina es de aproximadamente 40000Da, este resultado sugiere que la fracción FB está enriquecida en rodopsina. El resto de las fracciones como se puede ver en la Figura 25, contiene muy poca cantidad de esta banda.

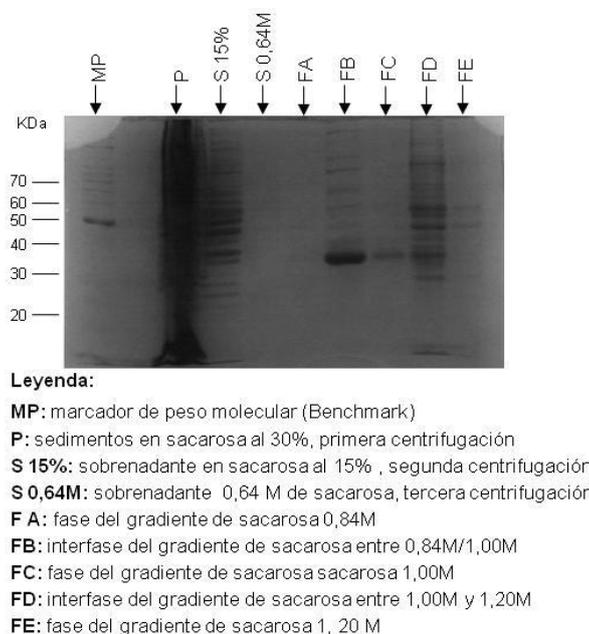
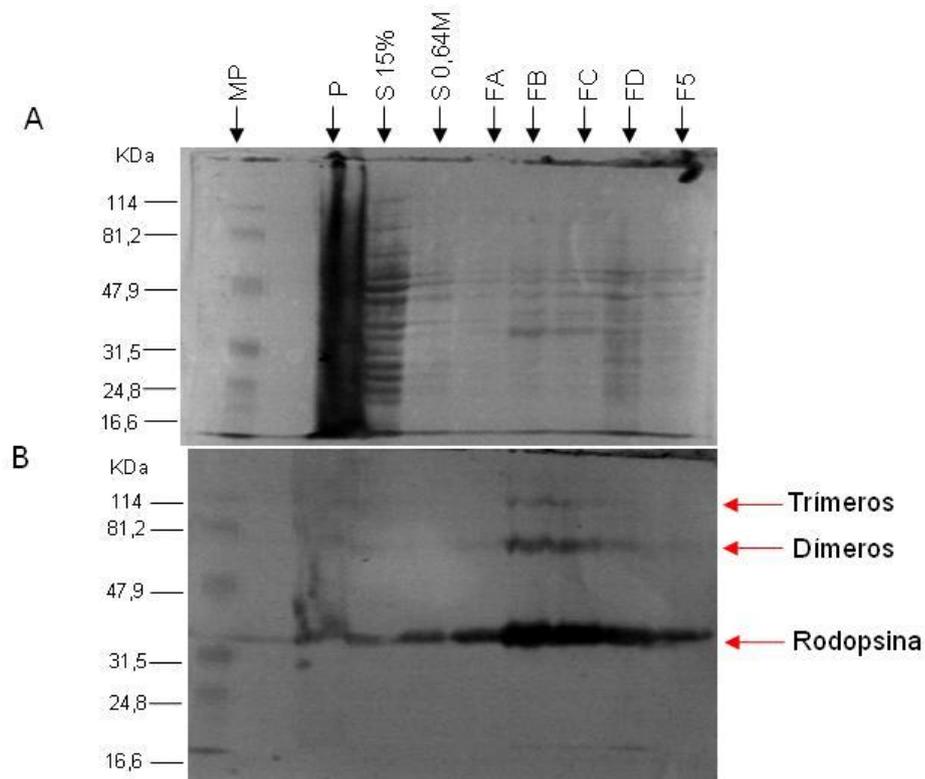


Figura 25. Gel teñido con azul de coomassie mostrando la separación electroforética de las fracciones obtenidas durante la preparación de los SEB.

Para comprobar si la banda de 40 KDa observada en el carril FB del gel de electroforesis, era rodopsina, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (Figura 26A) y se utilizaron anticuerpos específicos antirodopsina.

El primer anticuerpo utilizado fue un anticuerpo policlonal antirodopsina preparado en líquido ascítico del ratón, el cual reconoce rápidamente a la rodopsina. Este anticuerpo fue preparado en el Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Simón Bolívar, por el Bachiller Iván Bello durante la realización de su trabajo especial de grado para optar al título de Licenciado en Biología. La antirodopsina obtenida en ratón, se utilizó con una concentración de 1:1000, y como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina en una concentración 1:3000.

La Figura 26B muestra el Western Blot, observándose que la banda mayoritaria de aproximadamente 40KDa fue reconocida por los anticuerpos. Adicionalmente se observa la presencia de dímeros y trímeros de la proteína rodopsina, fenómeno que ha sido reportado previamente en otros estudios ^[34].



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market)

P: sedimentos en sacarosa al 30%, primera centrifugación

S 15%: sobrenadante en sacarosa al 15% , segunda centrifugación

S 0,64M: sobrenadante 0,64 M de sacarosa, tercera centrifugación

FA: fase del gradiente de sacarosa 0,84M

FB: interfase del gradiente de sacarosa entre 0,84M/1,00M

FC: fase del gradiente de sacarosa 1,00M

FD: interfase del gradiente de sacarosa entre 1,00M y 1,20M

FE: fase del gradiente de sacarosa 1,20 M

Figura 26. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante el aislamiento de los SEB.

A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas constituyentes de las diferentes fracciones teñida con rojo Ponceau. **B:** Western Blot utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal antirodopsina preparado en el líquido ascítico de ratón.

El experimento se repitió con un anticuerpo monoclonal ID4, en una concentración 1:60000. el cual reconoce una sola región en la proteína correspondiente a los últimos 18 aminoácidos del carboxilo terminal de la rodopsina ($=^+H_3N\text{-Asp-Glu-Ala-Ser-Thr-Thr-Val-Ser-Lys-Thr-Glu-Thr-Ser-Gln-Val-Ala-Pro-Ala-COO}^-$) [34].

En la Figura 27A se muestra la correcta transferencia del gel de SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa. En la Figura 27B se evidencia el reconocimiento la rodopsina por el anticuerpo ID4. De igual manera que el Western Blot anterior se observan los dímeros y trímeros que presenta la muestra enriquecida en rodopsina.

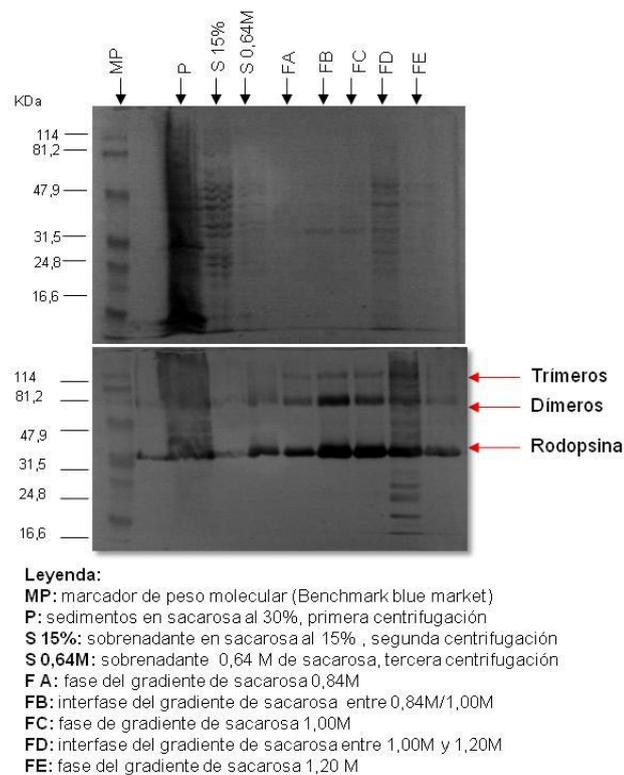


Figura 27. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante el aislamiento de los SEB.

A: Correcta trasferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas constituyentes de las diferentes fracciones teñida con rojo Ponceau. **B:** Western Blot utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal ID4.

De esta manera se comprobó inmunológicamente que la interfase 0,84M/1,00M del gradiente de sacarosa contiene a los SEB, pues este es el compartimiento en el cual se encuentra la rodopsina.

6.2. Determinación de los espectros de absorción de rodopsina en las membranas de los SEB

La rodopsina posee una señal característica a 500nm y a 280nm correspondiente al cromóforo y a la proteína, respectivamente. Luego de obtener la fracción enriquecida de rodopsina presente en los SEB, se pudo observar mediante un espectro de absorción (Figura 28) que en presencia de luz el pico máximo del cromóforo se desplazó de 500nm a 380nm, lo cual es característico del cambio conformacional que sufre la proteína una vez que está fotoactivada. A partir de la absorbancia se determinó la concentración de la rodopsina mediante su coeficiente de absorptividad molar^[28] (ver apéndice 10.4).

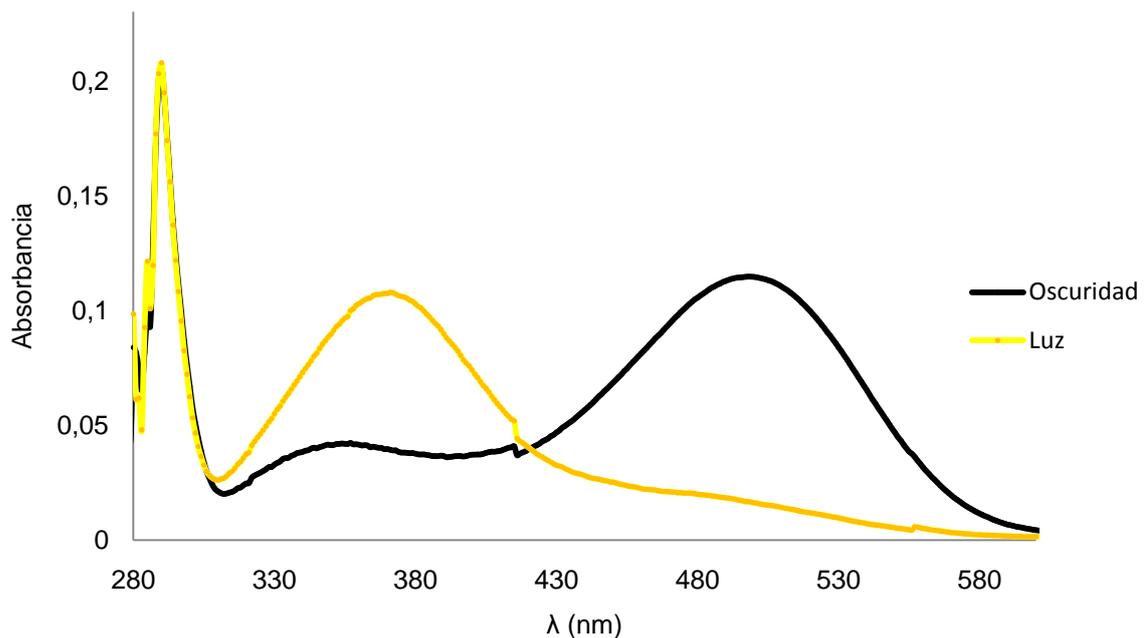


Figura 28. Espectro de absorción en oscuridad y en luz de la rodopsina en los SEB.

Se realizaron 4 preparaciones de SEB de 100 retinas cada una. El cociente de absorbancia $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$ de la rodopsina en los SEB, reportado en las distintas preparaciones realizadas (Tabla 5) fluctuó entre 1,72 y 1,95. Las proteínas en general presentan absorbancia a 280nm, la cual es característica de su contenido de residuos aromáticos. Al igual que otras proteínas, la rodopsina también presenta una banda de absorbancia a 280nm que es consecuencia de los residuos de Trp, Tyr y Phe que contiene. Sin embargo, la absorbancia de 500nm es producida específicamente por la interacción del 11-*cis*-retinal con los aminoácidos presentes en su bolsillo de enlazamiento dentro de la rodopsina. *Hong et al* ^[35] mostraron que la rodopsina purificada a homogeneidad por cromatografía a través de una columna de hidroxapatita presentaba un cociente de absorbancia $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}} = 1,6-1,7$. Al comparar el valor obtenido en el presente trabajo para los SEB, los cuales representan una fracción enriquecida en rodopsina se puede concluir que los SEB se hallaban poco contaminados con otras proteínas diferentes a rodopsina. En otras palabras, el cociente $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$ demuestra que durante la purificación de los SEB se eliminaron muchas de las otras proteínas que los conforma quedando enriquecidas principalmente de rodopsina.

Tabla 5. Determinación de la concentración de la rodopsina en las membranas de los SEB

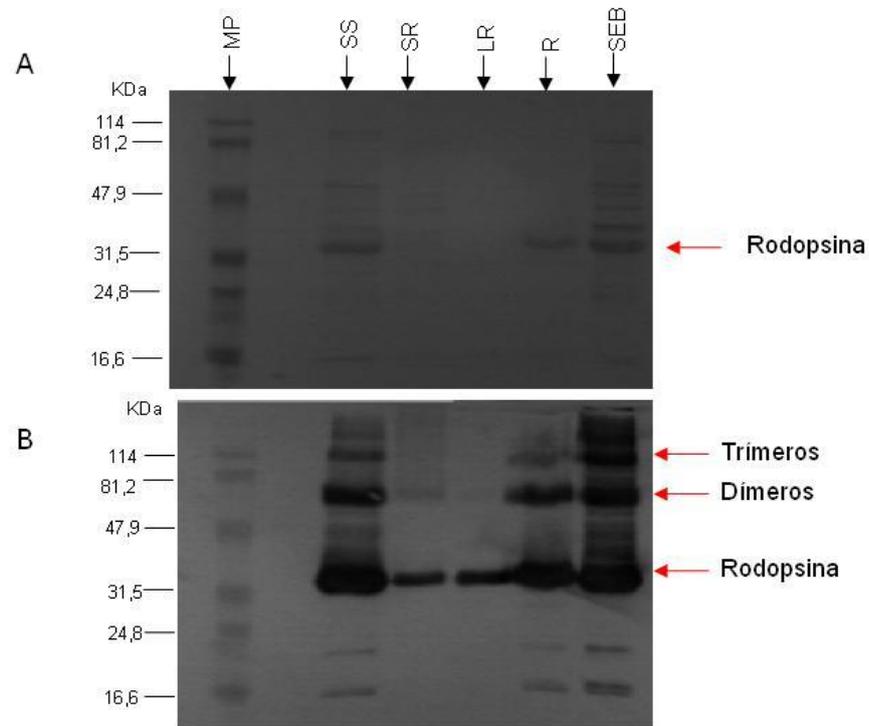
	Muestra #1	Muestra #2	Muestra #3	Muestra #4
Relación espectral ($A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$)	1,72	1,95	1,81	1,70
Concentración de la rodopsina utilizando coeficiente de extinción molar de la proteína (mg/ml)	2,96	0,95	1,13	0,80
Concentración de la rodopsina (mg)	29,60	19,03	11,27	11,98

6.3. Purificación de la rodopsina bovina a partir de los SEB

La purificación de la rodopsina se realizó a partir de los SEB, mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina Con A sefarosa ^[32]. La obtención de la rodopsina se siguió, mediante análisis de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal ID4.

La correcta transferencia del gel de electroforesis a la membrana de nitrocelulosa es observada en la Figura 29A. En la fracción SS (SEB solubilizados), se puede observar como el detergente DM solubilizó principalmente a la banda de aproximadamente 40KDa correspondiente a la rodopsina. Los lavados en buffer hipotónico ayudaron a eliminar a las otras proteínas de los SEB dado que casi no se observan otras bandas aparte de la rodopsina.

Al ser incubada la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal ID4, se observó el reconocimiento de la rodopsina, tanto en los SEB como en la fracción SS, como se muestra en la Figura 29B. Con este experimento se puede concluir que el detergente DM aísla y solubiliza a la proteína de la membrana de los SEB de manera satisfactoria. También se puede ver que la fracción de los SEB que eluye de la resina con α -metil- β -manopiranosido (fracción R) contiene a la rodopsina. La fracción de oligómeros de la rodopsina también es evidente en la Figura 29B.

**Leyenda:**

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market).
 SS: SEB solubilizados
 SR: sobrenadante de la resina, lo que no se pegó a la resina
 LR: Lavados de la resina
 R: rodopsina purificada, lo que eluyó
 SEB: segmentos externos de los bastones

Figura 29. Separación electroforética de las fracciones obtenidas durante la purificación de la rodopsina por cromatografía de afinidad.
A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas obtenidas durante la purificación de la rodopsina bovina a partir de los SEB, teñida con rojo Ponceau. **B:** Western Blot de las fracciones obtenidas durante la purificación de la rodopsina bovina a través de cromatografía de afinidad, utilizando como anticuerpo el monoclonal ID4.

La solubilización y purificación de la rodopsina se siguieron por espectroscopía UV-V, y en la Figura 30A y 30B se observa la absorbancia característica de la rodopsina en los SEB solubilizados, y el espectro de la rodopsina eluida de la resina, respectivamente, observándose la absorbancia característica de R a 500nm.

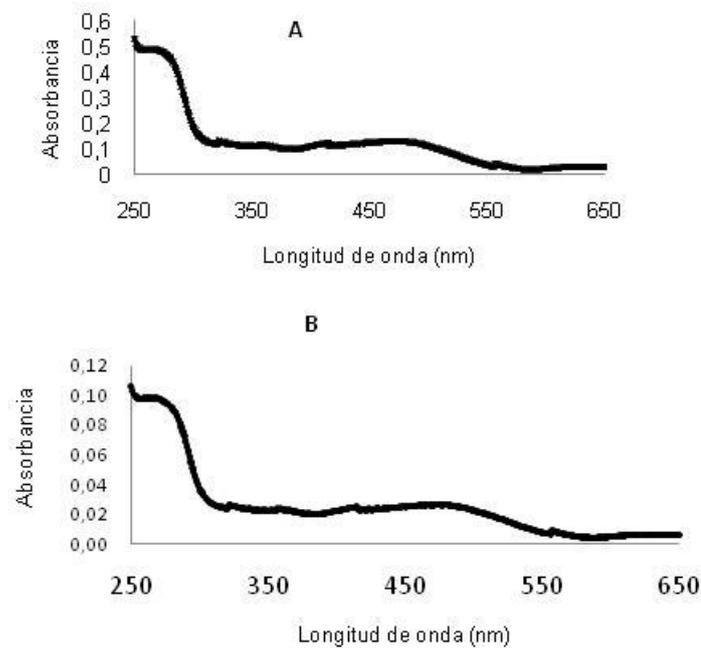


Figura 30. Espectros UV-V del proceso de purificación de de la rodopsina.
A: Espectro de la fracción de los SEB solubilizados con el detergente DM.
B: Espectro de la rodopsina purificada, luego de que fue eluida por la resina.

6.4. Preparación de la rodopsina fosforilada para su posterior marcaje

La enzima RK es una proteína periférica localizada en las membranas de los SEB. Mediante lavados de los SEB con soluciones hipotónicas se puede preparar una fracción enriquecida en RK, como fue demostrado por *Medina et al.* [30]. Es por ello que con el fin de preparar una fracción enriquecida en RK, los SEB se lavaron con solución hipotónica en un cuarto oscuro, y luego de realizar los pasos de centrifugación correspondientes se separaron en los sobrenadantes los extractos enriquecidos en RK. Alícuotas del extracto enriquecido en RK se mezcló con buffer de fosforilación y mediante la aplicación de experimentos de Western Blot utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina, se pudo comprobar satisfactoriamente el proceso de fosforilación de la rodopsina. Inicialmente, se observó que los anticuerpos antirodopsina reconocieron a la rodopsina tanto en su forma fosforilada como sin fosforilar (Figura 31B, 31C).

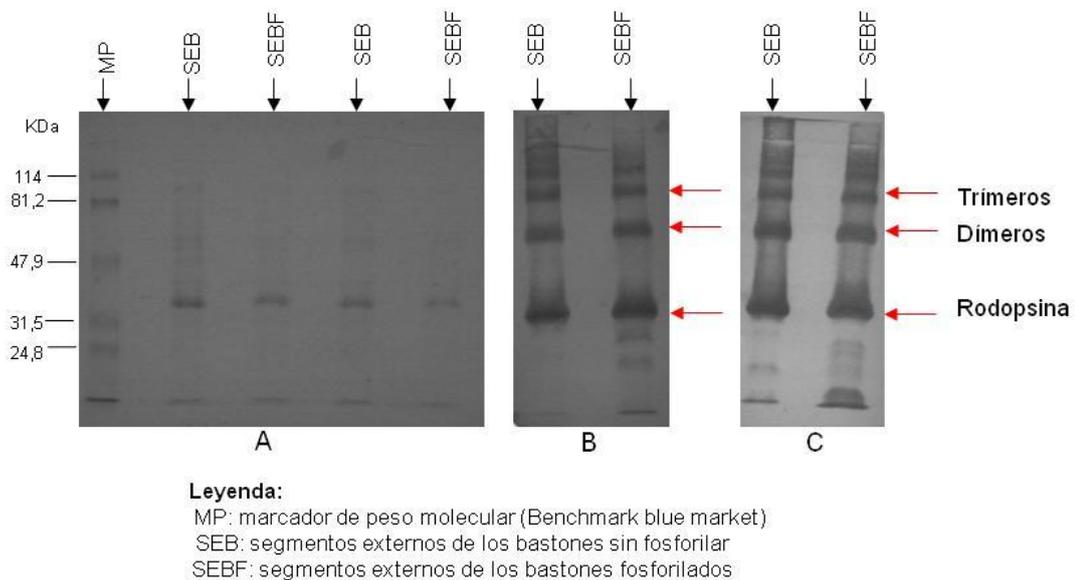
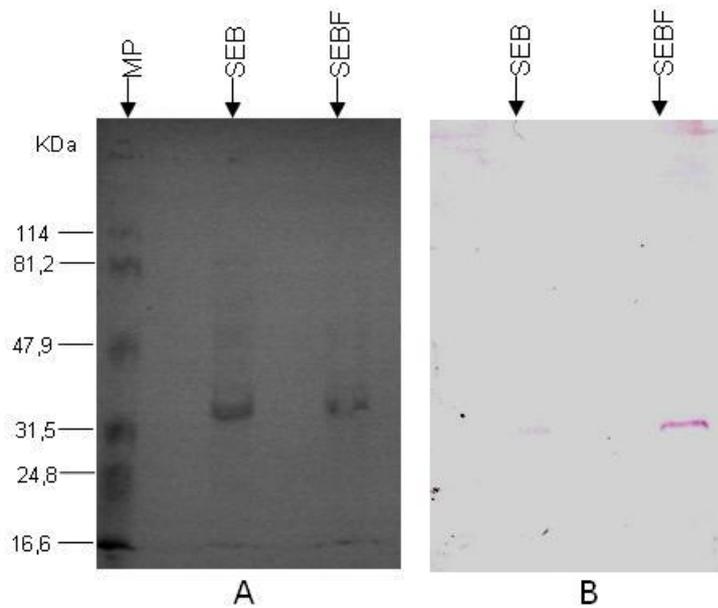


Figura 31. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por los anticuerpos antirodopsina e ID4.

A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas sin fosforilar y fosforilada, teñida con rojo Ponceau. **B:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada y sin fosforilar por el anticuerpo policlonal antirodopsina. **C:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada y sin fosforilar por el anticuerpo monoclonal ID4.

Al realizar un Western Blot, utilizando el anticuerpo anti-fosfoserina en una dilución 1:125, como anticuerpo primario, se pudo apreciar que este anticuerpo reconoció la proteína fosforilada (Figura 32B).



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market)

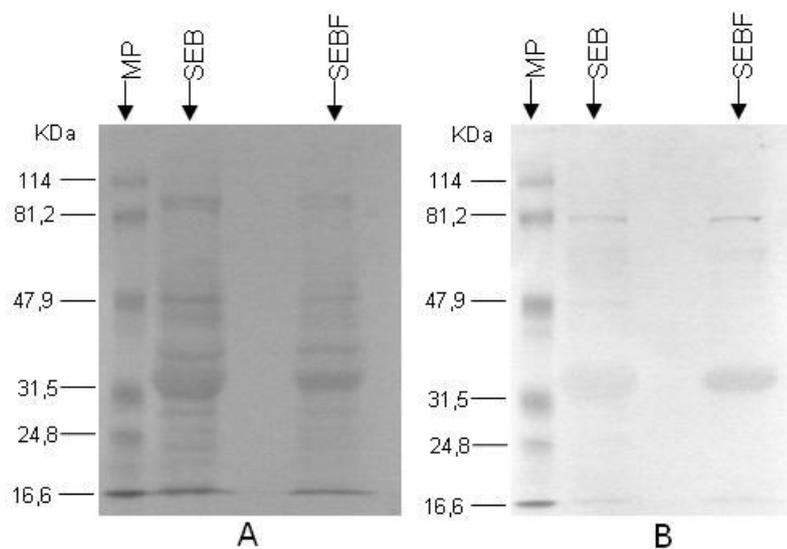
SEB: segmentos externos de los bastones sin fosforilar

SEBF: segmentos externos de los bastones fosforilados

Figura 32. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por el anticuerpo anti-fosfoserina.

A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas sin fosforilar y fosforilada, teñida con rojo Ponceau. **B:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada mediante el anticuerpo anti-fosfoserina.

En la Figura 33B, se muestra como el anticuerpo anti-fosfotreonina en una dilución 1:125, empleado en el Western Blot, también reconoce a la proteína fosforilada. Dado que los residuos que son fosforilados en la rodopsina corresponden exclusivamente a residuos de serina, el reconocimiento obtenido por este anticuerpo es posiblemente inespecífico.



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market)

SEB: segmentos externos de los bastones sin fosforilar

SEBF: segmentos externos de los bastones fosforilados

Figura 33. Reconocimiento de la rodopsina fosforilada por al anticuerpo anti-fosfotreonina. **A:** Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas sin fosforilar y fosforilada, teñida con rojo Ponceau. **B:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada mediante el anticuerpo anti-fosfotreonina.

6.5. Escogencia del fluoróforo para el marcaje de las cisteínas de la rodopsina

El marcaje de la rodopsina se llevó a cabo con tres compuestos derivados del bimano: monobromobimano (mBBr), dibromobimano (dmBBr) y monobromotrimetilamonibimano (qmBBr). Los tres fluoróforos fueron tratados con la proteasa V8 y el gel de electroforesis fue sometido a radiación ultravioleta (UV), esto con la finalidad de evidenciar la fluorescencia emitida y así dependiendo de la intensidad de la misma, poder escoger el mejor fluoróforo para ser utilizado en los análisis posteriores.

Se pudo observar que al someter el gel de electroforesis a radiación UV en un transiluminador (Figura 34), la rodopsina fluoresció con mayor intensidad bajo el marcaje del monobromobimano (mBBr). En todos los ensayos se usó la misma cantidad de rodopsina, la cual fue calculada en base a su absorbancia a 500 nm y su coeficiente de absortividad molar ^[28]. El método de Bradford ^[29] también se empleó para verificar la concentración de la rodopsina utilizada.

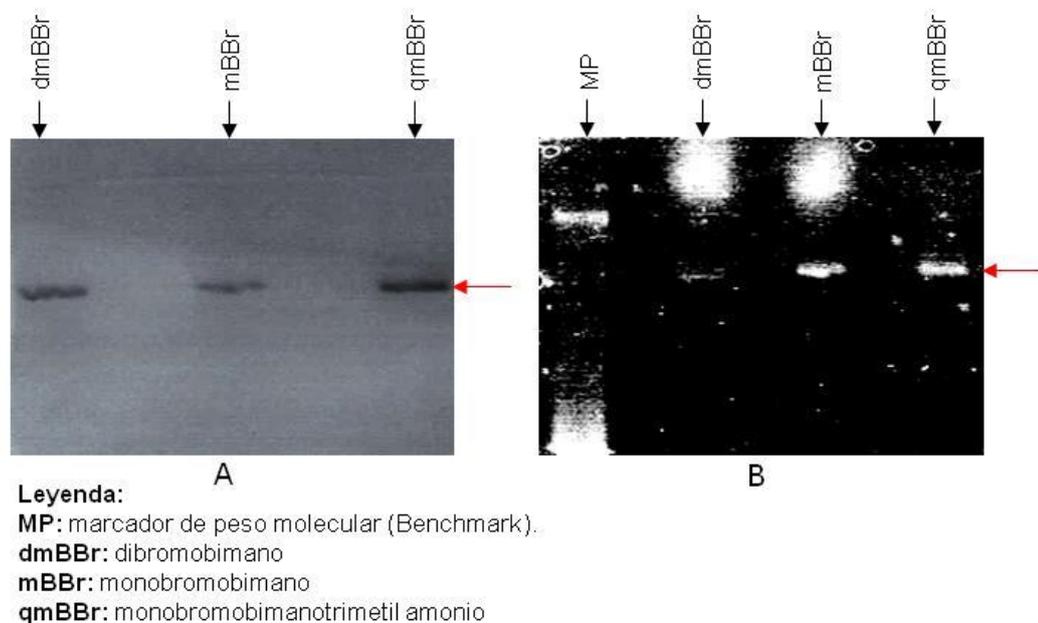
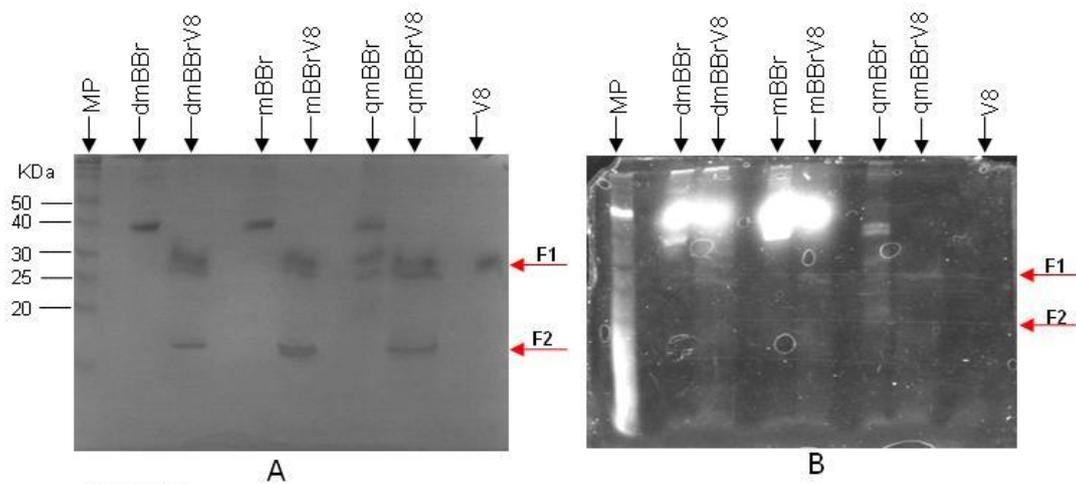


Figura 34. Escogencia del fluoróforo a utilizar para el marcaje posterior de las cisteínas de la rodopsina.
A: Gel al 10% teñido con azul de coomassie. **B:** Marcaje de las cisteínas de la rodopsina con los reactivos fluorescentes.

Por otra parte, en la Figura 35B se pueden apreciar los fragmentos, F1 y F2, que se originan cuando la proteína fue tratada con la proteasa V8. Este experimento muestra que ambas cisteínas, Cys140 y Cys316, están marcadas por los tres derivados, puesto que tanto F1 como F2 muestran fluorescencia en el gel. La Figura 35B también muestra como la proteasa V8 no presenta fluorescencia por si sola.



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark)

dmBBr: dibromobimano

dmBBrV8: dibromobimano + proteasa V8

mBBr: monobromobimano

mBBrV8: monobromobimano+ proteasa V8

qmBBr: monobromotrimetilamoniobimano

qmBBrV8: monobromotrimetilamoniobimano+ proteasa V8

V8: proteasa que divide a la rodopsina con una relación 20:1

Figura 35. Proteólisis con la proteasa V8 de la rodopsina marcada con dmBBr, mBBr y qmBBr.

A: Gel al 15% teñido con azul de coomassie. **B:** Marcaje de las cisteínas de la rodopsina con los reactivos fluorescentes y su subsecuente tratamiento con la proteasa V8.

Seguidamente, se analizaron los espectros de las muestras marcadas con los reactivos fluorescentes en oscuridad. En razón al alto nivel de pureza de la rodopsina en los SEB, no fue necesario purificar a la rodopsina por cromatografía a través de Con A sefarosa, sino que luego de hacer los lavados correspondientes, la proteína fue simplemente solubilizada en presencia de DM, con una cantidad de 0,15mg para cada experimento.

Al hacer un análisis comparativo entre las gráficas obtenidas (Figura 36), fue notable observar que la intensidad de fluorescencia en la muestra modificada con mBBr (unidades arbitrarias de fluorescencia de 188), fue mucho mayor que la señal obtenida cuando se usó dmBBr y qmBBr (unidades arbitrarias de 107 y 150, respectivamente). En consecuencia, mBBr fue seleccionado para todos los experimentos posteriores.

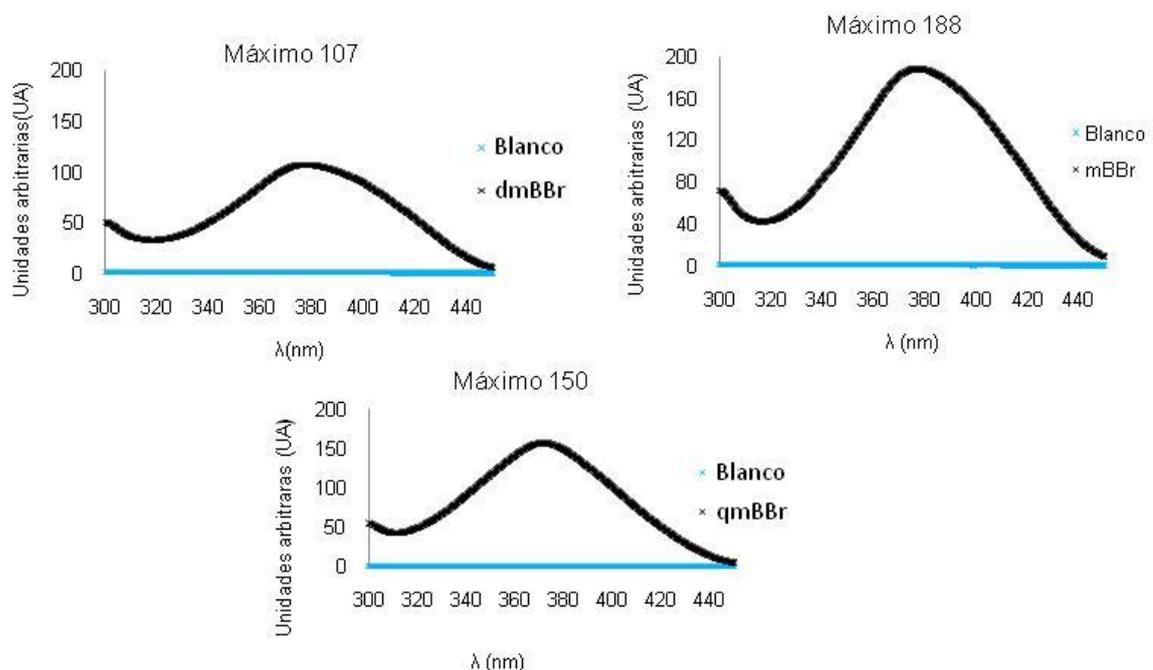


Figura 36. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada con los tres fluoróforos derivados del bimano. En todos los casos se empleó una muestra de 0,15mg de rodopsina.

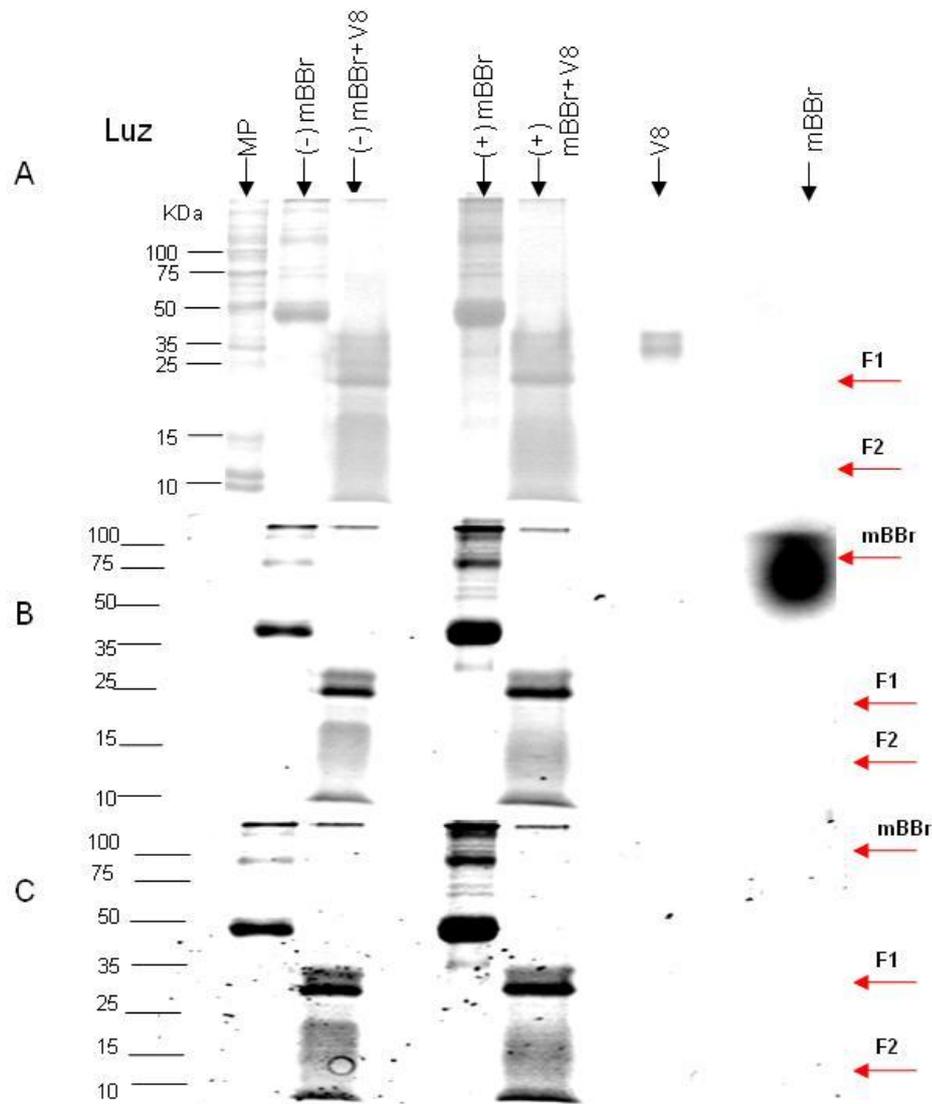
6.6. Marcaje de las cisteínas asequibles de la rodopsina con mBBr bajo condiciones de luz y oscuridad

Para este experimento, los SEB en primera instancia fueron iluminados o no y luego fueron marcados con mBBr, para así observar si el cambio de conformación ocurrido al pasar de oscuridad a luz, impedía de alguna manera el marcaje de una o ambas de las cisteínas expuestas de la rodopsina.

La Figura 37A muestra el gel teñido con azul de coomassie al 15%, resultado del marcaje de las cisteínas de la rodopsina en condiciones de luz (+) y oscuridad (-).

El cambio de conformación que se establece en la rodopsina, al pasar de oscuridad a luz, no ejerce ningún tipo de impedimento para que se realice el marcaje de las cisteínas con mBBr.

Al observar los geles con radiación UV el mismo día en que se realizó la corrida y empleando el reactivo de mBBr, se encontró que la banda intensa que migró lentamente en el gel, correspondió al exceso de mBBr como muestra en la Figura 37B. Posteriormente, luego de haber lavado el gel con solución decolorante durante un día, se pudo apreciar que dicho exceso desapareció (Figura 37C).



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Promega)

(-)mBBr: marcados en las cisteínas 140 y 316 en oscuridad

(-)mBBr +V8: marcados en las cisteínas 140 y 316 + proteasa V8 en oscuridad

(+)mBBr: marcados en las cisteínas 140 y 316 en Luz

(+)mBBr+V8: marcados en las cisteínas 140 y 316 + proteasa V8 en luz

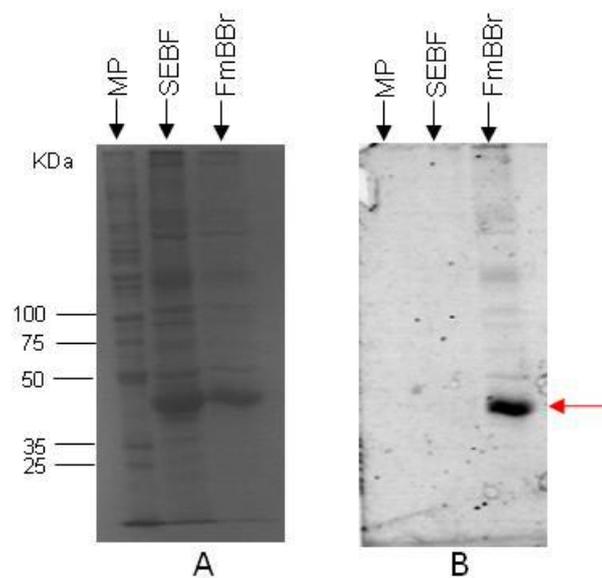
V8: proteasa que divide a la rodopsina con una relación 20:1

Figura 37. Marcaje con mBBr de la Cys 140 y Cys 316 de la rodopsina bajo condiciones de oscuridad y luz.

A: Gel al 15% de poliacrilamida teñido con azul de coomassie de la rodopsina en oscuridad y luz luego de su marcaje con mBBr. **B:** Imagen fluorescente del marcaje de cisteínas con mBBr, foto tomada el mismo día de la corrida. **C:** Imagen fluorescente del marcaje de cisteínas con mBBr, foto tomada al día siguiente de la corrida, luego de lavar el gel con solución decolorante.

6.7. Marcaje de las cisteínas de la rodopsina fosforilada

Luego de verificar la fosforilación de la proteína como se mostró en la sección 6.4, se realizó el marcaje de las cisteínas expuestas en la rodopsina con el mBBr usando una muestra de rodopsina fosforilada. Se pudo comprobar que la fosforilación no afectó el marcaje de las cisteínas de la proteína, ya que la proteína fosforilada pudo ser modificada con el fluoróforo mBBr (Figura 38).



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Promega).

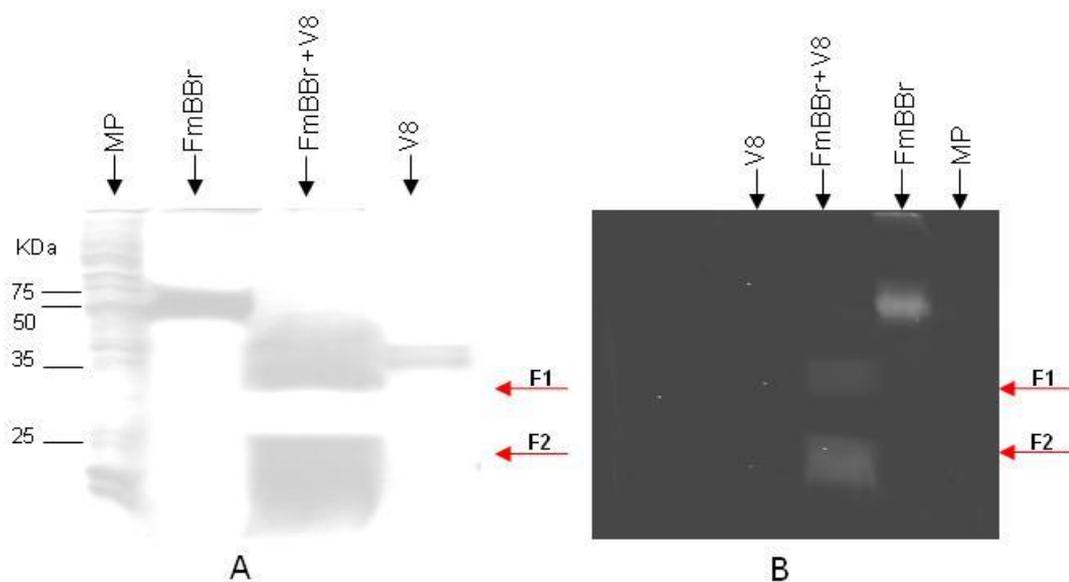
SEBF: segmento externo de los bastones fosforilados

FmBBr: fosforilados luego marcados

Figura 38. Marcaje con mBBr de la rodopsina fosforilada.

A: Gel teñido con azul de coomassie. **B:** Marcaje de las cisteínas de la rodopsina fosforilada con mBBr.

Por otra parte luego de haber incubado las muestras del experimento anterior con V8 y obtener los fragmentos proteolíticos, se obtuvo que tanto la Cys 140 como la Cys 316 se marcaron en la muestra fosforilada (Figura 39B).



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Promega)

FmBBr: fosforilados luego marcados

FmBBr+V8: fosforilados luego marcados +V8

V8: proteasa que divide a la rodopsina con una relación 20:1

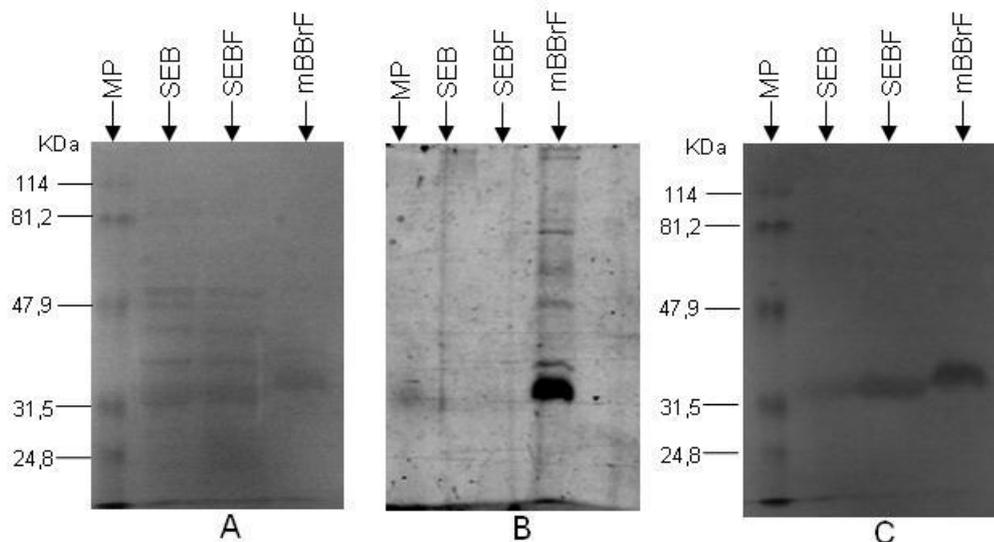
Figura 39. Proteólisis con V8 de la rodopsina fosforilada y marcada con mBBr a fin de analizar si se modificaron la Cys 140 y la Cys 316

A: Gel al 15% teñido con azul de coomassie. **B:** Marcaje de las cisteínas de la rodopsina fosforilada con mBBr seguido del tratamiento de la proteólisis con la proteasa V8.

6.8. Fosforilación de la rodopsina luego de ser marcada con mBBr en las cisteínas asequibles

Adicionalmente, se realizó primero el marcaje de las cisteínas de la rodopsina con mBBr a fin de determinar si las proteínas marcadas podían servir o no como sustrato para ser fosforilada por la RK. El marcaje se siguió con radiación UV (Figura 40A) y la fosforilación se analizó por Western Blot usando el anticuerpo anti-fosfoserina (Figura 40C).

Se observó que el marcaje inicial de las cisteínas en la rodopsina, no afectó la fosforilación de la proteína como se muestra en la figura 40B.



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market).

SEB: segmentos externos de los bastones

SEBF: segmentos externos de los bastones fosforilados

mBBrF: marcados en cisteína luego fosforilados

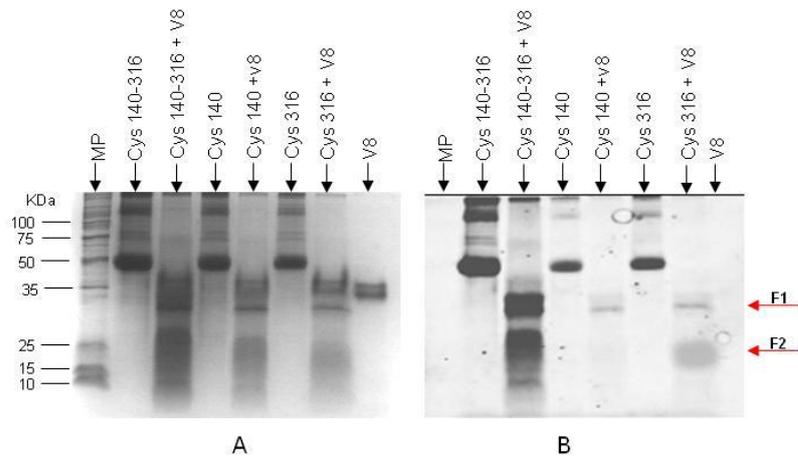
Figura 40. Fosforilación de la rodopsina luego de marcada con mBBr.

A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas, teñida con rojo Ponceau. **B:** Fluorescencia de la proteína marcada observada a través de un transiluminador y radiación UV. **C:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada mediante el anticuerpo anti-fosfoserina.

6.9. Marcaje preferencial de la Cys 140 y Cys 316 de la rodopsina

El marcaje preferencial de las cisteínas en la rodopsina, se realizó de manera satisfactoria, como se muestra en la Figura 41. Esto se demostró al analizar la fluorescencia presente en el gel de separación de electroforesis, observado en un transiluminador con luz UV, antes y después del tratamiento con la proteasa V8.

En el caso de la muestra de rodopsina conteniendo la cisteína 140 marcada y luego del tratamiento con V8, se observó la fluorescencia de una banda de aproximadamente 27KDa correspondiente al fragmento F1, mientras que en el caso del marcaje de la Cys 316, la banda fluorescente reportada se observó a 13KDa, correspondiente al fragmento F2 (Figura 40B). De esta manera se demostró el marcaje preferencial de cada una de las cisteínas expuestas de la rodopsina.



Leyenda:

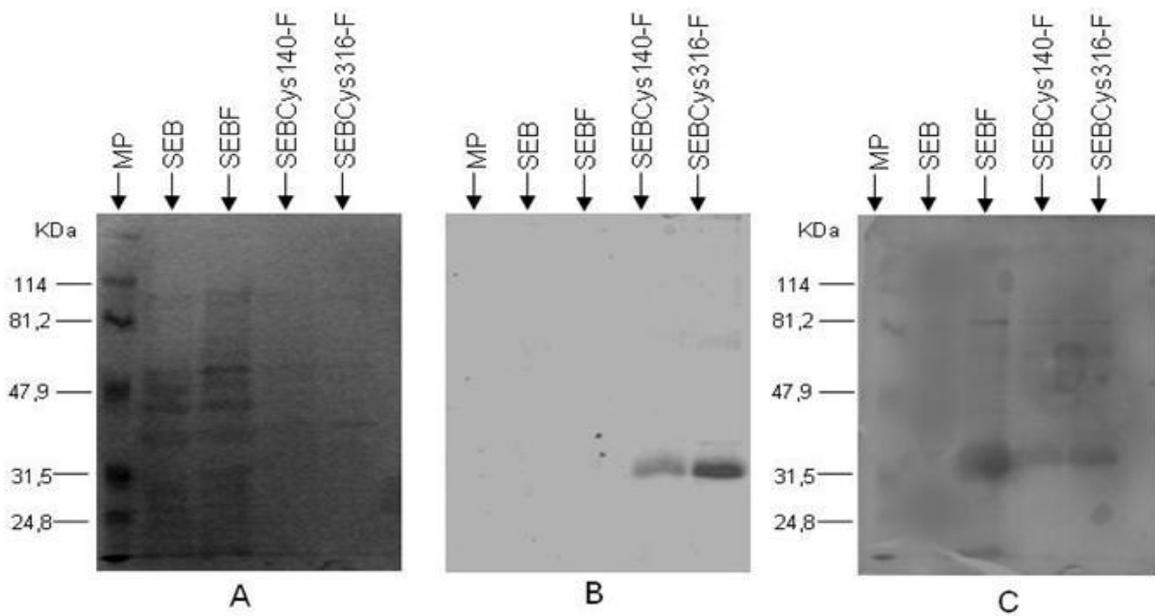
- MP: marcador de peso molecular (Promega).
- Cys140-316: marcados en las cisteínas 140 y 316
- Cys 140 -316 + V8: marcados en cisteínas 140 y 316 + proteasa V8
- Cys140: marcados en cisteínas 140 (5 minutos de incubación)
- Cys 140 + V8: marcados en cisteínas 140 + proteasa V8
- Cys 316: marcados en cisteínas 316
- Cys 316+ V8: marcados en las cisteínas 316 + proteasa V8
- V8: proteasa que divide a la rodopsina con una relación 20:1

Figura 41. Marcaje preferencial de la Cys 140 y la Cys 316 de la rodopsina con mBBr.

A: Gel al 15% de poliacrilamida teñido con azul de coomassie. **B:** Marcaje preferencial de las cisteínas de la rodopsina con mBBr seguido del tratamiento de proteólisis con la proteasa V8.

6.10. Fosforilación de la rodopsina marcada

La Figura 42 evidencia como la anti-fosfoserina (anticuerpo empleado para analizar la fosforilación de la rodopsina) reconoce a la proteína marcada y fosforilada.



Leyenda:

MP: marcador de peso molecular (Benchmark blue market).

SEB: segmentos externos de los bastones

SEBF: segmentos externos de los bastones fosforilados

SEB Cys 140-F: SEB marcados en cisteína 140, luego fosforilados

SEB Cys 316-F: SEB marcados en cisteína 316, luego fosforilados

Figura 42. Fosforilación de la rodopsina marcada preferencialmente en la Cys 140 y Cys 316 con mBBr.

A: Correcta transferencia a la membrana de nitrocelulosa de las proteínas, teñida con rojo Ponceau. **B:** Fluorescencia de la proteína marcada observada a través de un transiluminador y radiación UV. **C:** Reconocimiento de la rodopsina fosforilada mediante el anticuerpo anti-fosfoserina.

6.11. Análisis por espectroscopía de fluorescencia

Se comprobó que la rodopsina bajo condiciones de oscuridad o luz, así como en su estado fosforilado, no presenta fluorescencia intrínseca en el rango de estudio de excitación (entre 300 y 450nm), Figura 43, sin embargo se observaron dos picos fuera de este rango, los cuales son atribuibles a los aminoácidos hidrofóbicos presentes en la rodopsina así como al cromóforo. En la Tabla 6 se muestran los valores de excitación máxima para cada espectro, y el valor de la intensidad máxima.

Tabla 6. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad, luz y fosforilada

Muestra	Pico	Excitación máxima (nm)	Intensidad máxima (UA)
R oscuridad	1	237,0	872,6
	2	471,0	6260,0
R luz	1	237,0	846,7
	2	468,0	9999,9
R fosforilada	1	237,2	376,0
	2	471,2	6293,0

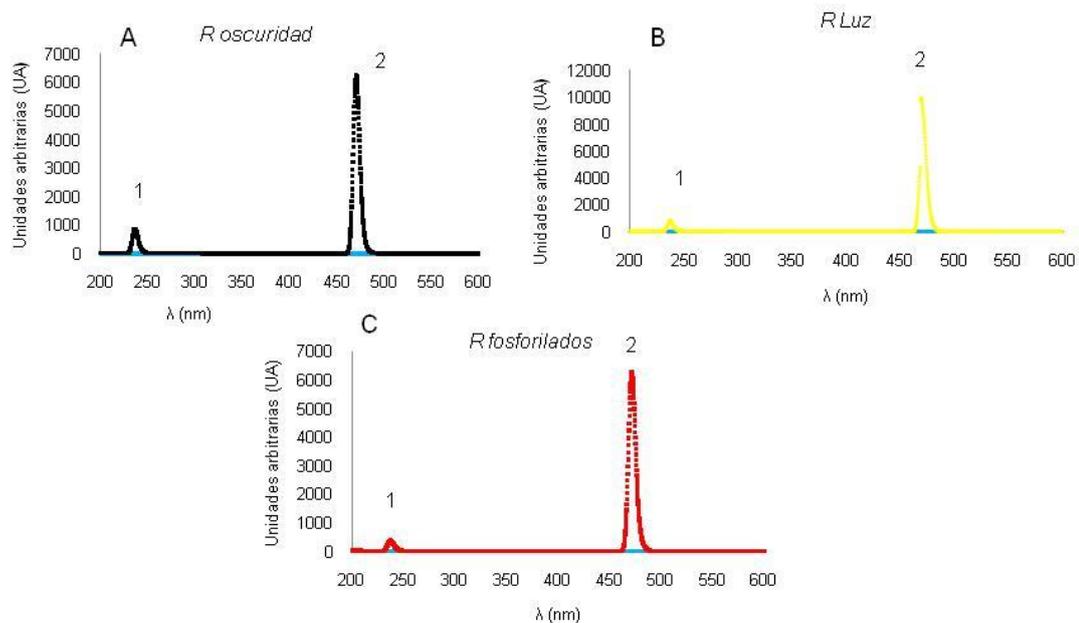


Figura 43. Espectros de fluorescencia de la rodopsina en oscuridad (A), en luz (B) y fotoactivada y fosforilada (C).

Como controles adicionales, también se determinaron los espectros de fluorescencia de los reactivos que participaron en la reacción de marcaje. Primeramente de manera individual L-Cys, mBBr y luego en conjunto mBBr con L-Cys. Se observó que solo hubo fluorescencia al hacer reaccionar el mBBr con la cisteína. Estos reactivos individuales no poseen fluorescencia intrínseca, mientras que en conjunto se vuelven altamente fluorescente (Figura 44), con un máximo de excitación en 332,6nm de 998,1 en unidades arbitrarias.

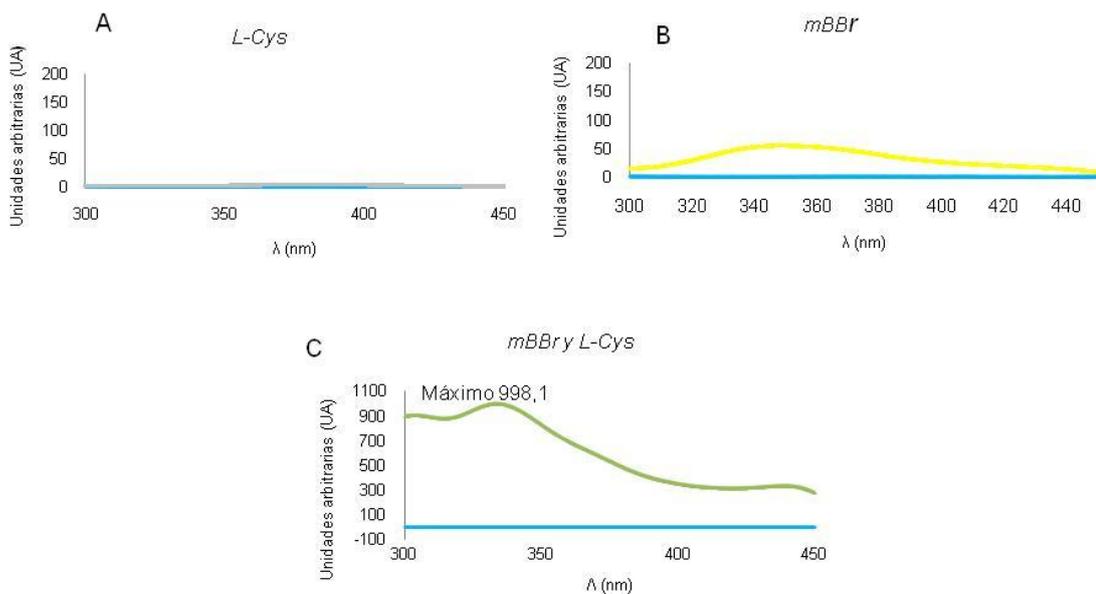


Figura 44. Espectros de fluorescencia de los reactivos L-Cys (A), mBBr (B) y en conjunto L-Cys con mBBr (C).

Los primeros espectros obtenidos, corresponden al marcaje en oscuridad de ambas cisteínas de la proteína (Cys 140 y Cys 316) usando 0,02mg de muestra. La misma muestra fue luego iluminada para determinar de nuevo el espectro de fluorescencia de la proteína en presencia de luz se observó una mínima variación en el desplazamiento de la longitud de onda (Tabla 7) y en la intensidad máxima de fluorescencia (Figura 45).

Tabla 7. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y luz, marcada en la Cys 140 y Cys 316

	Oscuridad	Luz	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	375,9	376,1	+0,2
Intensidad máxima (UA)	445,7	442,1	-3,6

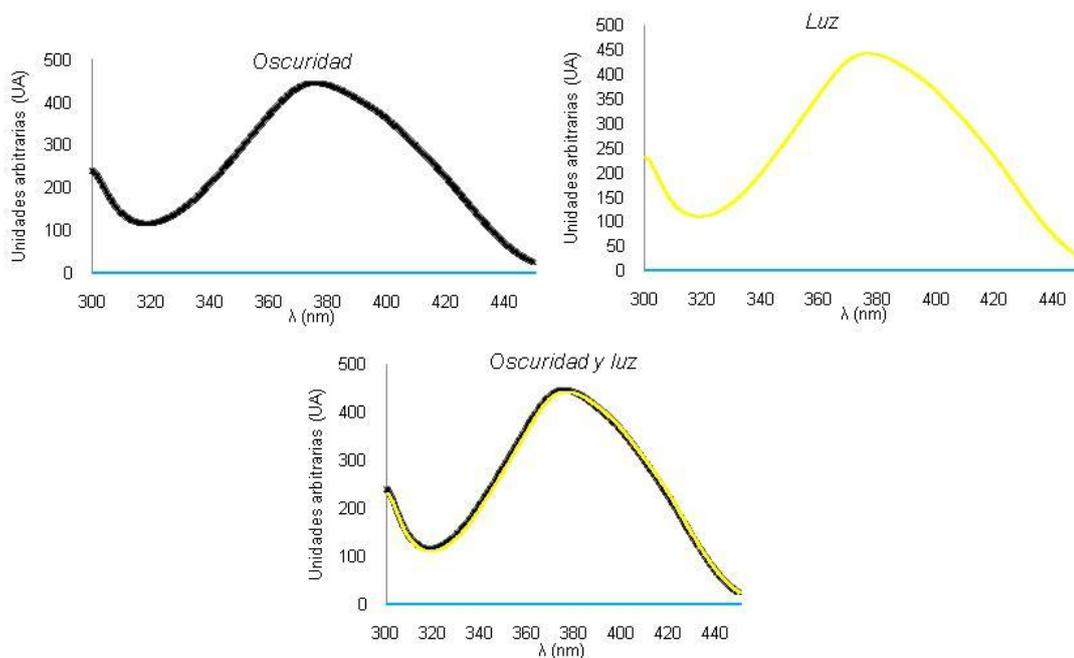


Figura 45. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 140 y 316.

Estos compuestos marcadores no son capaces de medir las diferencias conformacionales que son inducidas por la luz en la rodopsina. Parece que el ambiente alrededor de las cisteínas modificadas no cambia mucho bajo condiciones de oscuridad o luz.

Por el contrario, la intensidad de la fluorescencia, al encontrarse la rodopsina en su forma activa y fosforilada, disminuyó aproximadamente en un 88% (Tabla 8) al comparar la señal con la obtenida por la misma muestra en oscuridad o fotoactivada (Figura 46). En todos los caso se uso la misma cantidad de muestra (0,02mg).

Tabla 8. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys 140 y Cys 316

	Oscuridad	Fosforilada	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	375,9	377,9	+2
Intensidad máxima (UA)	445,7	52,5	-393,2

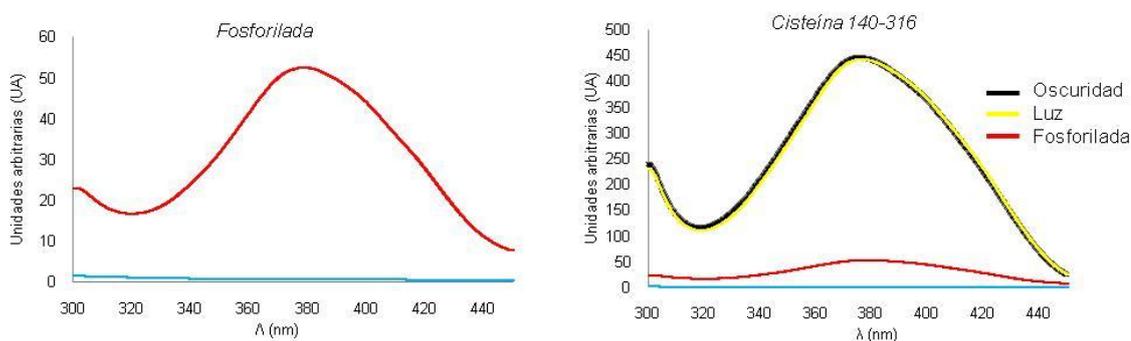


Figura 46. Espectros de fluorescencia de la rodopsina inicialmente marcada en las cisteínas 140 y 316 y luego fosforilada por RK.

Este resultado muestra que la cola C-terminal de la rodopsina, la cual es el segmento que contiene los residuos fosforilados por la RK debe encontrarse próxima a las cisteínas expuestas en la rodopsina modificada con el fluoróforo aquí utilizado. Se sabe que cuando los ambientes se vuelven más polares, la señal de la fluorescencia del mBBr disminuye. En este caso los grupos fosfato cargados negativamente deben estar afectando la fluorescencia propia de las cisteínas marcadas con mBBr.

A fin de tratar de identificar cual de las dos cisteínas expuestas y marcadas con mBBr era la responsable de la disminución de la señal fluorescente en la rodopsina, se repitieron los ensayos espectroscópicos pero con muestras de la proteína marcadas diferencialmente en cada una de las cisteínas.

En el caso del marcaje selectivo de la Cys 140, se utilizó 0,06mg de rodopsina, y se midió el espectro de fluorescencia en oscuridad y luego en luz de la misma muestra. Se observó un comportamiento similar que al marcar ambas cisteínas, con una mínima variación en el desplazamiento de las longitudes de onda (Tabla 9) y en la intensidad máxima de fluorescencia (Figura 47).

Tabla 9. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y luz, marcada en la Cys 140

	Oscuridad	Luz	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	377,5	378,3	+0,8
Intensidad máxima (UA)	111,8	134,4	+22,6

Respecto a la Tabla 9, se observó que la señal al pasar la rodopsina marcada en la Cys140 de oscuridad a luz aumento un 17%, el cual en base a los resultados de la Figura 46, se atribuye a un posible error experimental de pipeteo.

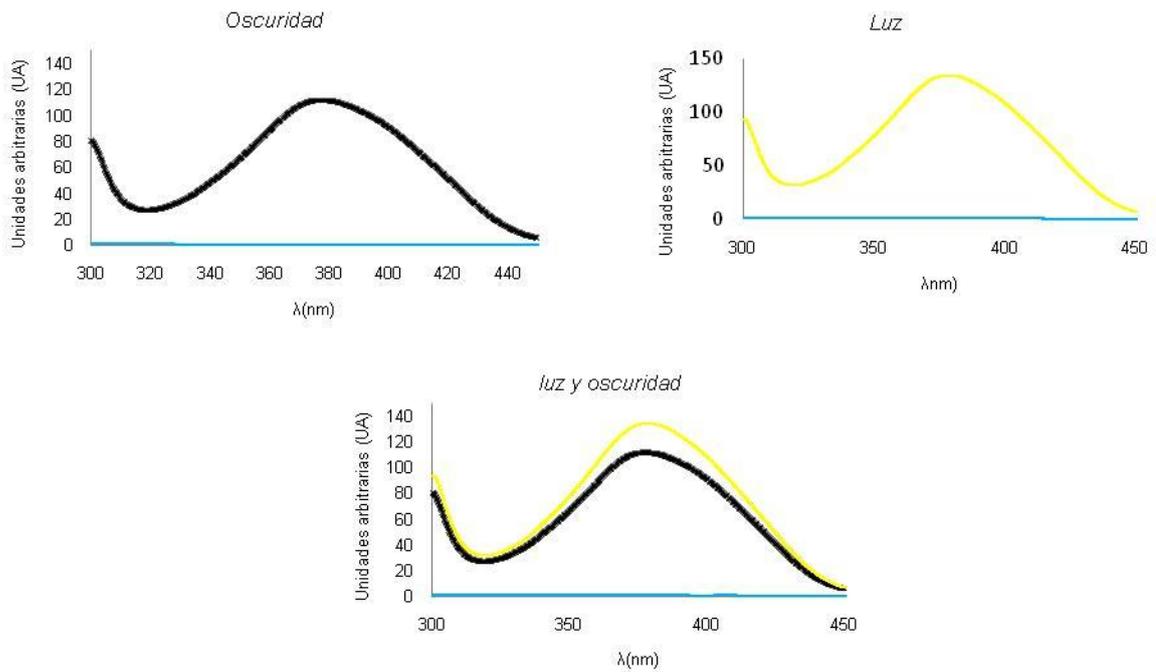


Figura 47. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada preferencialmente en las cisteínas 140.

La intensidad de la fluorescencia, de la rodopsina marcada preferencialmente en la Cys 140 luego de ser activada y fosforilada, disminuyó un 38% (Tabla 10), en el máximo de fluorescencia (Figura 48), con una cantidad de 0,06mg de rodopsina.

Tabla 10. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys 140

	Oscuridad	Fosforilada	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	377,5	377,2	-0,3
Intensidad máxima (UA)	111,8	69,2	-42,6

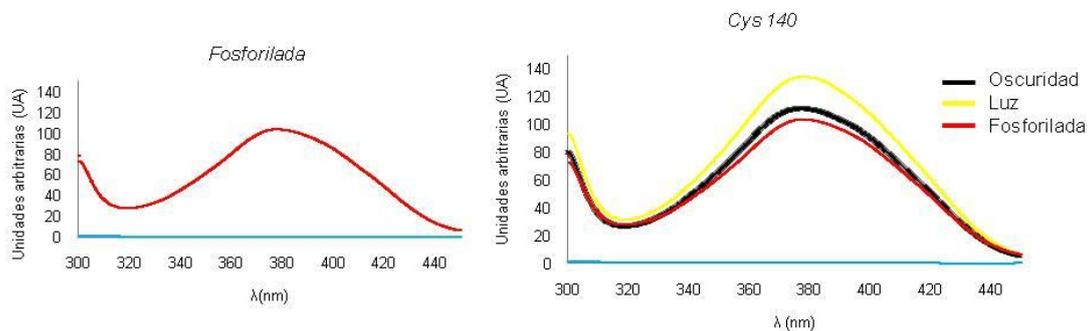


Figura 48. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 140 luego fosforilada por RK.

En el caso del marcaje selectivo de la Cys 316 se empleó 0,08mg de rodopsina y se midió el espectro de fluorescencia en oscuridad y en luz. Se observó que mantuvo el mismo comportamiento de los experimentos anteriores (Tabla 11) observándose una mínima variación en el desplazamiento de las longitudes de onda y de la intensidad máximo de fluorescencia (Figura 49).

Tabla 11. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina en oscuridad y en luz, marcada en la Cys 316

	Oscuridad	Luz	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	378,6	378,2	-0,4
Intensidad máxima (UA)	178,2	176,3	-1,9

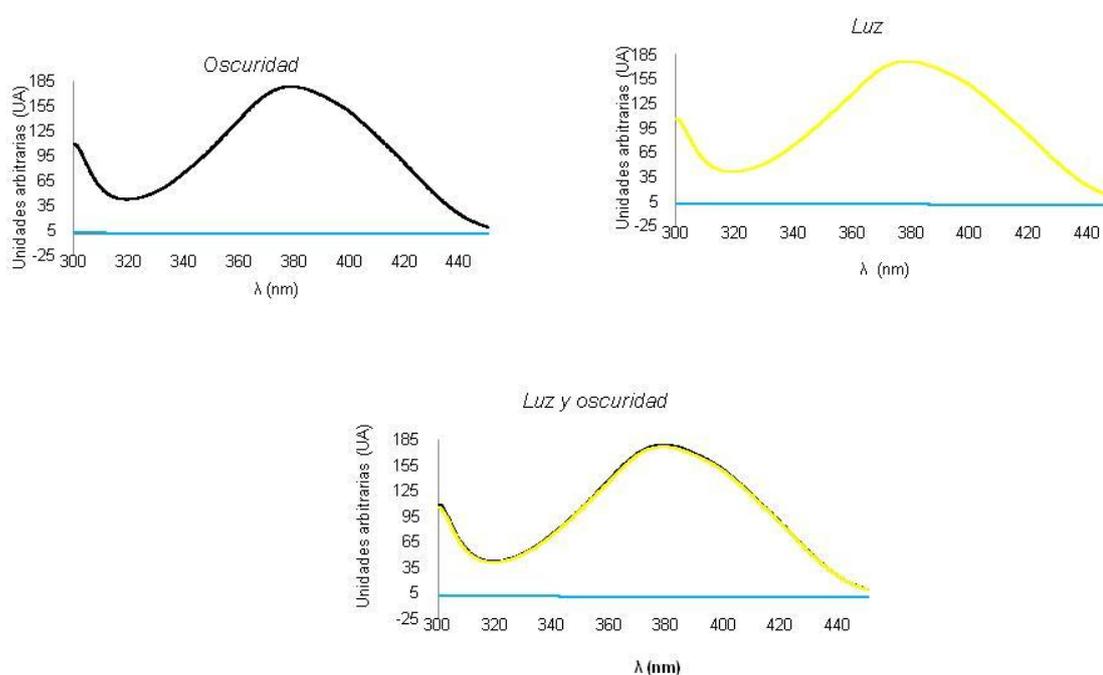


Figura 49. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada preferencialmente en las cisteínas 316.

Por el contrario, la intensidad de la fluorescencia, al encontrarse la rodopsina en su forma activa y fosforilada, disminuyó un 28% (Tabla 12) al comparar la señal con la misma muestra en oscuridad o fotoactivada (Figura 50). En todos los casos se usó la misma cantidad de muestra (0,08mg).

Tabla 12. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina fosforilada y marcada en la Cys316

	Oscuridad	Fosforilada	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	378,6	378,4	-0,2
Intensidad máxima (UA)	178,2	127,9	-50,3

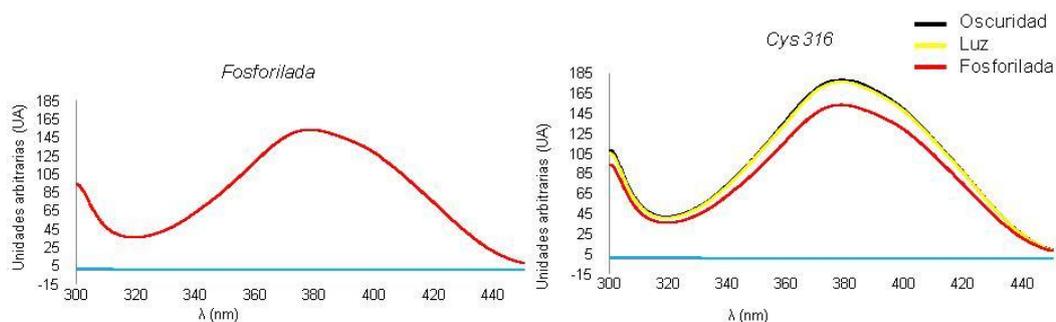


Figura 50. Espectros de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 316 luego fosforilada por RK.

Aunque los grupos fosfato parecen afectar la señal de la fluorescencia obtenida en las cisteínas marcadas selectivamente, ninguna de las dos cisteínas por separada o individualmente parece ser la responsable de la disminución considerable de un 88% en la fluorescencia que se observa en la señal cuando ambas cisteínas son modificadas en la rodopsina y luego la proteína es fosforilada. El efecto tampoco parece aditivo, sino más bien sinérgico.

La polaridad propia de los fosfato afecta significativamente la fluorescencia que se produce cuando las dos cisteínas asequibles de la rodopsina son modificadas con mBBr.

Para efectos comparativos, también se llevó a cabo un experimento en el orden inverso, fosforilando primero la rodopsina y luego realizando el marcaje en ambas cisteínas con una cantidad de 0,69mg de muestra. Se observó un pico máximo de excitación de fluorescencia, el cual disminuyó en un 97% cuando la muestra fue fosforilada (Figura 51).

Tabla 13. Valores de absorbancia máxima para la rodopsina marcada en oscuridad y la rodopsina fosforilada luego marcada en Cys 140 y Cys 316

	Oscuridad	Fosforilada luego marcada	Desplazamiento
Excitación máxima (nm)	375,9	375,6	-0,3
Intensidad máxima (UA)	15376,7	500,4	-14876,3

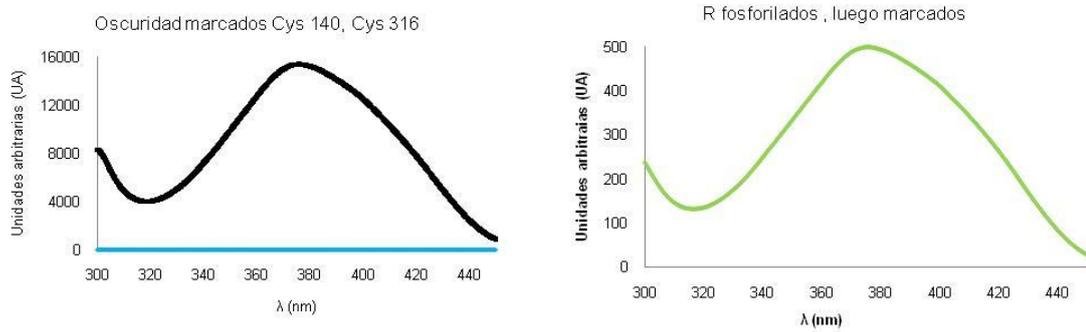


Figura 51. Espectros de fluorescencia de la rodopsina inicialmente fosforilada y luego marcada con mBBr.

A: Espectro de fluorescencia de la rodopsina marcada en las cisteínas 140 y 316.

B: espectro de la rodopsina fosforilada por RK y luego marcada.

Este comportamiento una vez más evidencia que los grupos fosfato disminuyen considerablemente la señal de fluorescencia en la rodopsina marcada en las dos cisteínas expuestas en la región citoplasmática.

6.12. Análisis computacionales utilizando las estructuras tridimensionales de la rodopsina en su estado inactivo y en su estado activo

Mediante el programa RasMol, se obtuvieron las imágenes tridimensionales de la rodopsina en oscuridad y del fotointermediario Meta II que corresponde a la forma activada de la proteína por la luz. En el panel A de la Figura 52 se muestra la superposición de ambas estructuras y se ilustran los cambios conformacionales principales que ocurren entre ellas. En particular, las hélices III y H8 que son las que contienen las cisteínas en estudio (Cys 140 y Cys 316) muestran poco cambio al superponer la conformación de la proteína en luz y en oscuridad. Esta ausencia de cambio se puede demostrar al determinar las distancias que existen entre los azufres de dichas cisteínas en ambas conformaciones. En la rodopsina (Figura 52, panel B), la distancia entre los azufres de la Cys 140 y la Cys 316 es de 24,11Å. Por otro lado, en el fotointermediario Meta II (Figura 52, panel C) se obtuvo un valor de 27,72Å entre los azufres de dichas cisteínas. Como se puede notar existe muy poca diferencia entre los valores así adquiridos. Los espectros de fluorescencia obtenidos en este trabajo también sugieren que hay muy poco cambio en el ambiente alrededor de las dos cisteínas expuestas y modificadas con mBBr al comparar el estado inactivo y fotoactivado de la proteína. Esto coincide con los resultados que se derivan de las estructuras tridimensionales.

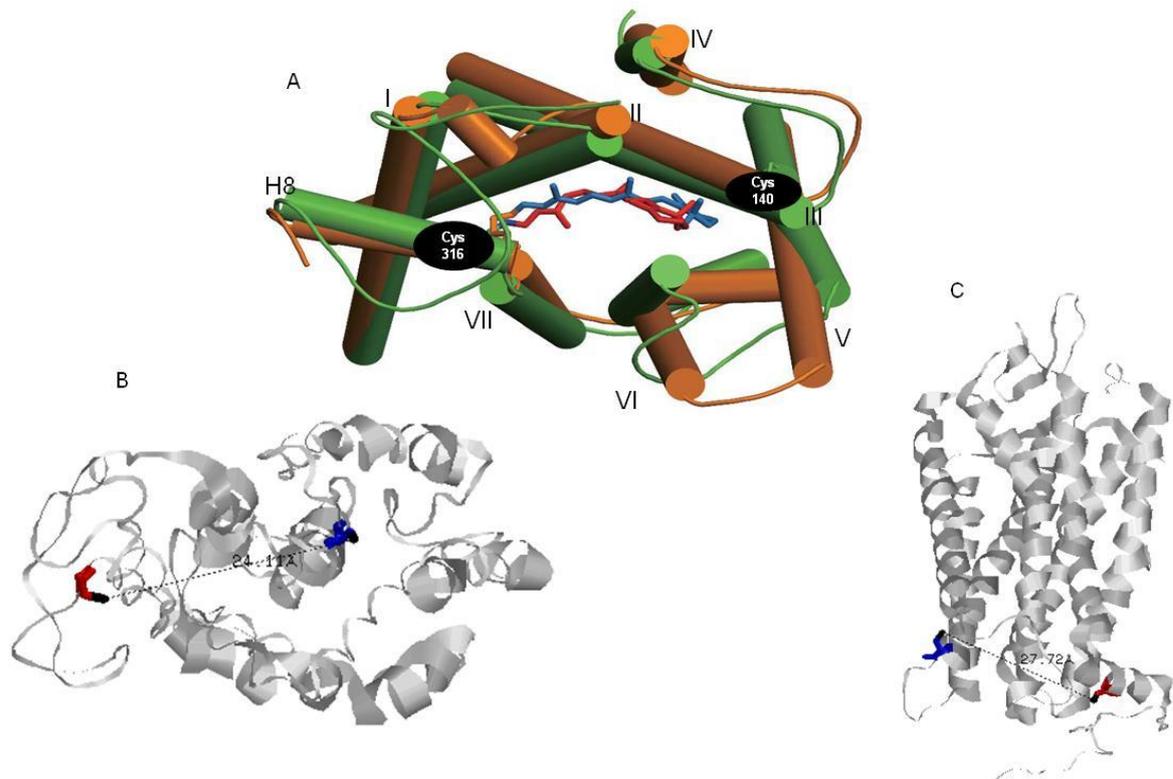


Figura 52. Estructura tridimensional de la rodopsina en oscuridad y en luz.
A: Superposición de rodopsina (verde) y meta II (naranja) ^[15]. Las siete hélices transmembranales de la proteína se muestran en forma de cilindro. **B:** Imagen de la rodopsina (PDB 1JFP). **C:** Imagen de meta II (PDB 1U19).

A fin de explicar la disminución en la intensidad de la fluorescencia al marcar ambas cisteínas con mBBR en la muestra de rodopsina iluminada y fosforilada, también se determinaron las distancias entre cada uno de los azufres de las cisteínas y los grupos –OH de las cadenas laterales de las serinas que sirven de sustrato para la RK en presencia de luz. En la Figura 53, se ilustran las distancias entre las serinas fosforiladas y las cisteínas modificadas con mBBR en la estructura tridimensional del estado Meta II de la proteína; y en la Tabla 14 se resumen los valores obtenidos para estas distancias.

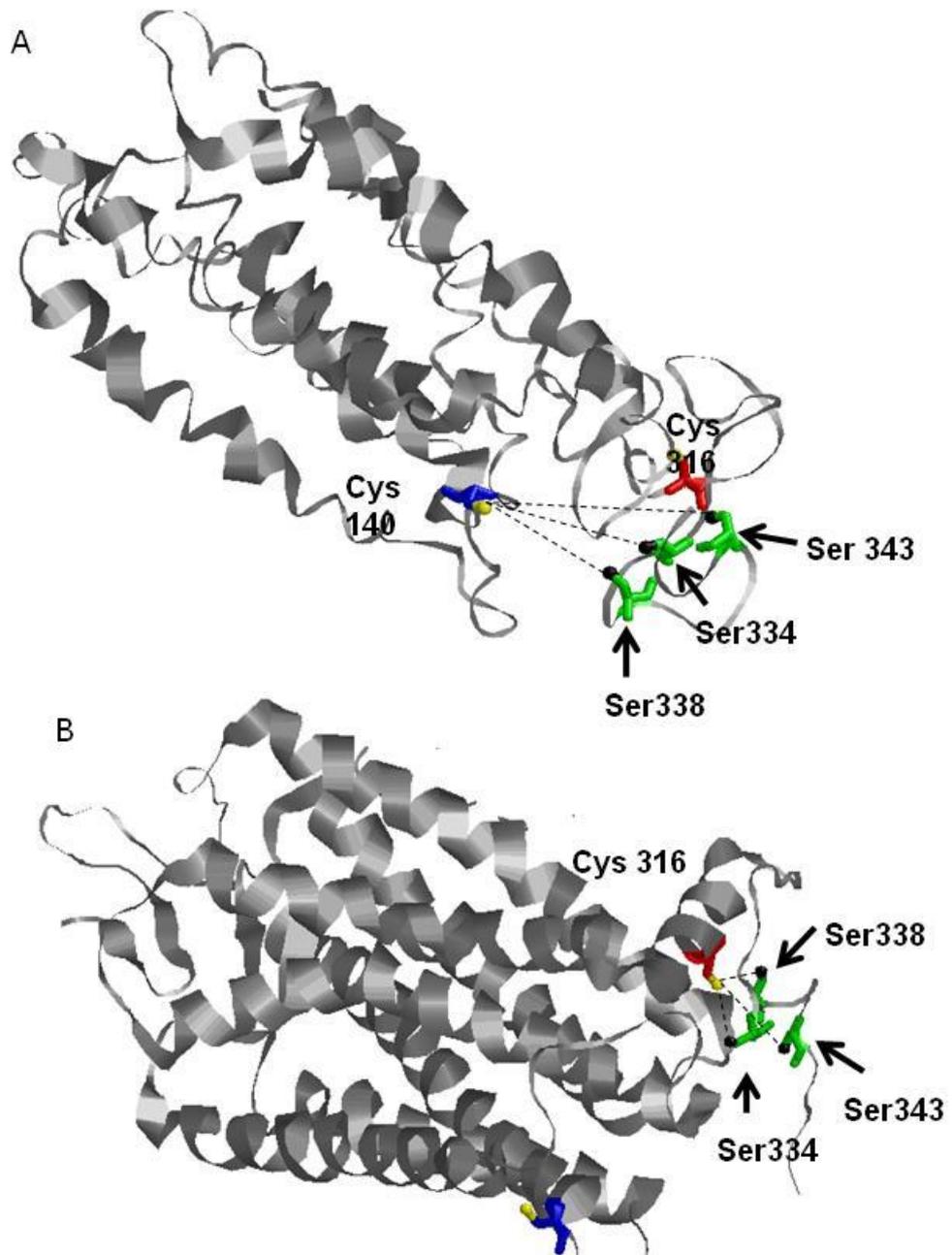


Figura 53. Estructura tridimensional de la rodopsina en luz.
A: Distancias de las serinas con respecto a la cisteína 140. **B:** Distancias de las serinas con respecto a la cisteína 316.

Tabla 14. Distancias entre las cisteínas estudiadas y los sitios fosforilados en el estado activado de la rodopsina

Cisteínas	Sitios fosforilados	Distancia (Å)
Cys 140	Ser 334	22,61
	Ser 338	32,83
	Ser 343	32,48
Cys 316	Ser 334	9,85
	Ser 338	5,53
	Ser 343	10,44

Como se observa en la Tabla 14, la poca distancia existente entre la cisteína 316 y las serinas preferencialmente fosforiladas en la rodopsina (5-11Å) pueden explicar la disminución de la intensidad en la señal de la fluorescencia, al encontrarse la proteína marcada en su estado activo y fosforilado. Por el contrario, existe una gran distancia (>22 Å) entre la Cys 140 y las serinas que pueden ser fosforiladas, lo cual no explicaría la disminución de la señal de fluorescencia de la rodopsina al encontrarse fosforilada. Esta conclusión es alcanzada si se toma como base la estructura monomérica de la rodopsina. Sin embargo, se ha reportado que la rodopsina tiene una estructura cuaternaria dimérica (Figura 54). Así que es posible imaginar que dentro de esta estructura dimérica la Cys 140 de un monómero de la rodopsina este próxima con las serinas del monómero vecino en el dímero.

También es posible imaginar un escenario adicional en el cual la Cys 316 no solo esté cerca de las serinas fosforiladas del mismo monómero de la rodopsina que los contiene, sino que pudiera estar cerca de las serinas fosforiladas del monómero vecino dentro del dímero. Esto explicaría la disminución sinérgica que se observa en la señal de la fluorescencia cuando ambas cisteínas están modificadas por mBBr en la muestra de la rodopsina fotolizada y fosforilada.

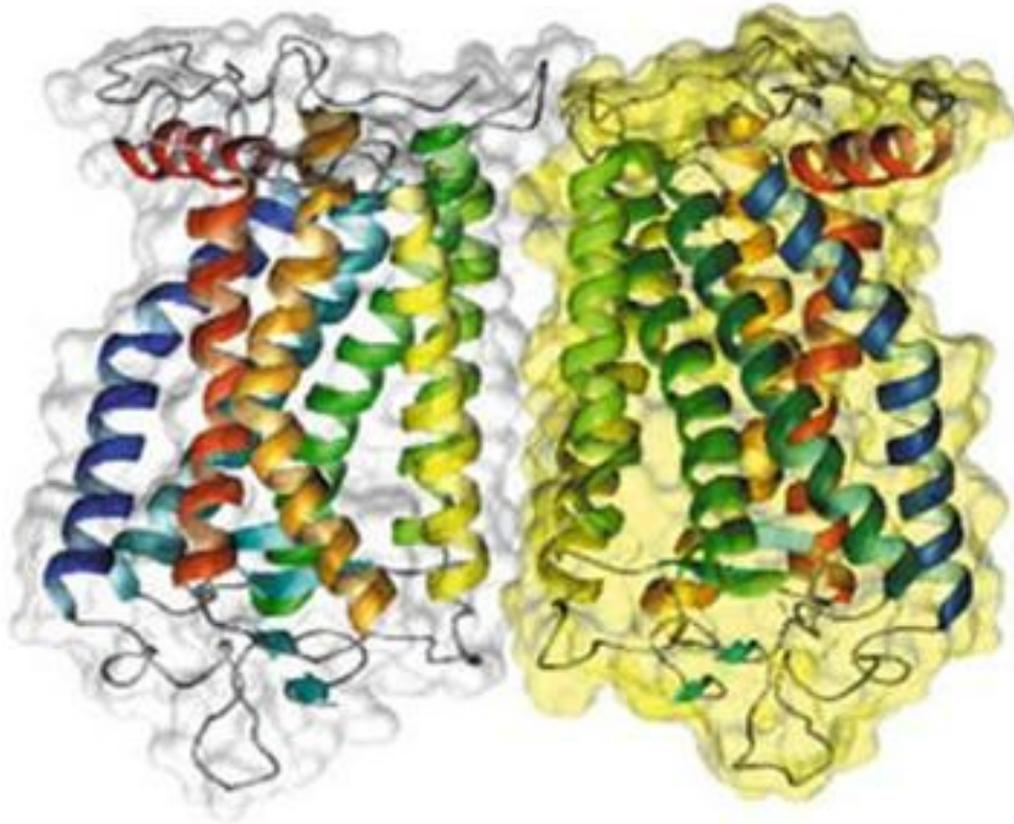


Figura 54. Modelo siguiendo las estructura tridimensional de la rodopsina dimérica ^[37].

Según el modelo sugerido ^[36] las interacciones entre los monómeros de la rodopsina dimérica ocurren principalmente entre las hélices transmembranales IV (amarillo-verde) y V (amarillo), en el lazo citoplasmático entre la hélice III y la hélices IV (C-II) y la región C-terminal.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que efectivamente la disminución de la fluorescencia al encontrarse la rodopsina fosforilada y marcada con mBBR en ambas cisteínas se debe a la proximidad de dichas cisteínas modificadas y las serinas fosforiladas tanto en los monómeros de la proteína como entre los monómeros vecinos dentro de la unidad dimérica de la rodopsina

6.13. Determinación “In Silico” de las distancias aproximadas entre las cisteínas modificadas con mBBr y las serinas fosforiladas

Los análisis anteriores fueron realizados empleando la proteína con los residuos de Cys 140, Cys 316, Ser 334, Ser 338 y ser 343 sin modificar, dado que tanto el fluoróforo mBBr como los grupos fosfato que fueron incorporados en la proteína también ocupan un volumen, se utilizó el programa “HyperChem 7.52, Molecular Modeling System “ para modelar el espacio que estas moléculas ocuparían dentro de la estructura plegada de la rodopsina fotolizada. Inicialmente, se optimizaron las estructuras del mBBr y de una serina fosforilada a fin de obtener las distancias entre diferentes posiciones de las moléculas Figura 55 y 56, respectivamente. La Figura 55 ilustra alguna de las distancias que se obtuvieron en el caso del mBBr. Para tener una aproximación más real de la cercanía entre las Cys 140 y Cys 316 con el fluoróforo se utilizó la longitud máxima obtenida para la molécula (6,31Å), la cual sustraída de la distancia obtenida en los análisis computacionales (ver sección 6.12).

En la Tabla 15 se resumen los resultados obtenidos para ambas conformaciones de la rodopsina, la conformación inactiva en oscuridad y la conformación activada por la luz. Luego de sustraer 12,62Å que corresponderían a la longitud máxima de los dos mBBr enlazados a las cisteínas, se obtuvieron distancias de 11,49Å y 15,10Å en la rodopsina y en la rodopsina fotoactivada, respectivamente, lo cual es consistente con las diferencias esperadas para intermediarios que poseen diferentes conformaciones.

Tabla 15. Aproximación de la distancia entre las cisteínas modificadas con mBBr en oscuridad y luz

	Distancia (Å)	mBBr (Å)	Distancia aproximada (Å)
Cys 140 y 316 (oscuridad)	24,11	6,31	11,49
Cys 140 y 316 (Luz)	27,72	6,31	15,10

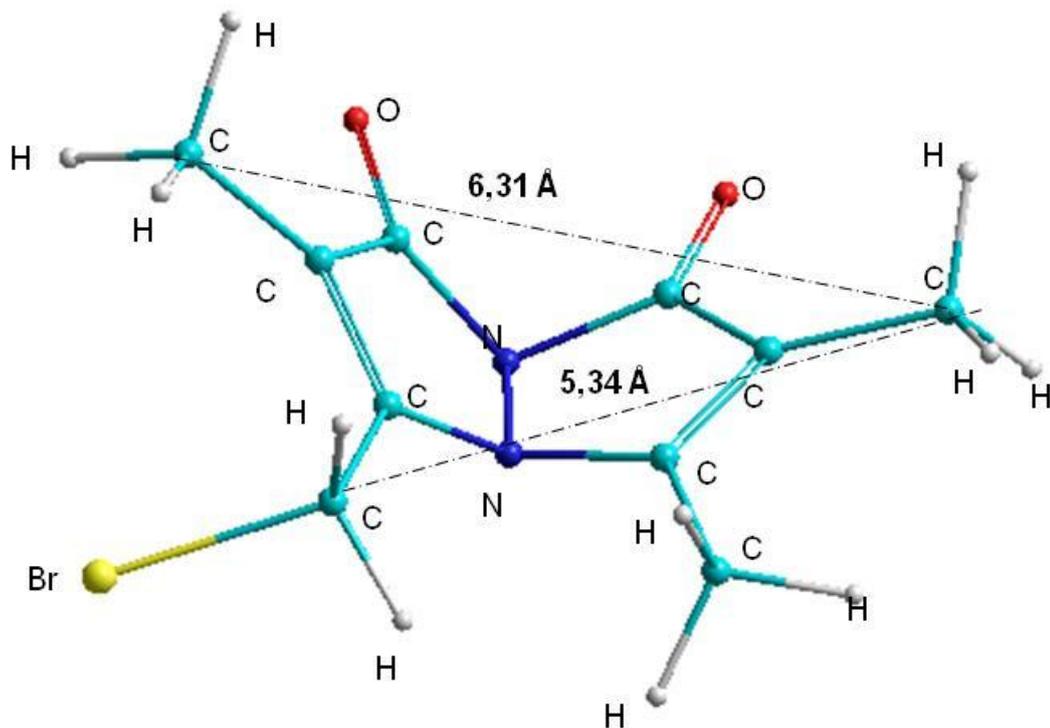


Figura 55. Estructura del mBBr mostrando las distancias entre varios átomos de carbono.

Una aproximación similar se llevó a cabo para determinar la cercanía entre los residuos de cisteínas modificadas con mBBr y los residuos de las serinas fosforiladas. La Figura 56 ejemplifica algunas de las distancias que se obtuvieron para el caso de la serina modificada con un grupo fosfato. Luego de sustraer la distancia máxima (2,88Å) como del mBBr (6,31Å) se pudo comprobar que la Cys 316 se encuentra muy cercana a los tres residuos de serinas fosforiladas de la proteína (Tabla 16). Esto explicaría muy bien la reducción de la señal fluorescente de la rodopsina activada y fosforilada.

En el caso particular de la distancia medida entre la Cys 316 modificada con mBBr y la Ser 338 fosforilada se obtuvo un número negativo, lo cual probablemente se deba a que se utilizó una aproximación bastante burda o cruda para realizar esta determinación, será necesario realizar mejores ajustes computacionales para así obtener las distancias reales entre estos residuos.

Luego de sustraer las longitudes del mBBr y del grupo fosfato entre la Cys 140 y las tres serinas fosforiladas aún se obtuvieron distancias muy grandes (13-24Å), las cuales no explicarían la disminución en la señal de fluorescencia observada en la muestra de la rodopsina estimulada por la luz y fosforilada. Estos resultados ratifican que posiblemente la Cys 140 de un monómero de la rodopsina se encuentra próxima con las serinas fosforiladas del monómero vecino dentro de la estructura dimérica de la rodopsina, como fue sugerido anteriormente.

Tabla 16. Aproximación de las distancias entre las cisteínas modificadas activadas en luz y las serinas fosforiladas

Cisteínas	Sitios fosforilados	Distancia (Å)	Distancia (Å) mBBR	Distancia (Å) fosfato	Distancia aproximada (Å)
Cys 140	Ser 334	22,61	6,31	2,88	13,42
	Ser 338	32,83	6,31	2,88	23,64
	Ser 343	32,48	6,31	2,88	23,29
Cys 316	Ser 334	9,85	6,31	2,88	0,66
	Ser 338	5,53	6,31	2,88	-3,66
	Ser 343	10,44	6,31	2,88	1,25

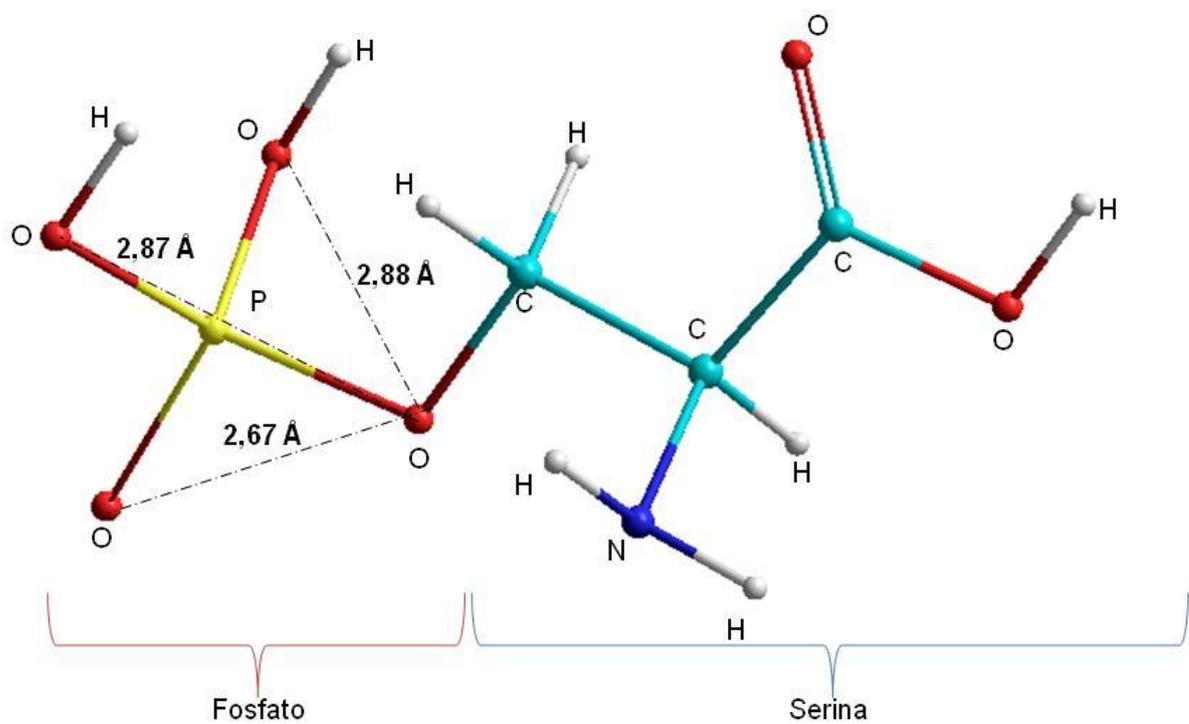


Figura 56. Estructura del fosfato mostrando las distancias entre varios átomos de oxígeno.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se empleó el marcador fluorescente mBBr para modificar los grupos tioles de las cisteínas asequibles de la rodopsina y de esta manera estudiar los cambios conformacionales, que ocurren en la proteína al pasar de su estado inactivo a su estado activo y de su estado activo al estado activado y fosforilado. Se escogió el marcador mBBr por ser un fluoróforo pequeño, muy sensible al ambiente, y cuya fluorescencia ha sido utilizada en numerosas ocasiones como un sensor del ambiente local de los residuos de cisteína en la proteína [20-21].

La rodopsina contiene 10 residuos de cisteína en su molécula, de los cuales solamente la Cys 140 y Cys 316 al inicio del lazo citoplasmático C-II (justo al finalizar la hélice transmembranal III), y la Cys 316 situada en la hélice anfipática H8 que también se encuentra en la región citoplasmática de la proteína, son las únicas cisteínas disponibles para ser modificadas químicamente [22]. La localización citoplasmática de estas cisteínas las convierte en buenos blancos de marcaje con reactivos fluorescentes tales como el mBBr y otros derivados bromados del bimano, puesto que como se mencionó anteriormente estos fluoróforos son sensibles al ambiente y a la polaridad del entorno próximo. Dado que el lado citoplasmático de la rodopsina corresponde a la región a través de la cuál esta proteína fotorreceptora interactúa de una manera dependiente de la luz con otras proteínas de la cascada visual, tales como transducina, rodopsina quinasa y arrestina, es muy probable que durante la fotoactivación de la rodopsina ocurran cambios conformacionales que se transmitan a la región citoplasmática que contiene a las Cys 140 y Cys 316. Esta aproximación ha sido utilizada por otros investigadores para determinar por espectroscopía de RMN de ^{19}F los desplazamientos químicos que ocurren por efecto de la luz cuando las Cys 140 y Cys 316 de la rodopsina fueron marcadas con ^{19}F TET [4]. Estos investigadores observaron cambios en los desplazamientos químicos de las señales de ^{19}F correspondientes a cada una de las cisteínas modificadas de la rodopsina, al compararlos bajo condiciones de oscuridad y luz. En el caso de la Cys 140 hubo un cambio de -0,4ppm en su desplazamiento al pasar la rodopsina de

su estado inactivo a su estado activo. En el caso de la Cys 316, hubo también un ligero cambio en su desplazamiento químico de +0,1ppm cuando la proteína pasó de su estado en oscuridad a su estado iluminado. Esto sugiere que los cambios conformacionales dependientes de la luz que ocurren en la rodopsina, pueden alcanzar al lazo C-II y a la hélice H8, ambos localizados en el lado citoplasmático de la proteína.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de grado discrepan de los resultados reportados por el grupo de *Seetharaman et al.* ^[4], puesto que utilizando espectroscopía de fluorescencia no se observó ninguna diferencia significativa entre los espectros obtenidos para las muestras de la rodopsina con la Cys 140 y Cys 316 modificada con mBBr. Al compararla bajo condiciones de luz y oscuridad solamente se observaron desplazamientos muy leves (de -0,3 a +0,2 nm) en los valores de la longitud de onda de los máximos de excitación. Obviamente, estos desplazamientos pudieran ser causados por los cambios conformacionales dependientes de la luz que sufre la proteína. No obstante, otra explicación factible es que al ser tan pequeña la diferencia entre los desplazamientos químicos, pudieran atribuirse a simples errores experimentales.

Con la resolución de las estructuras tridimensionales de la rodopsina y de dos de sus fotointermediarios, se puede visualizar directamente donde ocurren los principales cambios conformacionales por efecto de la luz en la rodopsina *Woog et al.* ^[15], reportaron que las hélices transmembranales V y VI corresponden a las regiones con mayores modificaciones a nivel del plegamiento de la rodopsina al pasar de su estado inactivo a su estado fotoactivado. Por el contrario, el resto de las hélices transmembranales (I, II, III, IV y VII) y la hélice anfipática H8, sufren pocos cambios durante la activación de la proteína. Los resultados presentados en este trabajo de investigación son consistentes con los reportados por *Woog et al.* ^[15], puesto que los espectros resultantes de los experimentos de marcaje con mBBr de la Cys 140, situada justo al finalizar la hélice III, y la de las Cys 316 localizada en la hélice H8 no mostraron diferencias significativas entre los estados inactivo y activo de la rodopsina.

En este trabajo también se comprobó que las Cys 140 y Cys 316 se encuentran asequibles en la rodopsina tanto en su estado inactivo como en su estado fotoactivado, puesto que ambas cisteínas fueron marcadas de forma similar con el fluoróforo mBBr bajo ambas condiciones. Adicionalmente, el marcaje inicial de estas cisteínas expuestas de la rodopsina con mBBr no impidió que la proteína fuera posteriormente fosforilada por la rodopsina quinasa. De manera análoga, la fosforilación inicial de las serinas presentes en la cola C-terminal de la rodopsina por la rodopsina quinasa tampoco ejerció ningún tipo de impedimento estérico sobre el marcaje de ambos residuos de cisteínas de la proteína con mBBr. Estos resultados son muy interesantes puesto que las investigaciones llevadas a cabo por *Krupnick et al.* [23] demostraron que la fosforilación de la rodopsina por rodopsina quinasa produce una reducción de la interacción de la rodopsina con la transducina. Una interpretación de estos resultados pudiera ser que al ocurrir la fosforilación de los residuos de serina de la rodopsina se bloquean estéricamente los sitios de interacción de la proteína fotorreceptora con la transducina, los cuales se encuentran localizados en la región citoplasmática de la rodopsina. Este no parece ser el caso como se demostró en el presente trabajo con los experimentos de marcaje con mBBr de la proteína fosforilada y los experimentos de la fosforilación de la rodopsina modificada con mBBr. Otra interpretación que pareciera ser más factible pudiera ser que la fosforilación de la rodopsina, al incorporar cargas negativas sobre la proteína, ejerce un efecto iónico repulsivo sobre los residuos cargados de la transducina que son claves para su interacción con la rodopsina. De esta manera, la disminución que se observa en la interacción entre la fosforodopsina y la transducina no sería producto de un bloqueo por impedimento estérico sino más bien un efecto acusado por las cargas de los grupos fosfato incorporados en la proteína.

Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes por los reportados por *Getmanova et al.* [24], quienes demostraron por medio de experimentos REDOR sobre la rodopsina marcada con ^{19}F TET en las Cys 140 y Cys 316 fosforiladas con ^{31}P en los residuos de serina de su cola C-terminal que no existe diferencia entre los espectros obtenidos bajo condiciones de oscuridad y luz. Estos investigadores

midieron la distancia internuclear entre los sitios doblemente marcados y reportaron que la distancia entre la cola C-terminal y la región citoplasmática que contiene a las Cys140 y Cys 316 se mantiene constante independientemente del estado de activación de la rodopsina ^[24].

Uno de los resultados más interesantes que se obtuvo en este trabajo de grado fue la disminución de aproximadamente un 90% en la intensidad de la señal de fluorescencia de la muestra de rodopsina fosforilada y marcada con mBBr en ambas cisteínas. Este resultado sugiere que la cola C-terminal de la rodopsina, la cual contiene las serinas fosforiladas, debe encontrarse relativamente cerca de la región citoplasmática de la proteína que contiene a las Cys 140 y Cys 316 modificadas con mBBr. Como el mBBr es un fluoróforo sensible al entorno local, con este resultados se evidencia que los grupos fosfato incorporados a las serinas del segmento C-terminal, los cuales presentan cargas negativas (dos cargas negativas por cada grupo fosfato incorporado a cada residuo de serina), producen un ambiente muy polar que podría estar afectando directamente la fluorescencia del mBBr.

Con miras a entender lo que estaba ocurriendo dentro de la proteína, se realizaron análisis computacionales de la estructura cristalina reportada de la rodopsina fotoactivada ^[15], para ello se determinaron las distancias entre cada uno de los azufres de las cisteínas 140 y 316 y los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de las serinas que sirven de blanco para la rodopsina quinasa (Ser 334, Ser 338 y Ser 343). Se observó claramente que la Cys 316 se encuentra relativamente cerca a los tres residuos de serinas fosforiladas (entre 5,53 y 10,44Å) y esto podría explicar parcialmente la disminución en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, la Cys 140 está muy alejada (entre 22,61Å y 32,83Å) de las serinas fosforiladas y en consecuencia no se debería estar afectando la señal fluorescente del fluoróforo. Estos cálculos de las distancias fueron realizados tomando en cuenta la estructura monomérica de la proteína. No obstante, existen evidencias experimentales en la literatura demostrando que la rodopsina presenta una estructura cuaternaria

dimérica ^[30-36]. En consecuencia, es factible pensar que dentro del dímero de la rodopsina, la Cys 140 de cada uno de los monómeros se encuentra cercana a las serinas de la cola C-terminal del monómero vecino. Análogamente, la Cys 316 de cada una de las subunidades monoméricas de la proteína también pudiera estar próxima a las serinas fosforiladas de la subunidad monomérica vecina dentro del dímero. Esto explicaría la reducción sinérgica que se observa en la intensidad de fluorescencia del fluoróforo cuando ambos residuos de cisteínas están derivatizados con el mBBr en la rodopsina fotoactivada y fosforilada.

8. CONCLUSIONES

1. Los segmentos externos de los bastoncillos fueron aislados exitosamente partiendo de retinas bovinas. La rodopsina aislada en los SEB presento un alto grado de pureza de acuerdo al cociente de absorbancia $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$.
2. La rodopsina bovina fue purificada a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad a través de una columna de Con A sefarosa, evidenciándose que el detergente dodecil maltósido sirve para solubilizar a dicha proteína contenida en la membrana de los SEB.
3. Se aisló una fracción enriquecida en la rodopsina quinasa a partir de los SEB. La fosforilación de la rodopsina fue detectada satisfactoriamente mediante análisis por Western Blot utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina. El reconocimiento de la rodopsina fosforilada fue cualitativamente mejor al emplear el anticuerpo anti-fosfoserina.
4. El marcaje de las cisteínas asequibles de la rodopsina se realizó con tres reactivos fluorescentes el mBBr, dmBBr y qmBBr, obteniéndose que el mBBr produjo una señal fluorescente de mayor intensidad. El correcto marcaje de la rodopsina con los diferentes fluoróforos utilizados fue comprobado al separar la proteína marcada mediante geles de electroforesis y analizar la fluorescencia *in situ* con luz ultravioleta UV proveniente de un transiluminador.
5. La proteasa V8 permitió evidenciar el marcaje conjunto o preferencial de la Cys 140 y la Cys 316 de la rodopsina con los fluoróforos empleados, dado que cada uno de estos residuos permaneció en uno de los fragmentos que se generaron con esta proteasa.

6. El cambio de conformación que ocurre en la rodopsina por efecto de la luz, no ejerció ningún tipo de impedimento para que las cisteínas 140 y 316 localizadas en la región citoplasmática de la proteína pudieran ser marcadas con el fluoróforo mBBr. Adicionalmente la proteína marcada con mBBr pudo ser reconocida y fosforilada por la RK y de forma análoga la fosforilación inicial de la proteína por la RK no afectó el marcaje consecutivo de las cisteínas de la proteína con mBBr.

7. No se observaron cambios significativos en los espectros de fluorescencia al comparar la rodopsina marcada con mBBr en su estado inactivo y fotoactivado. Sin embargo, la incorporación de grupos fosfato sobre la rodopsina fotoactivada si influyó sobre la fluorescencia del fluoróforo, puesto que la señal se observó significativamente disminuida, (~90%) en las muestras fotoactivadas y fosforiladas. Estos resultados demostraron que los sitios de fosforilación de la rodopsina se encuentran en proximidad a las cisteínas modificadas con mBBr.

8. Las estructuras tridimensionales de la rodopsina y del fotointermediario Meta II ayudaron a validar los resultados obtenidos al aplicar espectroscopía de fluorescencia extrínseca luego del marcaje de la Cys 140 y Cys 316 de la proteína con mBBr.

9. BIBLIOGRAFÍA

[1]Qin, J., Vinogradova., y Gronenborn, M. (2001). *Methods in enzymology*: 339,337-389.

[2]Bubis, J. (2000). *Transducina: la proteína G del proceso de excitación visual* Artículo en línea. Disponible: <http://vitae.ucv.ve>. [Última consulta: 21 Marzo 2010].

[3]Ramón, E., Gómez, J., Urbina, C., Götzens, G., y Garriga P. (2002) *Estructura tridimensional de la rodopsina*. Universidad Politécnica de Catalunya: Ver y oír, 403-410.

[4]Seetharaman, J., Getmanova, V., Loewen, M., Reeves, P., y Khorana, G. (1999). *NMR spectroscopy in studies of light-induced structural changes in mammalian rhodopsin applicability of solution ¹⁹F NMR*. Biophysics 96: 24, 13744-13749.

[5]Dunham, T. y Farrens, D. (1998). *Conformational changes in rhodopsin*. J Biol Chem 274: 3, 1683-1690.

[6]Del Valle, L., Ramón E., Gómez J. Urbina C., Götzens G., y Garriga P. (2002). *Mecanismo de activación de la rodopsina, unión y activación de la proteína G transducina*. Universidad Politécnica de Catalunya: ver y oír: 723-727.

[7]Hamm, H., y Bownds, D. (1986). *Stimulation of protein phosphorylations in frog rod outer segments*. J Biol Chem 24: 4512-4523.

[8]Bohinski, R. (1978). *Bioquímica*. (2da Ed.). E.U.A: Fondo Educativo Interamericano.

- [9]Ernst, O. y Bartl, F. (2002). *Transition of rhodopsin into the active metarhodopsin II state opens a new light-induced pathway linked to Schiff base isomerization*. J Biol Chem 3: 968-74.
- [10]Zubay, G. (1993). *Biochemistry*. (3th Ed) United States: WCB.
- [11]Khorana, G. (1992). *Rhodopsin, photoreceptor of the rod cell*. 2 J Biol Chem 67: 1, 1-4.
- [12]Ridge, K., y Palczewski, K. (2007). *Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling*. J Biol Chem 282: 3, 9297-9301.
- [13]Palczewski, K. (2006). *G protein-coupled receptor rhodopsin*. Annu rev biochem 75: 743-767.
- [14]Nelson, D. y Cox, M. (2001). *Principios de Bioquímica*. (4ta Ed.). Omega.
- [15]Woog, H., Ju, Y., Hee, J., Morizumi. T., Pai, E., Krau, N., Peter, K., Scheerer, P., y Ernest, O. (2011). *Crystal structure of metarhodopsin II*. Nature 0: 1, 0-6.
- [16]Skoog, D., Holler, J., y Nieman, T.(1992). *Principios de análisis instrumental*. (5ta Ed.). España: McGraw-Hill.
- [17]Skoog, D., Holler, J., y Crouch, S. (2005). *Fundamentos de química analítica*. (8va Ed.). México: McGraw-Hill.
- [18]Wade, J. (.2004). *Química orgánica*. (5ta Ed.). Madrid: Pearson.

- [19]Atkins, P. y Paula, J. (2008). *Química física*. (8va Ed.). Buenos aires.
- [20]Kosower, N., Kosower, E., Newton, G., y Ranney, H. (1979). *Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions*. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 7, 3382-3386.
- [21]Trivedi, M., Laurence, J. y Siahian, T. (2009). *The role of thiols and disulfides on protein stability*. Current protein and peptide science 10: 6,614-625.
- [22]Imamoto, Y., Kataoka, M., Tokunanga, F., y Palczewski, K. (2000). *Light-induced conformational changes of rhodopsin probed by fluorescent Alexa594 immobilized on the cytoplasmic surface*. Biochemistry 39: 49, 15225-15233.
- [23]Krupnick, J., Vsevolod, G., y Benovic, J. (1997). *Mechanism of quenching of phototransduction*. J Biol Chem 272: 29, 18125–18131.
- [24]Getmanova, E., Patel, A., Seetharaman, J., Loewen, M., Reeves, P. Friedman, N., Sheves, N., Smith, O. y Khorana, G. (2004). *NMR spectroscopy of phosphorylated wild-type rhodopsin: mobility of the phosphorylated C-terminal of rhodopsin in the dark and upon light activation*. Biochemistry 43: 4, 1126-.1133.
- [25]Papermaster, D., y Dryer, W. (1974). *Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods*. Biochemistry 13: 2348-2444.
- [26]Laemmli, U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680–685.

- [27]Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354.
- [28]Wald, G., y Brown, P. (1953-1954). *The molar extinction of rhodopsin*. J Gen Physiol 37: 189-200.
- [29]Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- [30]Medina. Perdomo, D., y Bubis, J. (2004). *The hydrodynamic properties of dark- and light-activated states of n-dodecyl-D-maltoside-solubilized bovine rhodopsin support the dimeric structure of both conformations*. J Biol Chem 279: 38, 39565–39573.
- [31]Farrens, D., Altenbach, C., Yang, K., Hubell, W., y Khorana, G. (1996). *Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin*. Science 274: 768-770.
- [32]Papermaster, D. (1982). *Preparation of retinal rod outer segments, methods enzymology*. Biochemistry 81: 48-52.
- [33]Kosower, N., Kosower, E., Newton, G., y Ranney, H. (1979). *Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions*. Proc Natl Acad Sci 76: 7, 3382–3386.

[34]Bubis, J. (1998). *Effect to detergents and lipids on transducin photoactivation by rhodopsin*. Bio Res 31: 59-71.

[35]Hong, K., Knudsen, P., y Hubbell, W. (1982). *Purification of rhodopsin on hydroxyapatite columns, detergent exchange, and recombination with phospholipids*. Meth Enzymol 81:144-140.

[36]Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. Engela, A., y Palczewski, K. (2004). *The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane*. Annu Rev Biochem 56: 3, 281-288.

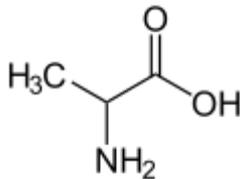
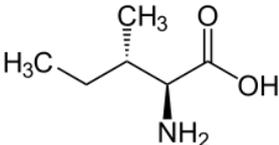
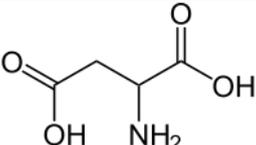
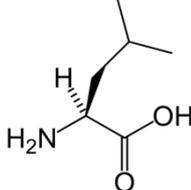
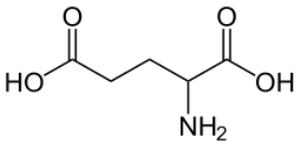
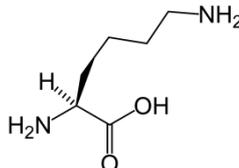
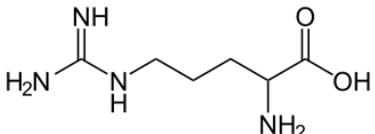
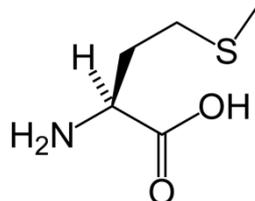
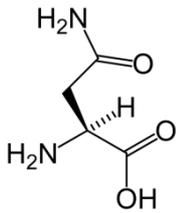
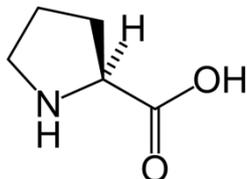
10. APÉNDICE

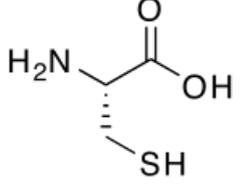
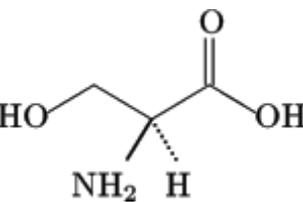
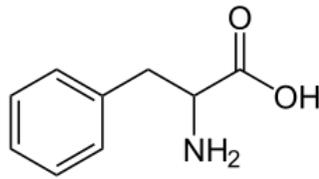
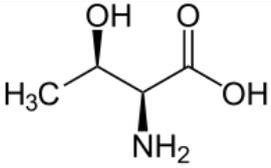
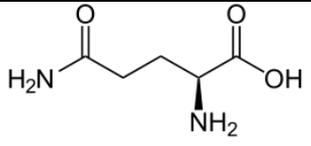
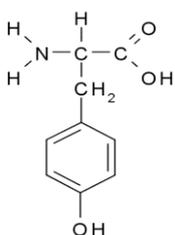
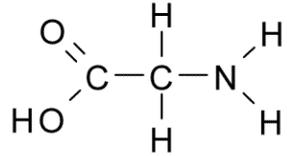
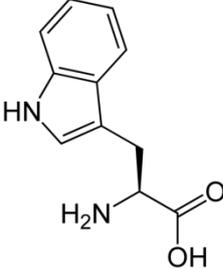
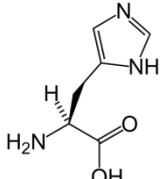
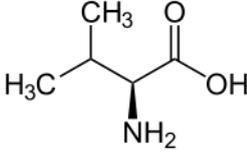
10.1. Lista de símbolos y abreviaturas

AP	fosfatasa alcalina
APS	persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
Buffer	solución amortiguadora del pH
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Con A Sefarosa	concanavalina A-Sefarosa
DM	n-docecil- β -D-maltósido
DMF	N,N-dimetilformamida
dmBBr	dimonobromobimano
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GDP	guanosín difosfato
Genapol x-100	polioxietileno (10) etertridecil
GPCR	receptor acoplado a proteínas G
GTP	guanosín trifosfato
GTPasa	guanosín trifosfatasa o trifosfatasa de guanosín
HEPES	ácido N-(2-Hidroxietyl)piperacina-N'-(2-etanosulfónico)
KDa	kilodalton
μ l	microlitros
mBBr	monobromobimano
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg	miligramos
min	minuto
ml	mililitros
mm	milímetros
mseg	milisegundo
NBT	nitro azul tetrazolio
nseg	nanosegundos

μ seg	microsegundo
NP-40	fenoxipolietoxietanol
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pseg	picosegundo
qmBBr	monobromotrimetilamonibimano
R	rodopsina desactivada
R ó Meta II	rodopsina en estado activado o Metarrodopsina II
SEB	segmento externo de los bastones
RK	rodopsina quinasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
T ó t G	transducina
T α *	forma activa de la transducina
TBST	tris-buffer salino tween 20
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletildiamina
TFA	ácido trifluoracético
Tris base	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UV-V	espectroscopía de luz ultravioleta y visible

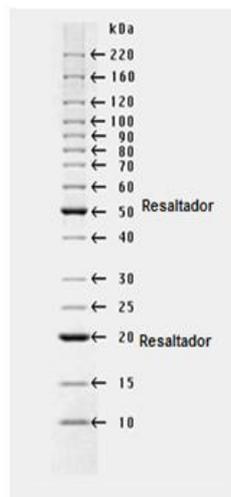
10.2. Tabla 1a. Nombre, estructura y abreviaturas uno y tres letras para los 20 aminoácidos

Aminoácido	Estructura	Aminoácido	Estructura
Alanina (A , Ala)		Isoleucina (Ile, I)	
Ácido Aspártico (Asp, D)		Leucina (Leu, L)	
Ácido Glutámico (Glu, E)		Lisina (Lys, K)	
Arginina (Arg, R)		Metionina (Met, M)	
Asparagina (Asn, N)		Prolina (Pro, P)	

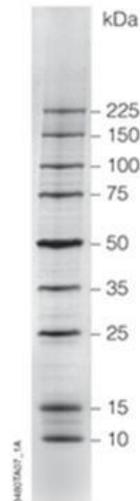
<p>Cisteína (Cys, C)</p>		<p>Serina (Ser, S)</p>	
<p>Fenilalanina (Phe, F)</p>		<p>Treonina (Thr, T)</p>	
<p>Glutamina (Gln, Q)</p>		<p>Tirosina (Tyr, Y)</p>	
<p>Glicina (Gly, G)</p>		<p>Triptófano (Trp, W)</p>	
<p>Histidina (His, H)</p>		<p>Valina (Val, V)</p>	

10.3. Marcadores utilizados en la electroforesis

Marcadores de proteínas para electroforesis teñidos con azul de coomassie. En A, marcadores de la casa comercial Benchmark y en B, marcadores de la casa comercial Promega.

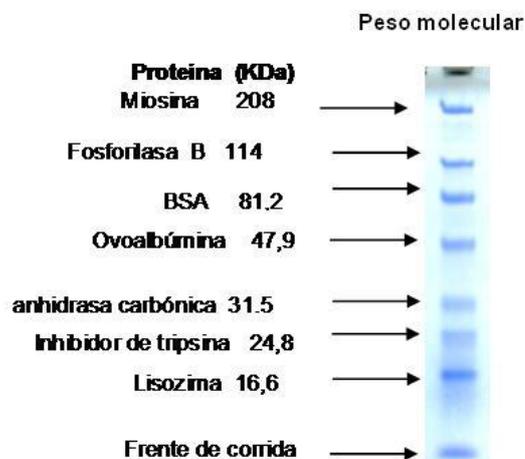


A. Separación en un gel al 12 % poliacrilamida



B. Separación en un gel de gradiente de 4-20 % poliacrilamida

Marcador para electroforesis utilizado en Western Blot (Benchmark Protein ladder, blue marker mix), gel de 12 % de poliacrilamida.



10.4. Determinación de la concentración de rodopsina en las membranas de los SEB

La concentración de la rodopsina en los SEB fue calculada a partir de la absorbancia obtenida a 500nm y utilizando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 40700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para ello se empleó la ecuación de ley de Beer ($\text{Abs} = \epsilon bC$), y se tomó en cuenta el factor de dilución de la muestra (50 μl en 500 μl). En consecuencia, b es el ancho de la celda, el cual es de 1cm ^[27].

Por ejemplo para una muestra la absorbancia a 500nm fue de 0,300096

$$C = \frac{\text{Abs}}{\epsilon b}$$

$$C = \frac{0,300096}{40700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 7,3734 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$7,3734 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 39007,70 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,28761 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,28761 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

De acuerdo al factor de dilución

$$0,28761 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{500\mu\text{l}}{50\mu\text{l}} = 2,98761 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

Para un volumen final de muestra de 3,5 ml

$$2,98761 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 3,5 \text{ ml} = 10,0664 \text{ mg}$$