

## BACTERIORRODOPSINA: UNA MOLÉCULA PECULIAR

MIGUEL A. REYES-MARTÍNEZ<sup>1</sup> Y AMPARO I. ZAVALETA<sup>1</sup>

### RESUMEN

La bacteriorrodopsina (bR) es una proteína que, al ser estimulada por la luz, funciona como una bomba de protones interviniendo en la síntesis de ATP mediante un proceso de fotofosforilación que convierte la energía lumínica en química (fotosíntesis). La bR codificada por el gen *bop*, es el constituyente de la membrana celular de las haloarqueas extremas, llega a ocupar hasta el 50% de ésta cuando hay concentraciones bajas de O<sub>2</sub>, demostrando la gran adaptación de estos microorganismos a condiciones anaeróbicas. Desde que fue propuesta la función fotorreceptora de la bR, numerosos estudios se han realizado con el fin de elucidar su secuencia aminoacídica, su conformación estructural, sus propiedades fisicoquímicas, las características de su expresión y regulación génica. Las excelentes propiedades fotoquímicas y termodinámicas de la bR la hacen una molécula peculiar y candidata para aplicaciones biotecnológicas en biocomputación como memorias ópticas, sistemas fotoeléctricos y en biomateriales, siendo de gran interés comercial las fuentes de aislamiento y producción. En esta revisión, se describe la génesis, función, expresión génica y aplicación biotecnológica de la bacteriorrodopsina.

*Palabras clave:* Bacteriorrodopsina, arqueas halófilas extremas, bomba de protones, gen *bop*.

### SUMMARY

The bacteriorhodopsin (bR) is a protein which plays a role as a proton pump when is stimulated by light. The bR is involved in ATP's synthesis through a process of transduction, turning light energy into chemical energy (photosynthesis). The bR codified by *bop* gene and located in the cell envelope, covers up to 50 % of the extreme haloarchaeas when the environment is anaerobic. This feature shows a maximum degree of adjustment to anaerobic conditions of halophilic microorganism. Since the bR function as photoreceptor was proposed, several studies have been done in order to elucidate its amino acid sequence, structural conformation, physicochemical properties and expression and gene regulation characteristics. The excellent bR's photochemical and thermodynamic properties make it a peculiar molecule and a candidate to biotechnological applications in biocomputation for example in optical memories, in photoelectric systems and in biomaterials. For that reason, bR's sources of isolation and production have received a great commercial interest. In this review, the bR genesis, main function, gene expression and biotechnological application of the bacteriorhodopsin is described.

*Key words:* Bacteriorhodopsin, extremely halophilic archaea, proton pump, *bop* gene.

### INTRODUCCIÓN

Los ambientes extremos como fuentes termales «gaysers», chimeneas volcánicas, solfataras (fuentes naturales de azufre hirviente), glaciares, aguas submarinas de elevadas presiones, fuentes geotérmicas de hierro candente, lagos y suelos hipersalinos son ambientes estresantes donde crecen microorganismos adaptados a condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad y bajas

concentraciones de oxígeno. Estos microorganismos son denominados extremófilos y poseen además gran diversidad metabólica que incluye fotótrofos oxigénicos y anoxigénicos, heterótrofos aerobios, fermentadores, desnitrificadores, sulfatos reductores y metanógenos. Las haloarqueas son un grupo de extremófilos, denominados halófilos por su peculiar adaptación a medios hipersalinos, son muy estudiados y han recibido gran atención en los últimos años debido al gran potencial biotecnológico de sus metabolitos secundarios, enzimas y moléculas fascinantes como la bacteriorrodopsina (bR) (1, 2).

En 1977 los organismos vivientes fueron clasificados en tres grandes dominios: *Eucaria*, *Eubacteria*

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

y *Archaea*, esta clasificación está basada en el análisis de las secuencias de los genes ribosómicos 16S y de otras moléculas indispensables para la supervivencia consideradas cronómetros evolutivos, siendo Carl Woese el pionero en estos estudios (1, 2). Los microorganismos del dominio *Archaea* predominan en los ambientes extremos, así las haloarqueas dominan los ambientes hipersalinos naturales o de origen antropogénico (1, 2, 3).

El dominio *Archaea* se divide en tres reinos: *Euriarqueota*, *Crenarqueota* y *Koriarqueota*. Las haloarqueas pertenecen al reino *Euriarqueota* y a la familia *Halobacteriaceae*. En la actualidad, existen 18 géneros reconocidos: *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* y *Natronorubrum*, la mayoría son aerobios estrictos o anaerobios facultativos (3).

Las haloarqueas son microorganismos que crecen óptimamente entre 3,4 - 5,1 M (20 - 30%) de NaCl. Estos acumulan KCl en concentraciones molares como un mecanismo osmoadaptativo para contrarrestar la elevada salinidad del medio y evitar la plasmolisis (4, 5). Frente a estas condiciones estresantes las haloarqueas han adaptado también su proteosoma para mantener una correcta conformación estructural, evitando la desnaturalización, agregación y precipitación de las proteínas. Generalmente los aminoácidos de las proteínas de membrana son de naturaleza electronegativa facilitando una correcta solvatación con su medio explicándose así la estabilidad de membrana en medios hipersalinos (6).

*Halobacterium salinarum* es una de las haloarqueas más representativas y mejor estudiadas, es quimioorganotrofo y fotótrofo facultativo, presenta una maquinaria metabólica que le permite producir ATP mediante fosforilación oxidativa y fosforilación a nivel de sustrato. Considerando el paradigma de la estructura mitocondrial podría esperarse una agrupación de proteínas (complejos proteicos) parecida a la cadena transportadora de electrones conectadas por transportadores móviles (ubiquinonas) en la membrana celular, pero en contraposición, los complejos proteicos de *H. salinarum* pueden estar fusionados formando supercomplejos y presentar composiciones inusuales como una forma de adaptación al medio

hipersalino, además muestra diferencias metabólicas como por ejemplo cuando la arginina es convertida a glutamato vía arginina desaminasa y luego entra al ciclo del ácido cítrico (7, 8, 9).

Algunas haloarqueas han desarrollado un mecanismo fotosintético que les permite enfrentar las bajas concentraciones de oxígeno que son capaces de retener estos ambientes hipersalinos, que tiene por consecuencia la drástica disminución de la fosforilación oxidativa y producción de ATP, por lo tanto este mecanismo fotosintético evita la muerte celular por falta de energía (10). Este mecanismo fotosintético produce ATP de una forma similar al realizado en la cadena transportadora, pero a diferencia de ésta los protones expulsados no provienen de los complejos proteicos sino de una bomba de protones fotoexcitable. En este mecanismo adaptativo participa la bacteriorrodopsina (bR), una de las primeras proteínas estudiadas por métodos de alta especificidad y sensibilidad como: Infrarrojo, Raman y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido. En base a los estudios de la bR se han diseñado y elaborado instrumentos sofisticados para detectar cambios conformacionales de las proteínas en tiempo real a longitudes de onda visible con resoluciones que alcanzan los femtosegundos (billonésima parte de un milisegundo). La bR ha recibido la denominación de «Molécula Modelo» debido a las más de 5 000 publicaciones descritas durante más de 30 años de investigación, las que han facilitado la comprensión del mecanismo de transporte de esta proteína integral de membrana (11).

## ESTRUCTURA

En un inicio, la bR fue conocida como el constituyente mayoritario del lisado de la membrana celular de *Halobacterium salinarum*, a esta fracción de color púrpura se le denominó membrana púrpura (MP); estudios posteriores utilizando microscopía electrónica evidenciaron un arreglo organizado, casi geométrico, que le confería peculiares características (12, 13).

Estudios por medio de Cristalografía Electrónica de Alta Resolución y Difracción de Rayos X mostraron la formación de entramados hexagonales bidimensionales cristalinos que abarcaban casi toda la superficie de la membrana celular, estos datos facilitaron posteriores análisis de su estructura (14). Un mapa de la densidad electrónica dispersa a baja resolución (LR-MESD, Low Resolution

Map Electrón Scattered Density) de la MP reveló agrupaciones de siete picos perpendiculares a la superficie de la membrana (15), que correspondían a siete hélices transmembrana, esta estructura permitió deducir la naturaleza proteica del principal componente de la MP. Esta proteína presenta en su interior una molécula de retinal responsable de su función como bomba de protones, similar a la rodopsina de los mamíferos (16). Por estas características se le denominó bacteriorrodopsina, en referencia a su origen bacteriano (hasta entonces no se hablaba del dominio *Archaea*).

La bR pudo ser separada de los constituyentes lipídicos de la membrana mediante técnicas de permeabilidad en gel y HPLC en fase reversa. La secuenciación de la proteína se basó en la combinación de métodos automatizados de Degradación de Edman y Espectrometría de Masas (17). La secuencia aminoacídica permitió conocer mejor la estructura de la bR y elaborar modelos tridimensionales sofisticados.

La bR es una proteína de 26 kDa, formada por 248 aminoácidos que forman una cadena polipeptídica con siete  $\alpha$ -hélices transmembrana denominadas: A, B, C, D, E, F y G (Fig. 1). La fracción proteica se conoce como bacterio-opsina (bO), cuando ésta se enlaza a una molécula de retinal recibe el nombre de bacterio-rodopsina (bR). Los estudios de comparación de la secuencia de aminoácidos de la bR con sus homólogos funcionales, análisis de mutantes y estudios de digestión proteolítica demostraron que los aminoácidos que interconectan las hélices son cortos y que los extremos amino (N) y carboxilo (C) están dirigidos hacia el espacio extracelular e intracelular respectivamente (19, 20, 21, 22). A diferencia de otras proteínas transmembrana la bR se inserta totalmente en la porción hidrófoba de la membrana tanto así que sus lazos sobresalen escasamente hacia la superficie (23). Las siete  $\alpha$ -hélices forman un poro por el cual se desplaza el protón en cuyo centro una molécula de retinal aldimina se enlaza al grupo  $\epsilon$ -amino de Lys-216 de la hélice G formando una base de Schiff (24, 25), es aquí donde se realiza el fenómeno fotoquímico.

La región extracelular posee residuos cargados como Asp-212, Arg-82, Glu-204, Glu-194 y polares como Tyr-57, Tyr-185, todos ellos cumplen roles específicos siendo Asp-85, el primer aceptor del protón expulsado (26). La superficie intracelular en cambio tiene residuos hidrofóbicos a excepción de Asp-96 que toma un protón del citoplasma para luego cederlo al retinal desprotonado.

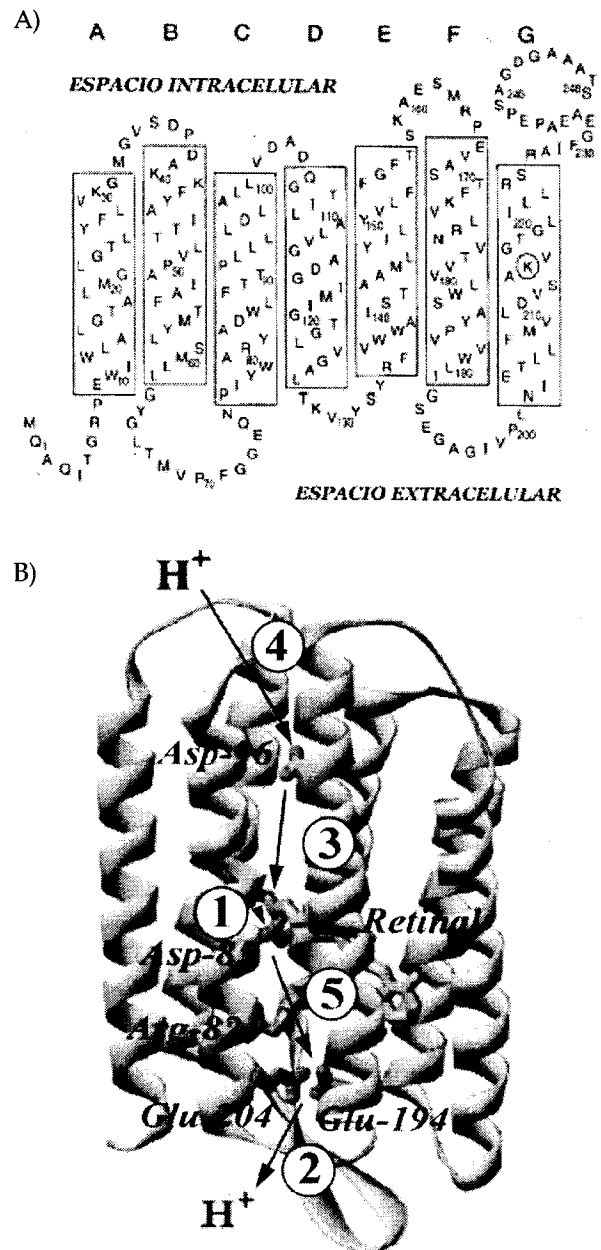


Figura 1. Esquema estructural de la bacteriorrodopsina. A, Estructura secundaria (18); B, Modelo en cintas (33). Las letras indican los 248 aminoácidos que forman las siete  $\alpha$ -hélice y en un círculo se presenta a Lys-216 donde se enlaza el retinal. Las flechas y números en la Fig. B indican la trayectoria del protón desde el espacio extracelular al intracelular y el orden del fotociclo respectivamente.

La MP está constituida por un conjunto de bR y lípidos, la bR se agrupa en trímeros conformando un entramado hexagonal; por cada molécula de bR hay de seis a siete fosfolípidos, de dos a tres sulfoglicolípidos y un escualeno; los sulfoglicolípidos y el escualeno son lípidos sulfonados y se encuentran exclusivamente en la MP de las haloarqueas. Estos lípidos rodean y se inter-

ponen en las cavidades de cada trímero de bR formando un complejo lipoproteico que estabiliza y favorece el perfecto ensamblado y conformación hexagonal de los trímeros en toda la membrana; las interacciones hélice-hélice, lazo-hélices, lazo-lazo, intertrímeros e interacciones específicas con los lípidos determinan la estabilidad. El ensamblado de la bR desde el citoplasma a la MP se realiza de preferencia periméricamente, en la fase temprana de inducción las agrupaciones de MP pueden alcanzar diámetros de 0,5  $\mu\text{m}$  conteniendo 6 000 trímeros o 18 000 monómeros, en fases tardías los parches de MP se fusionan y ocupan hasta el 50% de la superficie celular (27, 28).

### FOTOCICLO Y MECANISMO DE CATÁLISIS VECTORIAL

La unión de una molécula de retinal al residuo Lys-216 de bR (24, 25) permite que la bR funcione como bomba de protones. Desde que se postuló que la bR funciona como un fotorreceptor (29), numerosos estudios fueron dirigidos a elucidar los mecanismos por los cuales un simple fotón de luz excita a la bR y le hace expulsar un protón para generar un gradiente que luego es aprovechado en la síntesis de ATP por medio de una ATPasa. Las mediciones en tiempo real, de los cambios de absorción del cromóforo retinal de la bR después de ser excitado por un pulso láser la señalaban como responsable de la fotorrecepción; asimismo, la bR presentaba cambios de conformación consecutivos y específicos para cada longitud de onda del espectro visible (30).

Cuando el C15 del retinal se une al grupo  $\epsilon$ -amino de Lys 216 forman una base de Schiff, este tiene absorciones características, el cambio conformacional de (13-cis)  $\rightarrow$  (13-trans)  $\rightarrow$  (13-cis) por acción de un fotón de luz le hace expulsar un protón, a estos cambios se les denomina fotociclo y han sido descritos en diferentes publicaciones (26, 31, 32, 33, 34). El modelo original del fotociclo descrito por Lozier y col. (35) es el más aceptado y es el siguiente:



Cada letra representa un estado conformacional diferente con su absorción característica. El núcleo proteico donde se aloja el retinal es un «bolsillo perfecto», ya que los residuos aromáticos (36) y los lípidos que constituyen la MP (37, 38), así como las moléculas de agua específicas que funcionan como grupos polares móviles y el transporte de los protones de un residuo a otro (39) estabilizan los estados intermedios y son claves para el fotociclo.

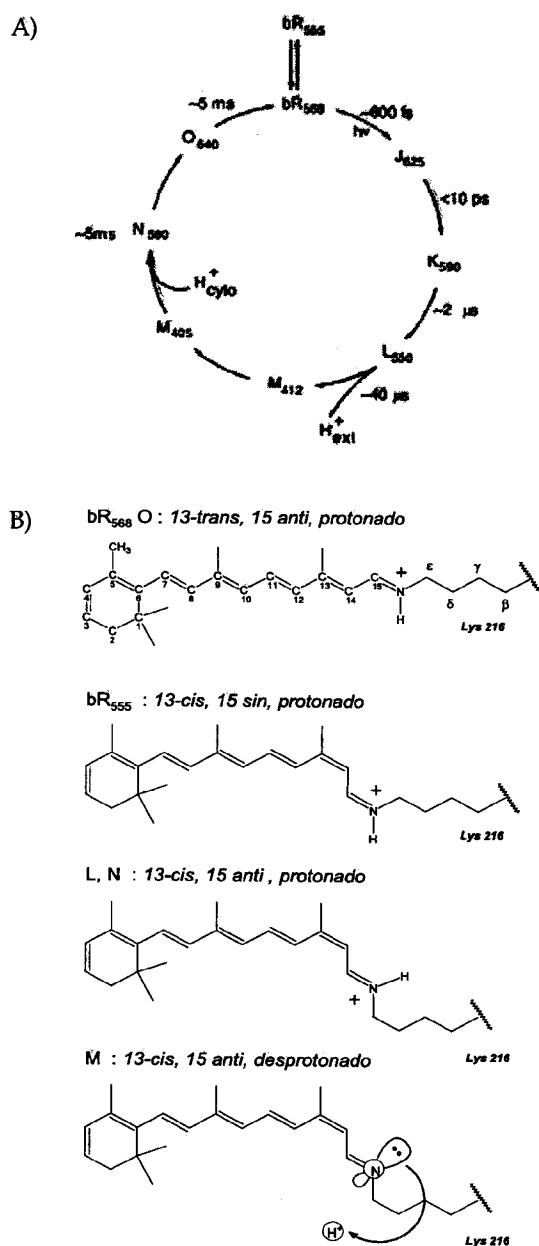


Figura 2. Esquema del fotociclo de la bacteriorrodopsina. A, Se indican los estados de absorción de  $h\nu$  en nm como subíndices así como el lapso entre ciclos. B, Cambios conformacionales del retinal en cada intermedio del fotociclo (31).

La molécula de retinal es considerada un pigmento, posee enlaces  $\pi$  conjugados, por esto se explica la coloración púrpura de las bR, ya que en su estado relajado antes de iniciar el fotociclo absorbe  $h\nu$  a 568 nm (31), esto corresponde al verde, y refleja los demás colores que en conjunto hacen percibir el color púrpura (40). Las bases de Schiff usualmente absorben  $h\nu$  a 460 nm (azul) por lo que reflejan el color amarillo-naranja, pero las bR absorben  $h\nu$  a 568 nm, este fenómeno es conocido como

«opsin shift» y se explica por el desplazamiento batocrómico que ejerce las interacciones de proteína ligada haciéndole absorber a mayor longitud de onda (41).

De forma abreviada el fotociclo comprende (Fig. 2):

- Reacción primaria. La fotoisomerización del retinal todo trans a 13-cis. BR J600  $\rightarrow$  K590 es un proceso estereoselectivo. Un fotón de 568 nm (luz verde) impacta en el retinal en aproximadamente 600 fseg, el retinal todo trans se isomeriza a 13-cis pasa a un intermediario J600 para luego llegar a K590, todo esto ocurre en menos de 10 pseg.
- Intermedio K590  $\rightarrow$  L550 se realiza en aproximadamente 2  $\mu$ seg, hay una interacción entre Asp-85 extracelular y el retinal mediada por puentes de hidrogeno, también participan moléculas de agua que refuerzan esa interacción.
- Primera translocación del protón. Intermedio L550  $\rightarrow$  M412, el retinal cede su protón a Asp-85 extracelular, el cual lo expulsa al final del ciclo, sucede en aproximadamente 40  $\mu$ seg.
- Cambio M412-Extracelular  $\rightarrow$  M412-Intracelular, simplemente es un cambio de dirección del ciclo, la bR presenta coloración amarilla.
- Segunda translocación de protón. M412  $\rightarrow$  N560, el Asp-96 intracelular cede su protón al retinal reprotonándolo y lo recupera en este mismo intermedio, tiene una duración de aproximadamente 5 mseg.
- Termoisomerización del retinal 13-cis a todo trans. N560  $\rightarrow$  O640, los Asp-85 y Asp-96 están protonados.
- O640  $\rightarrow$  BR. La desprotonación de Asp-85 completa el ciclo y la bR vuelve a su estado inicial. Esto sucede en aproximadamente 5 mseg.

Es así que la bR expulsa un protón, denominándose a este proceso catálisis vectorial (Fig. 3). Si bien es cierto que los intermedios del fotociclo están definidos, el trayecto individual del protón aún es tema de investigación.

En el año 2002, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), en un sistema análogo a la nomenclatura de las enzimas,

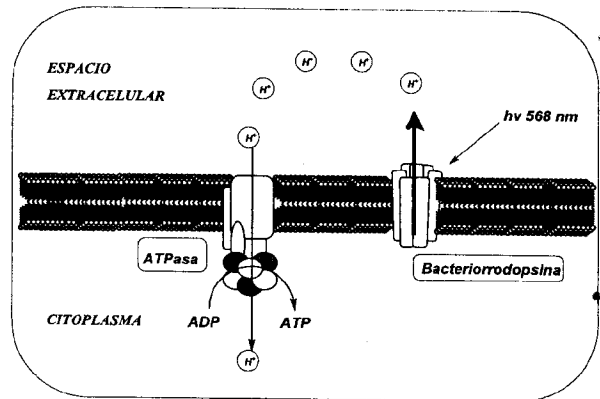


Figura 3. Esquema del mecanismo de bombeo de protones por la bR y síntesis de ATP. Luz con  $\lambda=568$  nm incide en la bR e inicia la expulsión de protones al medio extracelular, éstos regresan al citoplasma por medio de una ATPasa.

clasifica a todas las proteínas de transporte, siendo la bR considerada como 3.E.1 (transporte activo primario - bombas dependientes de luz - bacteriorrodopsina)

#### EXPRESIÓN GÉNICA DE LA BACTERIORRODOPSINA

Una vez identificada la bR en *Halobacterium salinarum* como la única proteína constitutiva de la MP no se hicieron esperar los estudios que develaran los procesos de expresión y regulación génica en otras arqueas halófilas extremas, así como las señales ambientales que inducen la expresión de la bacteriorrodopsina, esta molécula motivó a los científicos a plantearse una serie de preguntas como: ¿La deficiencia de nutrientes u  $O_2$  inducen la expresión génica?, ¿Qué otras halófilas extremas poseen el gen?, ¿La bR se relaciona filogenéticamente con otras macromoléculas?, ¿Es su secuencia aminoacídica o función conservada?, ¿Es patrimonio absoluto de las haloarqueas?

En 1981, se purificó parcialmente el ARNm de la bR de *Halobacterium salinarum*, luego se sintetizó ADN complementario con la transcriptasa inversa y se secuenció el extremo 5'. Se obtuvo una secuencia de 80 nucleótidos que permitió deducir que la bR contiene un péptido señal de 13 aminoácidos (42, 43).

En 1984, se descubrió que el gen *bop* es alterado por secuencias de inserción (IS), que normalmente afectan los genomas de bacterias y eucariotas (44, 45). Posteriormente se identificó un gen constitutivo denominado *brp* (bacterio-opsin related protein)

que afecta la expresión del gen *bop*, este nuevo gen presenta mucha similitud con el gen *bop*, codifica una proteína de 359 aminoácidos, además la predicción de su estructura secundaria indica la presencia de seis hélices hidrofóbicas que fácilmente podrían anclarse en la membrana, su función en ese entonces no estaba muy clara y se pensaba que podría tener función reguladora (46).

En 1988, se identificó un segundo gen involucrado en la expresión de bacterio-opsina (bO) se le denominó *bat* (bacterio-opsin-activator-gene) (47), al analizar las secuencias de mutantes Bop<sup>-</sup> que presentaban alteraciones en las posiciones -2 000 a -3 000 pb del gen *bop*, se localizó un marco de lectura abierta de 2 022 pb muy cerca del gen *brp* y que se transcribe en dirección opuesta al gen *bop*. El gen *bat* codifica una proteína de 647 aminoácidos de naturaleza hidrosoluble y con aminoácidos ácidos. Estudios de deleciones e inserciones en secuencias de *brp*, *bat* y *bop* indican que *bat* está involucrado en la expresión de *brp* y *bop*, cuya función sería estabilizar la transcripción de estos genes. Anteriormente, a *brp* se le atribuía una función reguladora o mediadora en el ensamblado de bR en la MP, pero el descubrimiento de la participación de *bat* en la regulación anuló esa hipótesis. El grupo de genes *bop*, *brp* y *bat* presentan una transcripción compleja y por ende, su regulación también lo es (Fig. 4) (48), del mismo modo, la síntesis de MP requiere de una coordinación precisa entre la expresión del gen *bop* y la biosíntesis de retinal (50, 51) participando la luz y el oxígeno como factores ambientales (29).

En 1999, Baliga y DasSarma., realizaron estudios sobre la superhelicidad de las regiones promotoras, atribuyéndole una cualidad *sine qua non* para la expresión del gen *bop*. Estudios posteriores de mutagenesis de las secuencias pribnow (caja TATA) y UAS (upstream activator sequence) demos-

traron que la modificación de esta secuencia altera la expresión del gen *bop* (52). Cabe señalar que la bR se expresa cuando el medio es altamente hipóxico más no estrictamente anaeróbico, ya que la biosíntesis de retinal requiere trazas de oxígeno (7). Los genes *bop* y *gvpA* (gas vesicles protein) de *H. salinarum* (53) que se expresan en medios con baja tensión de oxígeno y alta radiación, son un buen modelo para la realización de estudios de regulación de la expresión génica. Similares casos se presentan en *Klebsiella pneumoniae* y *Rhodospseudomonas capsulata* cuyos genes sensores de O<sub>2</sub> denominados *nifL* (nitrogen fixing), son inhibidos por altas concentraciones de O<sub>2</sub> e inhibidores de la ADN girasa (54), enzima necesaria para el superenrollamiento de las regiones promotoras. Además se demostró que la novobiocina, un inhibidor de la ADN girasa, disminuye los niveles de ARNm del gen *bop* y por ende de *gvpA*, en consecuencia el efecto inhibitorio de la novobiocina se ejerce sobre las zonas promotoras de los genes *bat* y *brp*. Al comparar las secuencias de *bat*, *brp* y *bop* con *nifL* se observó una gran similitud entre *bat* y *nifL*, postulándose que el gen *bat* podría ser un sensor de oxígeno (55).

Las bacteriorruberrinas son un grupo de cuatro a seis isoprenoides hidroxilados de 50 carbonos que le confieren el color rojo-anaranjado característico de *Halobacterium sp.* Las bacteriorruberrinas están relacionadas con la biosíntesis del retinal (caroteno = dos moléculas de retinal) además, se propuso una regulación en conjunto con los genes que participan en la síntesis de bR, para demostrar esta hipótesis se utilizaron cepas nativas y mutantes de esta especie y se encontró que la exposición a luz intensa induce altas concentraciones de ARNm de *brp* y mitiga el efecto inhibidor del O<sub>2</sub>; y una baja tensión de O<sub>2</sub> estimula la síntesis de ARNm de *bat*. Todos estos datos sugieren que *bat* codifica una proteína que puede ser un activador o un intermediario en la expresión del gen *bop* a bajos niveles de O<sub>2</sub> (56). Un nuevo gen fue identificado cerca de *bat*, se le denominó gen *blp* (bacterio-opsin linked product) éste es pequeño en comparación a los otros, se transcribe en la misma dirección que *bop* y no se le atribuyó función alguna (57). Los genes involucrados en la síntesis de las proteínas de las vacuolas de gas, retinal, y bacteriorruberrinas son regulados por una baja tensión de O<sub>2</sub> y altas intensidades de luz. Estos genes y el gen *bop* pueden formar una familia multigénica denominada *modulón* o *estimulón*, los cuales son activados por parámetros ambientales comunes (58).

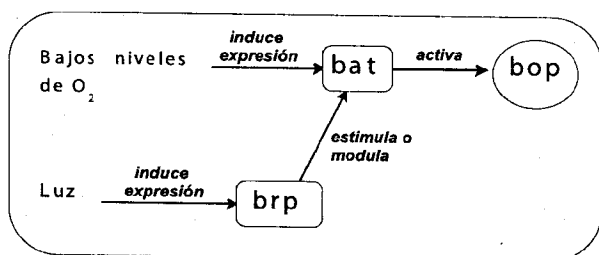
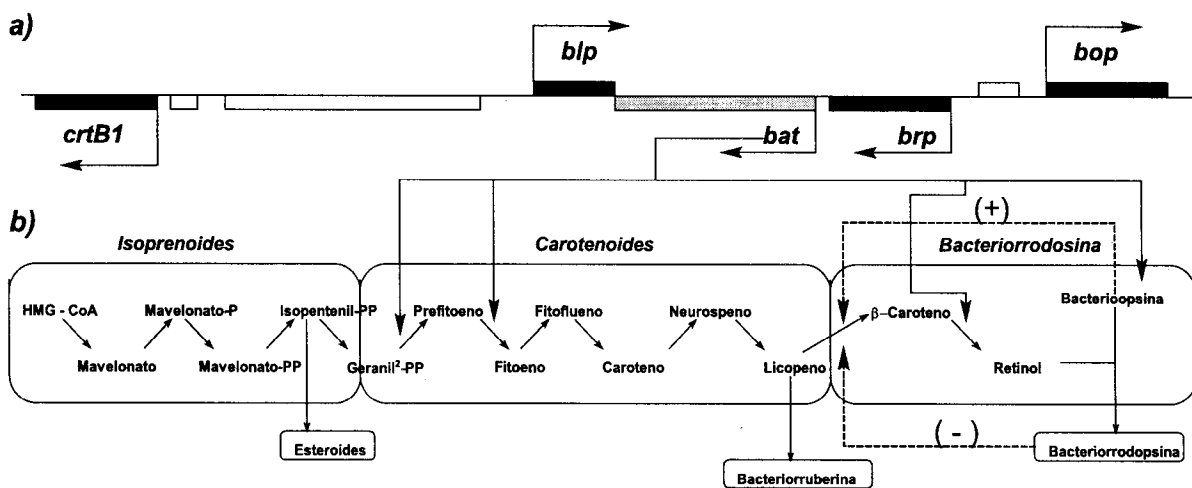


Figura 4. Primer esquema de regulación del gen *bop* postulado por Shand y Betlach (49).



**Figura 5. Regulón bR.** A, Organización de los genes que participan en la síntesis de bR, las flechas indican la dirección de la transcripción, los genes en negro son regulados por *bat*. B, Los tres biomódulos de la síntesis de carotenoides, *bat* regula transcripcionalmente los pasos enzimáticos señalados con flechas, las líneas punteadas indican control positivo o negativo de la enzima que cataliza el paso de licopeno a  $\beta$ -caroteno (61).

La secuenciación del genoma de *Halobacterium sp.* (59) permitió entender muchas funciones metabólicas, determinar la presencia de transportadores, sistemas de replicación, transcripción y transducción e identificar genes que codifican enzimas únicas a partir de la comparación de secuencias homólogas con otros organismos. Los análisis de secuencias llevaron por un lado a confusiones, por ejemplo se encontraron genes que codifican enzimas de rutas metabólicas inexistentes; y por el otro, permitió descubrir el gen *blh* en *Halobacterium sp.* NRC-1 un parólogo del gen *brp*, y entender mejor su participación en la síntesis de retinal.

Por técnicas de *knockout* se demostró que el gen *blh* es esencial para la síntesis de bR pero no de bO, además al no haber retinal se incrementa el  $\beta$ -caroteno. Los genes *brp* y *blh* no participan en la regulación del gen *bop* ya que su delección solo afecta la síntesis de retinal, si se añade retinal de una fuente exógena se restaura los niveles de bR. Todos estos datos sugerían que los genes *brp* y *blh* codifican proteínas que forman parte de una nueva ruta biosintética de retinal, única en haloarqueas. Se postula que pueden ser enzimas claves en la síntesis y unión del retinal a bO, e incluso enzimas multifuncionales (60). Además, se encontró que el gen *crtB1* relacionado con la síntesis de caroteno, también es regulado transcripcionalmente por el gen *bat*.

Las herramientas bioinformáticas ayudaron a esclarecer la interrelación del grupo de genes que

participan en la síntesis y regulación de bR ahora denominados regulón bR (Fig. 5) (61). El análisis de las secuencias UAS homólogas al gen *bop* y factores de transcripción en los tres dominios establecidos por Woese presentaron similitudes con las secuencias de aminoácidos de proteínas de origen vegetal, atribuyéndole un origen ancestral común, además se han encontrado homólogos de la bR en hongos y en una  $\gamma$ -proteobacteria (62). Para definir la función de los genes del regulón bR se hizo un análisis de las UAS de *Halobacterium sp.* y se encontró que el gen *crtB1* es un homólogo de fitoeno sintetasa clave en la síntesis de carotenoides, el gen *brp* cataliza el paso final del clivaje oxidativo de  $\beta$ -carotenos y que el gen *blp* presenta similitud a una proteína asociada a la biosíntesis de bacterioclorofilas/porfirinas y carotenoides. Usando el algoritmo PFAM se identificó en las secuencias del gen *bat* dominios aminoácidos GAF relacionados con sensores de luz, PAC/PAS sensores redox y ligandos HTM DNA. Los dominios GAF se encuentran en bacterias y eucariotas, son conservados en fitocromos y fosfodiesterasas GMPC específicos. Al estar GAF y PAC/PAS asociados con ligandos HTM DNA, clasifican a Bat como proteína transductora citoplasmática sensible a cambios de luz y potencial redox. Secuencias UAS parecidas a los del gen *bop* muestran gran similitud con el gen *pds* de tomate el cual está asociado a genes que participan en la síntesis de carotenoides frente al estrés oxidativo (63). El estudio global de la regulación de los sistemas transductores de energía en haloarqueas por medio de herramientas bioinformáticas permite deducir la regulación e

interrelación de varias rutas bioquímicas relacionadas con el fototrofismo, la síntesis de isoprenoides, carotenoides y ensamblaje de bR (61).

### POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

La excelente estabilidad termodinámica y fotoeléctrica de la bR la han hecho susceptible de aplicaciones tecnológicas que aprovechan sus propiedades fotoeléctricas, fotoquímicas y protoncinéticas (64) entre las que se destacan:

- La propiedad fotocromática y de conversión de luz en energía puede explotarse para el diseño de moduladores de luz y en monitores de alta resolución. A diferencia de los monitores convencionales de 4 líneas/mm, los monitores con bR ofrecen 100 líneas/mm necesarios por ejemplo en telecirugía (65).
- En microelectrónica se está estudiando a la bacteriorrodopsina como elemento matriz funcional en una nueva tecnología microestructural no tóxica para sustancias a base de silicio o para circuitos integrados. Con estos avances se está llegando a la biocomputación y a la era de los computadores orgánicos ¿Podrá el biochip reemplazar a los chips de silicio?
- La elaboración de discos de almacenamiento de datos de alta capacidad que permite almacenar más de 10 000 gigabytes, además éstos son flexibles, reciclables y no tóxicos.
- La construcción de celdas fotovoltaicas. Al ser iluminada la bR, ésta transporta carga eléctrica en una dirección y produce energía electrostática. Este mecanismo tiene distintas aplicaciones técnicas y potenciales en el campo de la tecnología fotovoltaica, se espera que en unos 10 años se puedan construir celdas fotovoltaicas basadas en el centro activo de la reacción fotosintética, aunque los prototipos iniciales se prevén mucho antes.
- Sistemas convertidores de energía luminosa en química. En presencia del detergente octiltioglucoosido las bR forman espontáneamente vesículas de 17,9 a 19,0 nm de diámetro, las cuales pueden ser utilizadas como convertidores de energía luminosa en química, considerando que la producción de ATP es de gran utilidad en procesos biotecnológicos que demanden alta energía.
- Generación de señales eléctricas en los convertidores fotoeléctricos de imágenes, sensores de movimiento y retinas artificiales.

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta revisión se presenta los avances científicos de la bacteriorrodopsina, molécula muy peculiar, que ha facilitado el diseño de diferentes técnicas para el estudio de numerosas proteínas así como la elucidación de su estructura, regulación, mecanismos de acción y su aplicación biotecnológica potencial en la elaboración de biochips, retinas artificiales, fotoceldas, etc.

La versatilidad de las propiedades físicas y químicas de la bR favorecen sus múltiples aplicaciones en el campo de la biocomputación y bioelectrónica, siendo de gran interés comercial la obtención de bR de fuentes naturales para ofertarlo como materia prima a gran escala. El aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos extremos productores de bR de salares y salinas solares del Perú permitirán contar con recursos nativos con un incalculable valor industrial.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5088-5090.
2. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1977; 51:221-271
3. Dyll-Smith M. The halohandbook. Protocols for halobacterial genetics. Haloarchaeal Genetics Laboratory. 2003; University of Melbourne. Australia.
4. DasSarma S, Arora P. Halophiles. *Encyclopedia of life sciences* 2001. Nature Publishing 2001; Group. 1-9
5. Gonzáles JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Rev Lat Microb* 2002; 44:137-156
6. Kennedy S, Ng W, Salzberg S, Hood L, DasSarma S. Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Research* 2001; 11:1641-1650
7. Hartmann R, Sickinger H, Oesterhelt D. Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:3821-3825
8. Schafer G, Engelhard M, Muller V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:570-620



9. Skulachev VP. Bioenergetics of extreme halophiles. In M. Kates D, Kushner J, Matheson A.T.(ed.) The biochemistry of archaea. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands 1993; p.25-39
10. Danon A, Stockenius W. NASA Symp. Extreme Enviroments. Mechanism of microbial adaptation, Ames Res Ctr Moffett Field, Calif., June 1972; p. 25
11. Lanyi JK. Bacteriorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1466:1-3
12. Stoeckenius W, Rowen R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J Cell Biol* 1967; 34:365-393
13. Stoeckenius W, Kunau W. Further characterization of particulate fraction from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *J Cell Biol* 1968; 38:337-357
14. Blaurock AE, Stoeckenius W. Structure of the purple membrane. *Nat New Biol* 1971; 233:152-155
15. Henderson R, Unwin PN. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 1975; 257:28-32
16. Krzysztow B. Visual and archaeal rhodopsins: similarities, differences and controversy. *Cell Mol Biol Lett* 2003; 8:285-296
17. Khorana HG, Gerber GE, Herlihy WC, Gray CP, Anderegg RJ, Nihei K, Biemann K. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:5046-5050
18. Thomas M. Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments. *J Biol Chem* 1998; 273:9312-9322
19. Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 1990; 213:899-929
20. Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* 1996; 259:393-421
21. Kimura Y, Vassilyev DG, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, Murata K, Hirai T, Fujiyoshi Y. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* 1997; 389:206-211
22. Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailler JP, Lanyi JK. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J Cell Biol* 1999; 291:899-911
23. Heymann J, Muller D, Landau E, Rosenbush J, Pevay-Peyroula E, Buldt G, Engel A. Charting the surfaces of the purple membrane. *J Struct Biol* 1999; 128:243-249
24. Bayley H, Huang KS, Radhakrishnan R, Ross AH, Takagaki Y and Khorana HG. Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2225-2229
25. Lemke HD, Oesterhelt D. Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 1981; 128:255-260
26. Luecke H, Richter HT, Lanyi JK. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 Å resolution. *Science* 1998; 280:1934-1937
27. Krebs M, Isenbarger T. Structural determinants of purple assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1460:15-26
28. Oesterhelt F, Oesterhelt D, Pfeiffer M, Engel A, Gaub HE, Müller DJ. Purple membranes of *H. salinarum* typical high-resolution AFM topograph of the cytoplasmic surface of a wild-type purple membrana. *Science* 2000; 288:143-146
29. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:2853-2857
30. Kumar HK, Gowda A. Absorption characteristics of bacteriorhodopsin molecules. *PRAMANA—J Phys* 2000; 54:447-452
31. Hatcher M, Hu JG, Belenky M, Verdegem P, Lugtenburg J, Griffin RG, Herzfeld J. Control of the pump cycle in bacteriorhodopsin: mechanisms elucidated by solid-state NMR of the D85N mutant. *Biophys J* 2002; 82: 1017-1029

32. Edman K, Nollert P, Royant A, Belrhali H, Pebay-Peyroula E, Hajdu J, Neutze R, Landau E. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature* 1999; 401:822-826
33. Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailler JP, Lanyi JK. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution. *Science* 1999; 286:255-260
34. Brown LS. Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific and protein sequence variability. *Biochemistry (Moscow)* 2001; 66:1249-1255
35. Lozier RH, Bogomolni RA, Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys J* 1975; 15:955-962
36. Tajkhorshid E, Suhai S. The effect of the protein environment on the structure and charge distribution of the retinal schiff base in bacteriorhodopsin. *Theor Chem Acc* 1999; 101:180-185
37. Hendler RW, Dracheva S. Importance of lipids for bacteriorhodopsin structure, photocycle and function. *Biochemistry (Moscow)* 2001; 66:1311-1314
38. Szundi I, Stoeckenius W. Effect of lipid surface charges on the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3681-3688
39. Maeda A. Internal water molecules as mobile polar groups for light-induced proton translocation in bacteriorhodopsin and rhodopsin as studied by difference FTIR spectroscopy. *Biochemistry (Moscow)* 2001; 66: 1256-1268
40. Bender GT. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Ed. Acribia-Zaragoza 1992; p.37
41. Hu J, Griffin RG, Herzfeld J. Synergy in the spectral tuning of retinal pigments: complete accounting of the opsin shift in bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8880-8884
42. Chang H, Majumdar A, Dunn R, Makabe O, RajBhandary UL, Khorana HG, Ohtsuka E, Tanaka T, Taniyama YO, Ikehara M. Bacteriorhodopsin: partial sequence of mRNA provides amino acid sequence in the precursor region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3398-3402
43. Dunn R, McCoy J, Simsek M, Majumdar A, Chang H, RajBhandary UL, Khorana HG. The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:6744-6748
44. Pfeifer F, Friedman J, Boyer HW, Betlach M. Characterization of insertion affecting the expression of the bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:2489-2497
45. Simsek M, DasSarma S, RajBhandary UL, Khorana HG. A transposable element from *Halobacterium halobium* which inactivates the bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7268-7272
46. Betlach M, Friedman J, Boyer HW, Pfeifer F. Characterization of halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:7949-7959
47. Leong D, Pfeifer F, Boyer HW, Betlach M. Characterization of a second gene involved in bacterio-opsin gene expression in a halophilic archaeobacterium. *J Bacteriol* 1988; 170:4903-4909
48. Leong D, Boyer HW, Betlach M. Transcription of gene involved in bacterio-opsin gene expression in mutants of a halophilic archaeobacterium. *J Bacteriol* 1988; 170:4910-4915
49. Shand R, Betlach M. Expression of the genecluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J Bacteriol* 1991; 173:4692-4699
50. Sumper M, Herrmann G. Biogenesis of purple membrane: regulation of bacterio-opsin synthesis. *FEBS Lett* 1976; 69:149-152
51. Sumper M, Herrmann G. Biosynthesis of purple membrane: control of retinal synthesis by bacterio-opsin. *FEBS Lett* 1976; 71:333-336
52. Baliga N, DasSarma S. Saturation mutagenesis of the TATA box and upstream activator sequence in the haloarchaeal bop gene promoter. *J Bacteriol* 1999; 181:2513-2518
53. Krantz MJ, Ballou CE. Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J Bacteriol* 1973; 114:1058-1067

54. Dixon M, Henderson NC, Austin S. DNA supercoiling and aerobic regulation of transcription from the *Klebsiella pneumoniae* *nifL* promoter. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:9933-9946
55. Chin-Fen Y, DasSarma S. Transcriptional induction of purple membrane and vesicle synthesis in the archaeobacterium *Halobacterium halobium* is blocked by a DNA gyrase inhibitor. *J Bacteriol* 1990; 172:4118-121
56. Gropp F, Betlach M. The *bat* gene of *Halobacterium halobium* encodes a trans-acting oxygen inducibility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 91:5475-5479
57. Gropp F, Betlach M. A fourth gene in the *bop* gene cluster is co-regulated with the *bop* gene. *Syst Appl Microbiol* 1994; 16:716-724
58. Neidhart F, Ingraham J, Schaech M. *Physiology of the bacterial cell*. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass. 1990; p. 382-383
59. Wailap VN, Kennedy SP, Mahairasa GG, Berquist B, Pana M, Shuklac HD. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12176-12181
60. Peck R, Echavarri C, Johnson E, Wailap VN, Kennedy S, Hood L, DasSarma S, Krebs M. *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem* 2001; 276:5739-5744
61. Baliga N, Pana M, Goo Y, Eugene C, Goodlett D, Dimitrov K. Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp. analyzed by a global system approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14913-14918
62. Beja O, Aravind L, Eugene V, Suzuki M, Hadd A. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 2000; 289:1902-1906
63. Baliga N, Kennedy S, Ng-Wailap V, Hood L, DasSarma S. Genomic and genetics dissection of an archaeal regulon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 98:2521-2525
64. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001; 5: 73-83