

Aproximaciones de bioquímica clásica al estudio

de la relación entre la estructura y la función de la rodopsina ¶

Rafael Medina ‡, Carolina Moller †, Deisy Perdomo #, y José Bubis ¶, *

Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

‡ Doctor en Ciencias Biológicas. Dirección actual: Centro de Biociencias y Medicina Molecular, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Apartado Postal 17.606, Caracas 1015-A, Venezuela.

† Doctor en Ciencias Biológicas. Dirección actual: Department of Chemistry and Biochemistry, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida 33431, U. S. A.

Doctor en Ciencias Biológicas. Dirección actual: Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

¶ Ph. D. en Química. Dirección actual: Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

* La correspondencia debe ser dirigida a: José Bubis, Laboratorio de Química de Proteínas, Departamento de Biología Celular, División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89.000, Valle de Sartenejas, Baruta, Caracas 1081-A, Venezuela. Teléfono: +58 212 9064219. Fax: +58 212 9063064. E-mail: jbbubis@usb.ve

¶ Este trabajo fue financiado por el FONACIT, subvención No. S1-2000000514.

Recibido: 15/11/2007

Aceptado: 16/12/2007

Resumen

La proteína fotorreceptora rodopsina (R) fue extraída de los segmentos externos de los bastoncillos de retinas bovinas con el detergente n-dodecil β -D-maltósido (DM) y purificada a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad. El entrecruzamiento químico de la R y de la rodopsina fotoactivada (R*) con los agentes bifuncionales sulfo-succinimidilo 4-(N-maleimidometilo) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) o m-maleimidobenzilo-N-hidroxisuccinimido ester, sugirieron la naturaleza oligomérica de la proteína fotorreceptora. La caracterización de los parámetros hidrodinámicos de la R y la R* en presencia de 0.1% DM, mediante cromatografía de exclusión molecular y sedimentación sobre gradientes de sacarosa, permitió estimar los tamaños de los complejos R:DM y R*:DM. Los resultados concuerdan con una estructura cuaternaria dimérica tanto para la R como para la R*. La R entrecruzada con sulfo-SMCC, en presencia de luz, fue estabilizada en un fotointermediario que absorbió a ~ 470 nm. Experimentos de proteólisis con termolisina sobre los dímeros nativos de R y sobre los monómeros de R generados por medio del uso de altas concentraciones de DM, complementados con estudios de modelaje basados en la estructura cristalina reportada de la proteína, sugirieron que el reactivo sulfo-SMCC generó un entrecruzamiento intramolecular entre la Cys₁₄₀ y la Lys₂₄₈ de la R, el cual posiblemente es el responsable de la incapacidad de la proteína de sufrir el cambio conformacional requerido para llegar a su estado fotoactivado.

Palabras claves: Rodopsina, dimerización de receptores, entrecruzamiento químico, fotointermediarios, proceso visual.

Abstract

The photoreceptor protein rhodopsin (R) was extracted from bovine retinal rod outer segments using the detergent n-dodecyl β -D-maltoside (DM), and purified to homogeneity by affinity chromatography. Chemical cross-linking of R and photoactivated rhodopsin (R*) with the bifunctional agents sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) or m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester, suggested the oligomeric nature of this photoreceptor protein. The characterization of the hydrodynamic parameters of R and R* in the presence of 0.1% DM, using molecular exclusion chromatography and sedimentation on sucrose gradients, allowed us to estimate the size of the R:DM and R*:DM complexes. Our results agreed with a dimeric quaternary structure for both, R and R*. R cross-linked with sulfo-SMCC, in the presence of light, was stabilized in a photointermediate that absorbed at ~ 470 nm. Experiments of proteolysis with termolysine on R native dimers and R monomers generated by using high concentrations of DM, together with modeling studies based on the reported crystal structure of the protein, suggested that sulfo-SMCC generated an intramolecular cross-link between Cys₁₄₀ and Lys₂₄₈ of R, which was probably responsible for the incapacity of the protein to display the conformational change required to reach its photoactivated state.

Key words: Rhodopsin, receptor dimerization, chemical cross-linking, photointermediates, visual process.

Introducción

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen la más amplia y caracterizada superfamilia de proteínas integrales de membrana. Estos receptores han sido motivo de mucho interés dada su amplia versatilidad para mediar y comunicar una gran diversidad de señales biológicas al interior celular, actuando como sensores especializados a nivel de

la membrana plasmática. La estructura basal de estas moléculas consiste de una coraza central de siete hélices α transmembranales, las cuales son comunes a todos los miembros de la superfamilia.

La rodopsina (R) es el GPCR que ha sido más estudiado tanto estructural como funcionalmente y es la proteína fotorre-

ceptora en la visión escotópica. Este receptor se encuentra embebido en las membranas de los discos de los bastoncillos retinales y está constituido por una secuencia polipeptídica, la opsina, de 348 aminoácidos^{1,2}, ligada a un cromóforo de naturaleza lipídica, el 11-cis-retinal, el cual forma una base de Schiff protonada con la Lys₂₉₆ de la proteína. Esta unión covalente está estabilizada por el Glu₁₁₃, el cual actúa como un contraión para la base de Schiff³. La R presenta un puente disulfuro entre las Cys₁₁₀ y Cys₁₈₇, el cual es esencial para el correcto plegamiento de la proteína⁴. Como es característico en otros GPCRs, en la R existen glicosilaciones a nivel de los residuos Asn₂ y Asn₁₅ localizados en la región NH₂-terminal de la proteína⁵. La R también sufre palmitilaciones en las Cys₃₂₂ y Cys₃₂₃ situadas cerca de su COOH-terminal^{6,7}.

El proceso visual se inicia con la transformación de energía lumínica en una señal química que puede ser analizada por el cerebro. La R capta los fotones de luz, a través del 11-cis-retinal, el cual en consecuencia se isomeriza a su forma todo trans-retinal. La alteración configuracional sufrida por el cromóforo, provoca un cambio conformacional en la proteína convirtiéndola en la rodopsina fotoactivada (R*). R* se corresponde con la especie fotointermediaria conocida con el nombre de metarodopsina II. La R* es entonces capaz de asociarse a la proteína G heterotrimérica transducina (T) en su forma inactiva o unida a GDP (T_{αβγ}-GDP). Esta interacción produce el intercambio de GDP por GTP en el bolsillo de unión de nucleótidos de la subunidad α de la T (T_α) y la disociación de la holoenzima en sus unidades funcionales T_α-GTP (subunidad activa) y el complejo T_{βγ}. Posteriormente, la T_α-GTP estimula a la enzima efectora de este sistema, una fosfodiesterasa de GMP cíclico (PDE6) por la remoción de sus subunidades γ-inhedoras. La PDE6 activa, promueve la hidrólisis y concomitante disminución de los niveles de GMP cíclico intracelular. La reducción de los niveles de este nucleótido, produce el cierre de los canales de compuerta dependientes de GMP cíclico, los cuales se encuentran ubicados en la membrana plasmática de dichas células. Seguidamente, ocurre un bloqueo del flujo de iones de Na⁺ y Ca²⁺ y una reducción de la corriente eléctrica circulante. Finalmente, la hiperpolarización de la membrana genera una señal neuronal que es transmitida hasta el cerebro⁸. El apagado de esta cascada ocurre una vez que la R* ha cumplido con su función de activar a la T y se ha producido una reducción importante de los niveles de Ca²⁺ intracelular. En este punto, una proteína quinasa específica, la rodopsina quinasa (RK), es disociada de una proteína reguladora enlazadora de Ca²⁺, la recoverina, siendo entonces capaz de fosforilar predominantemente los residuos de Ser₃₃₄, Ser₃₃₈ y Ser₃₄₃ localizados en la cola COOH-terminal de la R*⁹. La R* fosforilada se convierte en sustrato de otra proteína denominada arrestina-1 (Arr1), la cual al enlazarse, bloquea el sitio de interacción con la T, inhibiendo así la capacidad de R* de reconocer y activar otras T. De esta manera se inicia el proceso de desensibilización de la R*.

La estructura cristalina de la R bovina ha sido resuelta¹⁰ y posteriormente refinada^{11,12}. Estos trabajos han servido como marco de referencia para postular el plegamiento general de

otros GPCRs con motivos estructurales comunes con la R^{13,14}. Aunque una combinación de técnicas biofísicas tradicionales ha sugerido que la R es una proteína monomérica, aleatoriamente dispersa, que difunde libremente en un modelo de membrana lipídica fluida de los discos de los bastoncillos^{15,20}, Fotiadis y col.^{21,22} y Liang y col.²³ demostraron recientemente, mediante microscopía de fuerza atómica, que las moléculas de R como de la opsina se encontraban empaquetadas como líneas de dímeros en las membranas de los discos de los segmentos externos de los bastoncillos (SEB). Para contribuir a la clarificación de esta controversia, nosotros analizamos las propiedades hidrodinámicas de las R y R* bovinas, solubilizadas en n-dodecil β-D-maltósido (DM), con el propósito de elucidar sus estructuras cuaternarias en estado nativo. Las propiedades funcionales de la R tratada con el agente bifuncional sulfo-succinimidilo 4-(N-maleidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) también fueron caracterizadas, identificándose un posible sitio de entrecruzamiento intramolecular dentro de la proteína, que produce la estabilización de un fotointermediario de la R con un pico de absorción máxima a ~ 470 nm.

Métodos

Materiales. Los ojos bovinos fueron obtenidos en el Matadero Caracas, C.A. Los reactivos utilizados procedieron de las siguientes casas comerciales: concanavalina A-Sepharose 4B y Sephacryl S-300, Amersham Biosciences; sulfo-SMCC, m-maleidobenzoilo-N-hidroxisuccinimido ester (MBS), anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, Pierce; 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro blue tetrazolium (NBT), Promega; DM, Anatrace; kit de marcadores de peso molecular para cromatografía de exclusión molecular, Nonidet-P40, Genapol X100, Sigma; membranas de nitrocelulosa (0.45 μm), Advantec; termolísina, Behring Laboratories. El anticuerpo monoclonal 1D4 dirigido en contra de la cola COOH-terminal de 18 aminoácidos de la R fue donado por el Dr. Barry Knox (State University of New York, Syracuse). El resto de los reactivos empleados fue de grado analítico.

Análisis computacional de la estructura tridimensional de R. El análisis de las distancias moleculares entre los residuos de la R fue realizado sobre la estructura cristalina de la R bovina depositada en el banco de datos de proteínas (BDP) con el identificador 1U19. Para ello, se usó el programa de visualización y estudio de macromoléculas Rasmol versión 2.7.1.1.

Extracción de retinas a partir de ojos bovinos. Los ojos bovinos fueron trasladados del matadero al laboratorio sobre hielo, bajo condiciones de estricta oscuridad. Las retinas fueron disectadas en un cuarto oscuro, bajo luz roja de seguridad, y se mantuvieron en tubos protegidos de la luz con papel de aluminio y congeladas a -70 °C hasta su utilización.

Preparación de los SEB y de las membranas lavadas de los SEB. Los SEB fueron aislados a partir de retinas bovinas congeladas, mediante flotación y subsecuente centrifugación sobre gradientes discontinuos de sacarosa^{24,25}.

Solubilización y purificación de la R. La R fue purificada por cromatografía de afinidad a través de una columna de concanavalina A-Sepharose 4B, según el procedimiento descrito por Litman²⁶. Este protocolo fue modificado al utilizar DM en vez de octilglucósido en todos los pasos.

Determinación de los espectros de absorción y de la concentración de la R. Muestras de SEB (crudos o lavados) fueron solubilizadas con una mezcla de tres detergentes. Para ello, un volumen igual a 50 μ l de los SEB en 100 mM fosfato de sodio (pH 6.8), 5 mM acetato de magnesio y 5 mM β -mercaptoetanol, fueron diluidos primero con 50 μ l de una solución de 23.2 mM de Nonidet-P40 y 12.8 mM de DM y luego con 50 μ l de 1.5 M de Genapol X100. Esta mezcla fue sometida a agitación vigorosa en vortex por aproximadamente 1-2 min. Posteriormente, la mezcla fue diluida 1/10 con agua y se le realizó un espectro de absorción UV/visible ($\lambda = 250$ -650 nm), en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Todo este procedimiento fue realizado en oscuridad. En el caso de la R purificada por cromatografía de afinidad, se tomó directamente una alícuota de la proteína. Posteriormente, la mezcla fue expuesta a irradiación con luz intensa por 1 min, con el fin de medirle un segundo espectro de absorción. La concentración de la rodopsina fue calculada a partir de la absorbancia máxima a ~ 500 nm registrada en el espectro hecho en oscuridad y utilizando el coeficiente de extinción molar de la proteína ($\epsilon = 40700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)²⁷.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las electroforesis fueron realizadas en geles de 1.5 mm de grosor al 12 % de poliacrilamida, de acuerdo a la metodología propuesta por Laemmli²⁸. Los geles fueron coloreados con azul de Coomassie R-250 o con tinción de plata²⁹. Las muestras conteniendo R nunca fueron hervidas previas a la realización de las electroforesis para así evitar su agregación y formación de complejos multiméricos. Las SDS-PAGE realizadas para visualizar los productos proteolíticos de la R, fueron llevadas a cabo en geles de poliacrilamida al 15%.

Electrotransferencias e inmunodetección de la R en filtros de nitrocelulosa. Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas (0.25 Amp, por 1 h 15 min, a 4 °C) a filtros de nitrocelulosa, en buffer de transferencia [48 mM Tris (pH 8.2), 39 mM glicina y 20% de metanol]³⁰. Las inmunotinciones fueron realizadas por la incubación de los filtros de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal anti-R 1D4 (dilución 1:15.000). Luego de los lavados respectivos, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:5.000. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas por la incubación de las membranas con los substratos precipitables para la fosfatasa alcalina, BCIP y NBT.

Reacciones de entrecruzamiento químico de la R y la R*. Las reacciones de entrecruzamiento químico fueron realizadas en muestras de las membranas lavadas de los SEB y en muestras de R purificada a una concentración de proteína de 1.28 μ M. Las muestras fueron incubadas en oscuridad o en

presencia de luz con sulfo-SMCC (5 mM) y MBS (5mM), por 1 h, a 37 °C. También se realizaron reacciones de entrecruzamiento químico de la R en función del tiempo. La solución madre conteniendo 150 mM de MBS fue preparada en dimetil sulfoxido. El entrecruzador sulfo-SMCC fue disuelto en agua desionizada a una concentración de 20 mM. Las reacciones con sulfo-SMCC y MBS fueron realizadas en presencia de 10 mM fosfato de sodio (pH 7.2), 5 mM acetato de magnesio.

Cromatografía de filtración en gel de la R y la R* solubilizadas con DM. La muestra de partida fue la R purificada por cromatografía de afinidad, la cual se encontraba en 0.1% (1.96 mM) de DM. Las muestras purificadas de la R o la R* (0.5-0.8 mg), fueron aplicadas sobre el tope de una columna de Sephacryl S-300. La columna tenía un tamaño de 120 x 1 cm de longitud y fue cargada con un volumen total (V_t) = 50.3 ml de resina. La columna fue previamente equilibrada con el tampón de exclusión [50 mM Hepes (pH 6.6), 150 mM NaCl, 3 mM cloruro de magnesio, 2 mM cloruro de calcio, 5 mM β -mercaptoetanol y 0.1% DM]. Para la calibración de la columna se utilizaron las siguientes proteínas estándares: β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina de suero bovino dimérica (134 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimiotripsinógeno A (29 kDa), ribonucleasa A (13.4 kDa) y citocromo C (12.4 kDa). Las proteínas estándares fueron disueltas en 0.5-1.0 ml de la R o la R* solubilizadas y las mezclas de proteínas fueron sometidas a cromatografía en conjunto a 4 °C, en oscuridad (R) o en presencia de la luz (R*). El volumen excluido de la columna (V_o) y el volumen incluido fueron estimados mediante corridas cromatográficas de azul de dextrano y dicromato de potasio, respectivamente. La separación en la columna se realizó con un flujo constante de 150 μ l/min. La absorbancia de las fracciones eluidas fueron monitoreadas simultáneamente a 280, 380 y 498.5 nm, para la detección de proteína, R* y R, respectivamente. Las fracciones contentivas de proteínas según los registros de absorbancia, fueron separadas por SDS-PAGE con la finalidad de determinar los picos de elución de las proteínas estándares y calcular los respectivos volúmenes de elución (V_e) de las mismas. La elución de la R y la R* fue monitoreada inmunológicamente por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal 1D4. Finalmente, se procedió a calcular el coeficiente de partición (K_{av}) de las proteínas mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) \quad (\text{Ec. 1})$$

Dado que la concentración de DM empleada fue superior a su concentración micelar crítica (CMC = 0.18 mM), tanto la R como la R* se encontraban insertadas en micelas formando complejos con el detergente. El peso molecular de los complejos R:DM y R*:DM fue empíricamente determinado graficando el valor de K_{av} de cada uno de los estándares versus el logaritmo de su peso molecular. Una relación lineal fue adicionalmente obtenida al graficar el $(-\log K_{av})^{1/2}$ en contra de los radios de Stokes de cada una de las proteínas empleadas como estándares³¹. Esta aproximación permitió calcular el radio de Stokes de los complejos R:DM y R*:DM.

Sedimentación por ultracentrifugación de la R y la R*. La R fue sedimentada en gradientes lineales de sacarosa del 10 al 30%. Las soluciones de 10 y 30% de sacarosa fueron disueltas en buffer de sedimentación [50 mM Tris-HCl pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 5 mM cloruro de magnesio, 0.15 M cloruro de amonio, 0.2 mM ditioneitol, y 0.1% DM]. Los gradientes fueron calibrados mediante la sedimentación de marcadores de peso molecular con coeficientes de sedimentación conocidos: alcohol deshidrogenasa (7.4 S), quimiotripsinógeno A (2.6 S) y ribonucleasa A (2.0 S). También se incluyó la forma soluble de una glicoproteína variante de superficie (VSG) de un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi* cuyo coeficiente de sedimentación (5.67 S) fue reportado por Uzcanga y col.³² La R solubilizada en detergente (0.3 mg, $V_t = 300 \mu\text{l}$), sirvió para la resuspensión de los estándares señalados arriba. Las proteínas resuspendidas en conjunto fueron servidas sobre el tope del gradiente de sacarosa, en oscuridad. Los gradientes fueron ultracentrifugados a $200.000 \times g$, por 18 h, a 4°C en una centrifuga Beckman, rotor SW 50Ti. Las fracciones fueron colectadas desde la base del tubo por punción con una aguja. Las alícuotas colectadas de cada gradiente fueron analizadas por SDS-PAGE para determinar el pico de cada uno de los estándares y luego determinar el respectivo volumen de migración (V_m). La migración del complejo R:DM fue determinada por el monitoreo de la absorbancia de cada fracción a 280, 380 y 498.5 nm y por inmunotinción de las proteínas electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa³⁰, usando el anticuerpo monoclonal 1D4. Posteriormente el volumen de migración (V_m) de cada proteína estándar fue graficado en contra de su respectivo coeficiente de sedimentación (S). Esta curva de calibración fue utilizada para calcular el S del complejo R:DM, según Martín y Ames³³. La masa molecular del complejo R:DM fue estimada a partir de una curva de calibración de las masas moleculares de las proteínas estándares versus sus radios de Stokes multiplicados por sus coeficientes de sedimentación³¹. Un procedimiento idéntico fue empleado para determinar el S y el tamaño del complejo R*:DM, con la única variación de que la muestra de R a ser sedimentada, fue previamente fotolizada.

Obtención de monómeros de R. Las membranas lavadas de los SEB fueron solubilizadas con 50 mM Hepes (pH 6.6), 140 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 20% glicerol, 2 mM CaCl_2 , 1% DM (19.6 mM), por agitación vigorosa en un vortex por 1-2 min e incubación sobre hielo por 2 h, y luego fueron centrifugadas en una ultracentrifuga Sorvall RC M120, rotor 120AT, a 35.000 rpm, por 30 min, a 4°C . El sobrenadante fue sometido a cromatografía de exclusión molecular a través de Sephacryl S-300 para corroborar su estructura monomérica. Como tampón de equilibrio y elución de la columna se utilizó 50 mM Hepes (pH 6.6), 140 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 20% glicerol y 2 mM CaCl_2 , conteniendo 10 mM DM, una concentración de detergente que mantiene artificialmente el estado monomérico de la R³⁴.

Proteólisis con termolisina de la R entrecruzada con sulfo-SMCC. Muestras de R dimerica y monomérica, obtenidas usando una concentración baja (1.96 mM) o alta (19.6 mM) de DM, respectivamente, fueron sometidas a entrecruza-

miento con 5 mM de sulfo-SMCC, en presencia de 10 mM fosfato de sodio (pH 7.2) y 5 mM acetato de magnesio, por 1 h, a 37°C . La R entrecruzada fue posteriormente incubada con termolisina en una proporción 20:1 (proteína:proteasa), en 100 mM Hepes (pH 6.8), 20 mM cloruro de calcio, a temperatura ambiente, por 16 h y en oscuridad. La reacción de proteólisis fue detenida por adición de tampón de muestra para SDS-PAGE²⁸. El volumen total de la reacción fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. Los geles fueron teñidos con plata para la visualización de los fragmentos termolíticos. Como control, también se realizaron reacciones de proteólisis con termolisina de muestras de R no entrecruzadas.

Resultados

Purificación de R. Las membranas de los SEB fueron tratadas con DM y el homogenato fue sometido a cromatografía de afinidad a través de una resina de concanavalina A-Sepharose 4B. En la Fig. 1A, se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, en el cual fueron separadas las fracciones correspondientes a los distintos pasos de la purificación de la R. La línea 1 presenta el perfil polipeptídico de la fracción de las membranas de los SEB homogenizados con DM. Nótese la presencia de una banda mayoritaria migrando con una masa molecular aparente de ~ 35 kDa, correspondiente con el tamaño esperado para la R. Esta fracción fue incubada con la resina, a 4°C , durante toda noche. En la línea 2, se muestra la fracción no unida a la resina. Luego de los lavados respectivos de la resina en el buffer apropiado (líneas 3 y 4), se procedió a incubar la resina con el buffer de elución conteniendo 0.5 M de α -metilmanósido, para así despegar la R por competencia. En las líneas 5-8 de la Fig. 1 A, se muestra el perfil electroforético de las fracciones eluidas de la resina con α -metilmanósido. Nótese en las líneas 5-8, la aparición de la banda con masa molecular aparente de ~ 35 kDa. Para confirmar que esta banda correspondía a la R, una alícuota de la fracción representada en la línea 8 (Fig. 1 A), fue electrotransferida a filtros de nitrocelulosa y sometida a análisis por inmunotinción usando el anticuerpo monoclonal 1D4. En la Fig. 1 B, se muestra la aparición de una banda inmunoteñida migrando con una masa molecular aparente de 35 kDa, coincidente con el peso de la proteína purificada por afinidad. Los espectros UV/Vis realizados sobre la R purificada (Fig. 1 C), muestran un pico máximo de absorción a 498.5 nm, el cual es específico para la forma inactiva de la R. Luego de 1 min de iluminación intensa sobre la misma muestra, se produjo la desaparición del pico a 498.5 nm y la aparición de nuevas especies de proteína absorbiendo a 380 nm, lo cual es característico de la R*. Estos resultados confirmaron la purificación parcial de la proteína fotorreceptora R. El porcentaje de recuperación de la R, luego de la cromatografía de afinidad, fue calculado en ~ 65 -75%.

Entrecruzamiento químico de la R. Para evaluar las posibles interacciones R-R, se seleccionaron dos agentes entrecruzadores heterobifuncionales (sulfo-SMCC y MBS), los cuales contenían grupos reactivos para residuos de Cys y Lys separados por una distancia de 11.6 y 9.9 Å, respectivamente^{35,37}.

Las reacciones de entrecruzamiento con sulfo-SMCC y MBS fueron conducidas tanto con la proteína purificada en presencia de DM, así como con las membranas lavadas de los SEB, para respetar las condiciones nativas de la proteína embebida en la membrana.

El tratamiento de las membranas lavadas de los SEB con 5 mM de sulfo-SMCC o MBS, a 37 °C, resultó en un descenso en la cantidad de la R que migra a ~ 35 kDa en SDS-PAGE, correspondiente a los monómeros de la R (R1). Esto fue concomitante con la formación mayoritaria de dímeros covalentemente asociados de la R (R2) y en menor proporción, trímeros (R3) y formas oligoméricas (Rn) de la R (datos no mostrados). Sin embargo, dado que la R existe en una densidad muy alta en estas membranas²³, se podrían favorecer las colisiones al azar de esta proteína, generándose entrecruzamientos accidentales por interacciones inespecíficas entre monómeros. En este sentido, la desintegración de las membranas en presencia de un detergente suave, no iónico, como DM, disminuyó significativamente la concentración de la R presente en la reacción, lo cual, se tradujo en una reducción de la frecuencia de colisiones aleatorias entre las moléculas de la R.

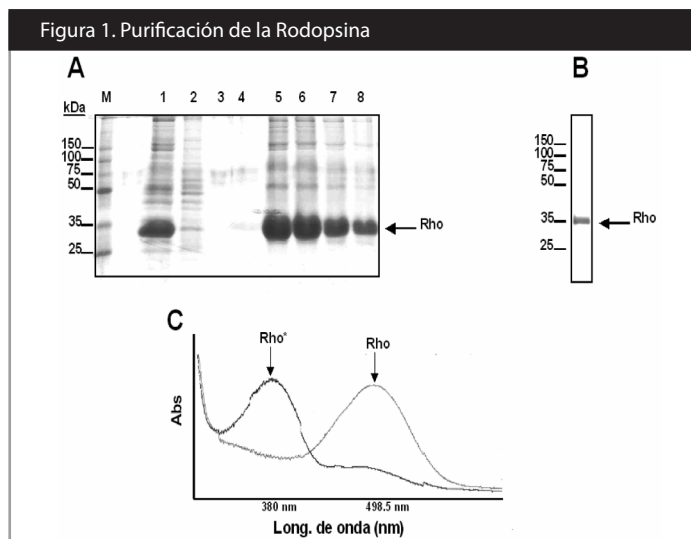


Figura 1 Purificación de la Rodopsina. A, SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la R a través de una columna de concanavalina A Sepharose 4B. Los SEB intactos fueron solubilizados con 1% DM y luego diluidos a 0.1% DM (línea 1). Línea 2, fracción de proteínas de membrana no unidas a la resina. Líneas 3 y 4, lavados de la resina con el tampón de equilibrio. Líneas 5-8, elución de la R con 0.5 M de β -metil manósido. B, Inmunotinción de una fracción de R eluida de la resina usando el anticuerpo monoclonal 1D4. La flecha indica la detección inespecífica de la R. C, Espectros UV/Vis de la fracción de R eluida de la resina en oscuridad (espectro azul claro con el pico de absorbancia máxima a 498.5 nm), o en presencia de luz (espectro azul oscuro con pico de absorbancia máxima a 380 nm).

La Fig. 2 muestra los resultados del entrecruzamiento químico con MBS, en función del tiempo, de la R purificada con DM. La proteína fue detectada por inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 1D4. Las especies R2, R3 y Rn, en adición a los monómeros R1, fueron inmunoteñidos con el anticuerpo monoclonal 1D4. Al igual que con sulfo-SMCC, se observó una formación incompleta de productos entrecruzados con MBS, con una clara prevaencia por la formación de especies R2 entrecruzadas.

Figura 2. Inmunotinción de la reacción de entrecruzamiento en función del tiempo de la R con el agente MBS

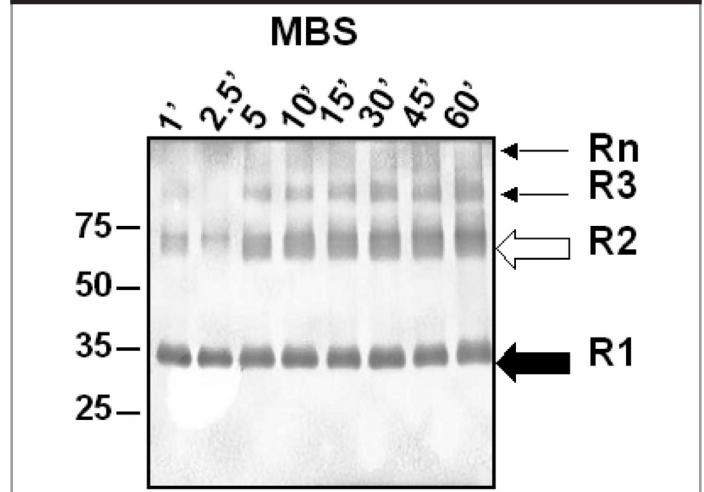


Figura 2. Inmunotinción de la reacción de entrecruzamiento en función del tiempo de la R con el agente MBS. Las reacciones de entrecruzamiento de la R con 5 mM del agente MBS, en función de los tiempos indicados, fueron detenidas a los tiempos especificados con 20 mM de β -mercaptoetanol. Las reacciones fueron sometidas a SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa, e inmunoteñidas usando el anticuerpo monoclonal 1D4. R1, R2, R3 y Rn = productos monoméricos, diméricos, triméricos y multiméricos de la R, respectivamente.

Caracterización de los parámetros hidrodinámicos de los complejos R:DM y R*:DM. Cuando la R solubilizada en 1.96 mM DM (R:DM), fue sometida a cromatografía de exclusión molecular sobre una matriz de Sephacryl S-300 y en oscuridad, la proteína eluyó en un pico único y agudo de especies que absorben a 498.5 nm (datos no mostrados). De la misma manera, el complejo R*:DM eluyó como un pico único y agudo, absorbiendo a 380 nm. Los tamaños de los complejos R:DM y R*:DM, fueron determinados empíricamente a través de la construcción de una gráfica que relacionó el valor del coeficiente de partición (K_{av}) de cada proteína estándar, versus el logaritmo del peso molecular correspondiente. La interpolación del K_{av} de los complejos R:DM y R*:DM en dicha gráfica, arrojó pesos moleculares de 128.000 y 126.000, respectivamente. Dado que el procedimiento cromatográfico se realizó a una concentración de DM por encima de su CMC, la R se encontraba insertada en micelas de DM. Se ha reportado que el peso molecular de una micela de DM es de aproximadamente 50.000³⁸. En consecuencia, el tamaño real de la R y la R*, fue calculado substrayendo el peso de la micela del tamaño total del complejo proteína:detergente. Este abordaje produjo masas moleculares de 78 kDa y 76 kDa, respectivamente. Estos resultados predicen que ambas conformaciones de la proteína, R y R*, son diméricas.

En una curva de calibración de $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus los radios de Stokes (a) de cada proteína estándar, se interpolaron los valores de $(-\log K_{av})^{1/2}$ calculados para cada uno de los complejos de R:DM y R*:DM. Esto permitió conocer los radios de Stokes de dichos complejos resultando en valores de 4.18 y 4.15 nm para la R y la R*, respectivamente (datos no incluidos). Adicionalmente, el coeficiente de sedimentación (S) de los complejos R:DM y R*:DM, fue medido por sedimentación de la R y la R* en gradientes continuos de 10 a 30% de sacarosa previamente calibrados y en presencia de 0.1% DM. El coeficiente de sedimentación obtenido fue de 5.78 S para ambos complejos, R:DM y R*:DM.

Para proteínas esféricas, la masa molecular de una especie puede ser calculada empleando el valor de su radio de Stokes y su respectivo coeficiente de sedimentación, según la siguiente relación:

$$M = 6\pi\eta N a s (1 - \nu\rho) \quad (\text{Ec. 2})$$

En la Ec. 2, M es la masa molecular, a es el radio de Stokes, s es el coeficiente de sedimentación, ν es el volumen específico parcial, η es la viscosidad del medio, ρ es la densidad del medio y N es el Número de Avogadro. Usando esta aproximación, se construyó una curva de calibración de M versus el producto del radio de Stokes por el coeficiente de sedimentación ($a \times s$). La interpolación del producto de $a \times s$ de los complejos R:DM y R*:DM, resultó en pesos moleculares de 107.000 y 111.000, respectivamente. La substracción del peso molecular de la micela de DM al peso de los complejos produjo valores de 57.000 Da y 67.000 Da para la R y la R*, respectivamente. Nuevamente, se pudo detectar una estructura cuaternaria dimérica para ambas conformaciones de la proteína.

Todos los resultados relacionados con la determinación de las propiedades hidrodinámicas de la R y la R* han sido reportados previamente³⁹.

Efectos del entrecruzamiento químico sobre la funcionalidad de la R. La rodopsina entrecruzada fue solubilizada en presencia de DM, purificada cromatográficamente y sometida a un estudio espectrofotométrico para evaluar la aparición de los fotointermediarios de la proteína, en función del tiempo de iluminación. Un espectro alterado fue obtenido a partir de la R entrecruzada con sulfo-SMCC luego de su iluminación. A diferencia de la R* control, se pudo notar como la R entrecruzada fue incapaz de progresar hasta la formación de la metarodopsina II, especie que absorbe a 380 nm. Sin embargo, si hubo inicio de la fotoisomerización del retinal, ya que se detectó una reducción de las especies que absorben a 498.5 nm. Adicionalmente, el entrecruzamiento de la proteína detuvo la progresión del cambio conformacional de la R entrecruzada en un fotointermediario que absorbe a ~ 470 nm (datos no mostrados).

Disociación de los dímeros nativos de la R empleando altas concentraciones de detergente. Cuando la R solubilizada en 19,6 mM DM (1% DM) fue sometida a cromatografía de filtración de gel en una columna de Sephacryl S-300 y en oscuridad, empleando 10 mM DM en el tampón de elución, la proteína eluyó como un pico único y agudo de especies que absorbieron a 498.5 nm (datos no mostrados). El tamaño del complejo R:DM fue determinado empíricamente mediante el uso de estándares de pesos moleculares conocidos. Posteriormente, el tamaño de la R fue determinado substrayendo el peso de la micela del tamaño total del complejo proteína-detergente. Bajo estas condiciones, la R tuvo una masa molecular de 34.608 Da (datos no mostrados), la cual coincidió con el tamaño reportado para la forma monomérica de la R según su estructura primaria (~ 40.000).

Proteólisis con termolisina de la R en condición dimérica o monomérica entrecruzada con sulfo-SMCC. La R nativa es

digerida en dos fragmentos por la acción proteolítica de la termolisina, los cuales han sido denominados F1, desde el residuo NH₂-terminal hasta la Ser₂₄₀ (~ 26 kDa), y F2, desde la Ala₂₄₁ a la Pro₃₂₇ (~ 12 kDa). También se origina un fragmento pequeño conteniendo los residuos remanentes de la cola COOH-terminal de la proteína. Cuando la R dimérica o monomérica fue sometida a proteólisis con termolisina, ambas moléculas fueron digeridas, generando los polipéptidos F1 y F2 (datos no incluidos). Cuando las mismas fracciones fueron entrecruzadas con sulfo-SMCC y luego tratadas con termolisina, no se evidenció la generación de los fragmentos F1 y F2 (datos no mostrados). La ausencia de fragmentos proteolíticos en la R dimérica o monomérica entrecruzadas, provee una evidencia de que el sulfo-SMCC entrecruza intramolecularmente a los monómeros de la R al intercalarse covalentemente entre aminoácidos de Cys y Lys.

Discusión

Estudios de difracción de rayos X de ángulo bajo, de difracción de neutrones y de microscopía electrónica^{15,18,20} evidenciaron que la R se mostraba aleatoriamente dispersa, y sin ningún ordenamiento especial, a lo largo de las membranas de los discos de los SEB. Estos experimentos sugirieron que la R se encontraba organizada como un monómero en dichas membranas. De igual forma, mediciones biofísicas de fotometría de flash de alta velocidad y microespectrofotometría indicaron que la R exhibía constantes rápidas de difusión lateral y rotacional^{16,17}, las cuales también eran consistentes con una estructura de tipo monomérica. Fue por ello que por muchos años se asumió que la R existía exclusivamente en un arreglo monomérico. Sin embargo, la existencia de zonas altamente heterogéneas en cuanto al contenido de lípidos y proteínas en las membranas de los SEB, como lo son los microdominios de membrana resistentes a detergentes o balsas lipídicas^{40,41}, puso en cuestionamiento que todas las moléculas de la R presentaran constantes uniformes de rápida difusión lateral y rotacional, y correspondieran a poblaciones homogéneas de monómeros. Recientemente, varios reportes en los cuales se empleó microscopía de fuerza atómica²¹⁻²³, demostraron que la R y la opsina se encuentran empaçadas como líneas de dímeros organizados en un arreglo paracrystalino dentro de las membranas de los SEB. A raíz de estos resultados tan contradictorios, se planteó una polémica muy controversial que aún está en fuerte discusión^{42,43}.

Para contribuir a la clarificación de esta controversia, nosotros analizamos las propiedades hidrodinámicas de las R y R* bovinas, solubilizadas con DM³⁹. La aplicación de procedimientos de cromatografía de filtración de gel y de sedimentación en gradientes lineales de sacarosa evidenció que las R y R*, en su estado nativo, presentaban pesos moleculares de aproximadamente el doble del tamaño de un monómero de la R según su estructura primaria^{1,2}. Estos resultados claramente demostraron la ocurrencia de una estructura cuaternaria dimérica para la proteína fotorreceptora solubilizada con DM, en ambas conformaciones. Adicionalmente, estudios de entrecruzamientos químicos de la R y la R* con MBS y sulfo-SMCC, también proveyeron evidencias de la naturaleza

oligomérica de la proteína, observándose la formación mayoritaria de formas dimericas y en menor grado, productos conteniendo un mayor número de moléculas entrecruzadas (trímeros, tetrámeros y oligómeros mayores). La observación de estas formas entrecruzadas multiméricas es consistente con los arreglos paracrystalinos detectados por microscopía de fuerza atómica para la R^{22,23}.

De forma interesante, el fotociclo de la R entrecruzada con sulfo-SMCC se detuvo a nivel de un fotointermediario absorbiendo a ~ 470 nm. En el fotociclo normal, la absorción de luz por la R conlleva a la fotoisomerización del enlace doble C11-C12 del 11-cis-retinal a su configuración trans. Esta reacción fotoquímica es una de las más rápidas conocidas en biología y produce una serie de fotointermediarios que culminan en la formación de la R*, el cual corresponde a la especie conocida como metarodopsina II⁴⁴. Cada uno de estos estados intermedios está caracterizado por una longitud de onda máxima y pueden ser atrapados a bajas temperaturas: R ($\lambda_{\max} = 500$ nm), fotorodopsina ($\lambda_{\max} = 550$ nm), batorodopsina ($\lambda_{\max} = 535$ nm), intermediario desplazado hacia el azul o BSI ($\lambda_{\max} = 470$ nm), luminorodopsina ($\lambda_{\max} = 497$ nm), metarodopsina I ($\lambda_{\max} = 478$ nm) y metarodopsina II ($\lambda_{\max} = 380$ nm). A temperatura corporal, la metarodopsina I y la metarodopsina II existen en un equilibrio desplazado hacia el estado metarodopsina II. Análisis in vitro han mostrado que también ocurre un decaimiento posterior de la metarodopsina II a la metarodopsina III ($\lambda_{\max} = 465$ nm). Finalmente, el cromóforo se disocia de la proteína, produciéndose la mezcla de opsin y todo-trans-retinal. El fotointermediario de ~ 470 nm que se estabilizó al entrecruzar R con sulfo-SMCC pudiera corresponder ya sea al estado BSI o a la metarodopsina I, en base a sus correspondientes longitudes de onda máximas. El "congelamiento" por entrecruzamiento con sulfo-SMCC de este fotointermediario es un gran aporte para el estudio del mecanismo de acción de la R, pues posibilita futuras caracterizaciones del mismo a nivel estructural.

11

Durante la activación del receptor y por efecto de la isomerización del retinal desde su forma 11-cis a todo-trans, se produce el movimiento y rotación parcial de dos de las siete hélices transmembranales de la proteína, las hélices C y F^{45,46}. Nuestros resultados con el reactivo sulfo-SMCC apuntan a la posible ocurrencia de eventos de entrecruzamiento intermolecular de las moléculas de R en los dímeros nativos, o quizás, entrecruzamientos intramoleculares o modificaciones monofuncionales a nivel de los monómeros de la R. En cualquiera de los casos, la incorporación de este compuesto entrecruzador pareció ejercer un efecto de bloqueo del movimiento y rotación de las hélices transmembranales en la R durante la fotoisomerización del cromóforo. Entonces, es posible pensar que el agente bifuncional justamente esté conectando residuos localizados en estas regiones o en regiones vecinas en el estado inactivo de la R, bloqueando el proceso de isomerización del cromóforo e imposibilitando así la culminación de la transición conformacional de la proteína. Para estudiar esta posibilidad se empleó la reacción de proteólisis limitada de la R con termolisina. Esta proteasa corta en el lado C-terminal del residuo Ser₂₄₀ y, en consecuencia, se originan dos fragmentos fácil-

mente observables por SDS-PAGE, F1 de ~ 26 kDa y F2 de ~ 12 kDa. La ausencia de fragmentos termolíticos F1 y F2 en la R monomérica y en la R dimerica entrecruzadas con sulfo-SMCC, permitió sugerir, de forma indirecta, que esta proteína estaba sufriendo reacciones de entrecruzamiento intramolecular. La presencia del entrecruzador intercalado intramolecularmente en la estructura de los monómeros de la R, pudiera producir la unión y concomitante estabilización covalente de los fragmentos termolíticos de la R. Esto sólo sería factible si el reactivo se encontrara entrecruzando residuos de Cys y de Lys situados a cada lado del sitio de digestión por la proteasa. Esto se traduciría en una limitante para el reconocimiento de los fragmentos termolíticos por SDS-PAGE, ya que aunque el corte se hubiera producido, el entrecruzador mantendría los fragmentos F1 y F2 enlazados covalentemente y sólo se observaría la banda de ~ 35 kDa correspondiente al monómero de la proteína.

A fin de encontrarle una explicación a dichos resultados, se realizó un análisis computacional usando el software RasMol (versión 2.7.1.1) sobre la estructura tridimensional de la R bovina, la cual, se encuentra depositada en el banco de datos de proteínas bajo el identificador 1U19, y se analizaron las distancias moleculares entre las 10 Cys y 10 Lys existentes en la estructura primaria de dicha proteína, con la finalidad de identificar aquellos residuos que estaban ubicados a las distancias apropiadas para permitir la intercalación intramolecular del sulfo-SMCC. A nivel del lazo citoplasmático que une las hélices transmembranales E y F, específicamente en el final citoplasmático de la hélice F, existen dos residuos de lisina (Lys₂₄₅ y Lys₂₄₈). Adicionalmente, en el final citoplasmático de la hélice C existe un residuo de cisteína (Cys₁₄₀). Cuando se analizó la distancia molecular entre la Cys₁₄₀ y la Lys₂₄₅, se pudo conocer que ambos residuos están separados por una distancia de 15.2 Å. Adicionalmente, al analizar la distancia molecular entre la Cys₁₄₀ y la Lys₂₄₈, se pudo establecer que dichos residuos están separados por una distancia de 11.98 Å. Dado que el sulfo-SMCC puede entrecruzar residuos a distancias de ~ 11.6 Å, sería probable que el agente estuviera intercalándose entre cualquiera de estos dos pares de residuos, ya que la disposición de las hélices transmembranales no es rígida. Es interesante notar que el sitio de corte por la termolisina en la R, el residuo Ser₂₄₀, se encuentra entre los residuos blancos tentativos definidos arriba para la reacción de entrecruzamiento con el sulfo-SMCC. Fue por ello importante determinar cuáles de los residuos señalados, presentaban la disposición espacial más apropiada. Al emplear una representación de espacios llenos, se pudo apreciar que la Lys₂₄₅ se encuentra embebida muy profundamente en la estructura de la proteína con respecto a la Cys₁₄₀, lo cual se traduce en un importante impedimento estérico para interactuar con el grupo succinimidilo del agente entrecruzador. En consecuencia, una reacción de entrecruzamiento intramolecular de la R con el sulfo-SMCC intercalado entre los residuos Cys₁₄₀ y Lys₂₄₅ sería muy poco probable. Al contrario, la Lys₂₄₈ se encuentra más expuesta al plano de la Cys₁₄₀ de forma tal que dicha lisina pudiera fácilmente interactuar con uno de los brazos del entrecruzador, mientras que el otro brazo del agente bifuncional pudiera

unirse covalentemente a la Cys₁₄₀. Este análisis señaló que la disponibilidad de la Cys₁₄₀ y la Lys₂₄₈ es mayor para el entrecruzamiento con sulfo-SMCC, en comparación a la accesibilidad que presentan los residuos de Lys₂₄₅ y Cys₁₄₀. En la Fig. 3, se muestra la estructura cristalina de la R bovina en un diagrama de cintas. En esta representación tridimensional se resaltan los residuos de Cys₁₄₀ y Lys₂₄₈ de la R, así como la localización del sitio de corte con la termolisina, la Ser₂₄₀. La ocurrencia de un entrecruzamiento intramolecular de la R con sulfo-SMCC, específicamente entre la Cys₁₄₀ y la Lys₂₄₈, explicaría la inhabilidad de la proteína fotorreceptora de sufrir el cambio conformacional característico en presencia de luz.

Figura 3. Estructura tridimensional de la R bovina mostrando los residuos entrecruzados con sulfo-SMCC.

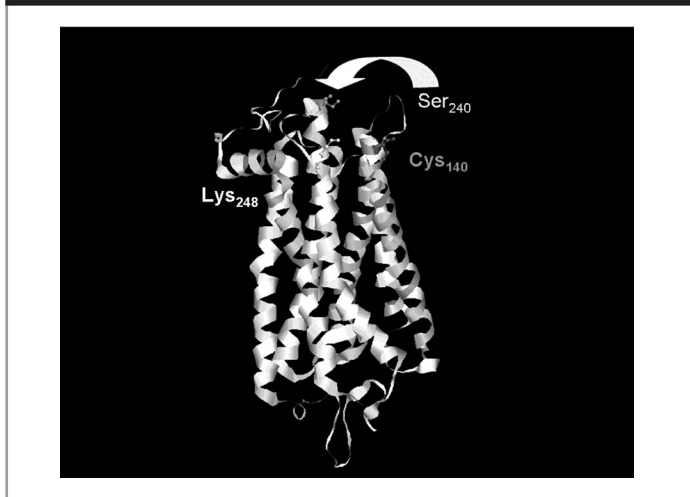


Figura 3. Diagrama de cintas de la R presentando los residuos de Cys140 y Lys248, los cuales sirven como blancos para el entrecruzamiento intramolecular de la proteína con sulfo-SMCC. También se muestra la Ser240 que corresponde al sitio de corte de la R por termolisina. Los residuos fueron resaltados en diagrama de bolas y barras. Para la elaboración del modelo se utilizó el Software para análisis y visualización de macromoléculas Rasmol.

Referencias

- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., y Feigina, M. Y., Artamonov, I. D., Zolotarev, A. S., Kostina, M. B., Bogachuk, A. S., Moroshnikov, A. I., Martinov, V. I. y Kudelin, A. B. The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. *Bioorg. Khim.* 1982; 8: 1011-1014.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S-L., Mohana Rao, J. K., y Argos, P. The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* 1983; 9: 235-244.
- Sakmar, T. P., Franke, R. R., y Khorana, H. G. Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989; 86: 8309-8313.
- Davidson, F. F., Loewen, P. C., y Khorana, H. G. Structure and function in rhodopsin: replacement by alanine of cysteine residues 110 and 187, components of a conserved disulfide bond in rhodopsin, affects the light-activated metarhodopsin II state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 4029-4033.
- Hargrave, P. A. The amino-terminal tryptic peptide of bovine rhodopsin; a glycopeptide containing two sites of oligosaccharide attachment. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 492: 83-94.
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., y Bogachuk, A. S. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett.* 1988; 230: 1-5.
- Papac, D. I., Thornburgh, K. R., Bullesbach, E. E., Crouch, R. K., y Knapp, D. R. Palmitoylation of a G-protein coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 16889-16894.
- Baylor, D. How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93: 560-565.
- Maeda, T., Imanishi, Y., y Palczewski, K. Rhodopsin phosphorylation: 30 years later. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003; 22: 417-434.
- Palczewski, K., Kumasaca, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Letrong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., y Millano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000; 289: 739-745.
- Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K., y Stenkamp, R. E. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* 2001; 40: 7761-7772.
- Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J., Landau, E. M., y Shichida, Y. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 5982-5987.
- Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., y Palczewski, K. G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65: 851-879.
- Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S., y Palczewski, K. Sequence analyses of G protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 2003; 42: 2759-2767.
- Blasie, J. K., y Worthington, C. R. Planar liquid-like arrangement of photopigment molecules in frog retinal receptor disk membranes. *J. Mol. Biol.* 1969; 39: 417-439.
- Cone, R. A. Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membranes. *Nat. New Biol.* 1972; 236: 39-43.
- Poo, M., y Cone, R. A. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* 1974; 247: 438-441.
- Chabre, M. X-ray diffraction studies of retinal rods structure of the disc membranes, effect of illumination. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 382: 322-335.
- Saibil, H., Chabre, M., y Worcester, D. Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes. *Nature* 1976; 262: 266-270.
- Roof, D. J., y Heuser, J. E. Surfaces of rod photoreceptor disk membranes: Integral membrane components. *J. Cell. Biol.* 1982; 95: 487-500.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., y Palczewski, K. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 2003; 421:127-128.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., y Palczewski, K. The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett.* 2004; 564: 281-288.
- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D. A., Palczewski, K., y Engel, A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 21655-21662.

24. Bubis, J., Ortiz, J. O., Möller, C., y Millan, E. J. Identification and characterization of transducin functional cysteines, lysines, and acidic residues by group-specific labeling and chemical cross-linking. En: Atassi, M. Z., y Appella, E., eds. *Methods in Protein Structure Analysis*. New York: Plenum Press; 1995. p. 227-250.
25. Bubis, J. Effect of detergents and lipids on transducin photoactivation by rhodopsin. *Biol. Res.* 1998; 31: 59-71.
26. Litman, B. J. Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography. *Meth. Enzymol.* 1982; 81: 150-153.
27. Wald, G., y Brown, P. The molar extinction of rhodopsin. *J. Gen. Physiol.* 1953; 37: 189-200.
28. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
29. Rabilloud, T., Carpentier, G., Tarroux, P. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 1988; 9: 288-291.
30. Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979; 76: 4350-4354.
31. Siegel, L. M., y Montly, K. J. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1966; 112: 346-362.
32. Uzcanga, G. L., Perrone, T., Noda, J. A., Perez-Pazos, J., Medina, R., Hoebeke, J., y Bubis, J. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochemistry* 2004; 43: 595-606.
33. Martin, R. G., y Ames, B. N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 1372-1379.
34. Jastrzebska, B., Maeda, T., Zhu, L., Fotiadis, D., Filipek, S., Engel, A., Stenkamp, R. E., y Palczewski, K. Functional characterization of rhodopsin monomers and dimers in detergents. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 54663-54675.
35. Hingorani, V. N., Tobias, D. T., Henderson, J. T., y Ho, Y.-K. Chemical cross-linking of bovine retinal transducin and cGMP phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 6916-6929.
36. Lee, J. H., y Hoover, T. R. Protein crosslinking studies suggest that *Rhizobium meliloti* C4-dicarboxylic acid transport protein D, a sigma 54-dependent transcriptional activator, interacts with sigma 54 and the beta subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92: 9702-9706.
37. Di Bernardo, S., y Yagui, T. Direct interaction between a membrane domain subunit and a connector subunit in the H(+)-translocating NADH-quinone oxidoreductase. *FEBS Lett.* 2001; 508: 385-388.
38. Rosevear, P., VanAken, T., Baxter, J., y Ferguson-Miller, S. Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 1980; 19: 4108-4115.
39. Medina, R., Perdomo, D., y Bubis, J. The hydrodynamic properties of dark- and light-activated states of n-dodecyl beta-D-maltoside-solubilized bovine rhodopsin support the dimeric structure of both conformations. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 39565-39573.
40. Seno, K., Kishimoto, M., Abe, M., Higuchi, Y., Mieda, M., Owada, Y., Yoshiyama, W., Liu, H., Hayashi, F. Light- and guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate-sensitive localization of a G protein and its effector on detergent-resistant membrane rafts in rod photoreceptor outer segments. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 20813-20813.
41. Nair, K. S., Balasubramanian, N., y Slepak, V. Z. Signal-dependent translocation of transducin, RG59-1-Gbeta5L complex, and arrestin to detergent-resistant membrane rafts in photoreceptors. *Curr. Biol.* 2002; 12: 421-425.
42. Chabre, M., Cone, R., y Saibil, H. Is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature* 2003; 426: 30-31.
43. Chabre, M., y le Maire, M. Monomeric G protein-coupled receptor as a functional unit. *Biochemistry* 2005; 44: 9395-9403.
44. Shichida, Y., Imai, H. Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998; 54: 1299-1315.
45. Farrens, D. L., Altenbach, Ch., Yang, K., Hubbell, W. L., y Khorana, G.. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*. 1996; 274: 768-770.
46. Sheik, S. P., Zvyaga, T. A., Lichtarge, O., Sakmar, T. P., y Bourne, H. R. Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* 1996; 383: 347-350.