

DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE TRANSPORTADORES BACTERIANOS*

Rafael Jiménez y Carlos Cervantes¹

RESUMEN

Los transportadores de membrana son proteínas que desempeñan papeles esenciales para el adecuado funcionamiento de todos los organismos vivos. En las bacterias, la captación de nutrientes y la expulsión de sustancias nocivas se encuentran entre sus funciones principales. La estructura de los transportadores está dada en gran parte por sus interacciones con la membrana celular, por lo que el análisis topológico, esto es, la determinación del número y la orientación de los segmentos transmembranales (STM) con respecto a la bicapa lipídica, es fundamental para comprender su función. La información sobre la topología membranaral puede usarse para la identificación de residuos esenciales o para conocer el origen evolutivo de los transportadores. Se ha diseñado una variedad de métodos bioquímicos para el estudio de la topología de las proteínas de membrana. Estos métodos se basan en modificaciones genéticas que permiten distinguir la localización en la membrana de regiones específicas de las proteínas en estudio. En este trabajo se resumen los hallazgos reportados sobre la topología de transportadores bacterianos, con énfasis en los sistemas que transportan iones inorgánicos. De un total de 111 transportadores analizados, destacan dos grupos: uno que atraviesa una sola vez la membrana y otro grupo que posee 12 STM; además, hay varias proteínas con 4, 6, 8 ó 10 STM.

PALABRAS CLAVE: Transportadores de membrana, topología membranaral, bacterias.

INTRODUCCION

Como todas las células, las bacterias poseen membranas que aíslan el citoplasma del ambiente exterior y donde reside la permeabilidad selectiva, propiedad vital para los organismos vivos. Las membranas

biológicas son estructuras complejas constituidas principalmente por una bicapa lipídica y por numerosas proteínas asociadas a ella. Algunas proteínas interaccionan sólo en forma parcial con los lípidos de la membrana y se denominan proteínas periféricas;

estas proteínas, en consecuencia, sólo están expuestas a una de las caras de la membrana. En contraste, las proteínas integrales cruzan la membrana, interaccionando con ambas caras de la bicapa. Las proteínas integrales de membrana contienen una

ABSTRACT

Membrane transporters are proteins that play essential roles for the adequate functioning of all living organisms. In bacteria, nutrient uptake and extrusion of toxic compounds are among the main functions of these proteins. The structure of transporters is mainly given by their interactions with the cell membrane, thus making topological analysis, i.e. determination of the number and orientation of transmembrane segments (TMSs) with respect to the lipid bilayer, fundamental to understand their function. Information on membrane topology may be used for the identification of essential residues or as an approach to understand the evolutionary origin of transporters. A variety of methods has been designed to study the topology of membrane transporters. These methods are based on genetic modifications that allow to locate specific regions of the protein of interest within the membrane. In this work we summarize the reported findings on the topology of bacterial transporters, with emphasis on systems transporting inorganic ions. Of a total 111 transporters studied, two groups predominate: one that crosses only once the membrane and another group possessing 12 TMSs. In addition, many proteins contain 4, 6, 8 or 10 TMSs.

KEY WORDS: Membrane transporters, membrane topology, bacteria.

*Recibido: 14 de junio de 2005 Aceptado: 22 de noviembre de 2005

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán. Tel/Fax: (443) 326-5788. ¹ Autor responsable Correo E: cvega1999@yahoo.com

elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos. Estos residuos no polares se localizan principalmente en las regiones de la proteína que se encuentran inmersas en la membrana.

Las proteínas integrales de la membrana desempeñan papeles esenciales para el funcionamiento de los organismos vivos. Una de las funciones fundamentales de estas proteínas es el transporte. Las proteínas involucradas en el transporte, o transportadores, permiten la captación de nutrientes, la excreción de productos finales del metabolismo y de otras sustancias nocivas, además de la comunicación entre las células y su entorno. Los transportadores también participan en procesos que generan o consumen energía. Así, por ejemplo, los sistemas primarios de transporte activo emplean la energía generada por la hidrólisis del ATP para promover la acumulación o la expulsión de solutos o para impulsar el flujo de electrones en contra de un gradiente electroquímico. La translocación unidireccional de sustratos cargados llevada a cabo por estos transportadores origina potenciales electroquímicos que pueden ser utilizados por los transportadores secundarios para facilitar el movimiento de otros solutos a través de la membrana.

El conocimiento de la estructura de los transportadores es necesario para una completa comprensión de su función, por ello, en este trabajo se analizan las estrategias bioquímicas y moleculares que han sido empleadas para el establecimiento de la topología membranar de los transportadores bacterianos.

TOPOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

El conocimiento de la estructura proteica es sin duda esencial para entender su función. La estructura tridimensional de muchas proteínas solubles ha sido dilucidada gracias al

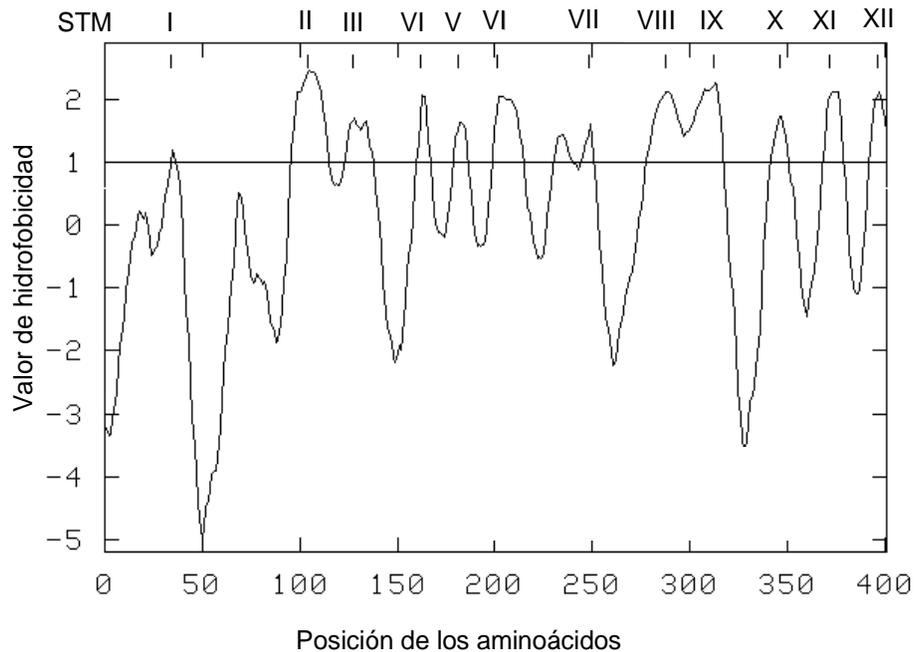


Figura 1. Análisis de hidrofobicidad de una proteína de membrana (perfil hidropático). La localización de probables segmentos transmembranales (STM) se indica con los números romanos de la parte superior, que corresponden a los picos de hidrofobicidad con un valor superior a 1.0. La proteína hipotética de 400 aminoácidos mostrada probablemente posee 12 STM.

empleo de métodos cristalográficos. Debido a la dificultad de generar cristales de proteínas de membrana, sólo se conoce la estructura detallada de un pequeño grupo de estas moléculas. Un aspecto importante de la estructura de las proteínas de membrana es la topología membranar, esto es, el número y la orientación de los segmentos de la proteína que atraviesan la bicapa lipídica. Las proteínas bitópicas de membrana, por ejemplo, poseen un solo segmento transmembranar (STM) que conecta dos dominios de la proteína localizados en ambos lados de la membrana. En el caso de las proteínas politópicas, varios STM atraviesan la membrana.

Aunque las proteínas de membrana muestran una estructura muy variada, se han identificado ciertos rasgos comunes entre ellas, sobre todo los relacionados con sus interacciones con el ambiente hidrofóbico en que habitan. Un factor importante para el acopio de esta información ha sido el gran

número de secuencias de proteínas de membrana que ha aparecido en la literatura reciente, como resultado de la secuenciación de los genomas completos de diversos organismos. Entre las características comunes de las proteínas de membrana resalta que los STM son por lo general, tramos de 20 aminoácidos, en su mayoría de naturaleza hidrofóbica, que adoptan estructuras de hélice α . Estas hélices se encuentran inmersas en la membrana manteniendo una orientación perpendicular con respecto al plano de la bicapa. Los STM están unidos entre sí por asas extramembranales de tamaño variable y compuestas principalmente por aminoácidos hidrofílicos.

Como ocurre con todas las membranas biológicas, las membranas bacterianas son estructuras asimétricas; esto es, las caras interna y externa presentan una diferente composición de lípidos y de proteínas y están expuestas a ambientes acuosos distintos: en el caso de la membrana interna, al cito-

plasma, y en el de la membrana externa, al espacio periplásmico. Se ha postulado que la distribución de las asas hidrofílicas de las proteínas de membrana obedece la llamada regla de "positivos adentro" (1), que señala que las asas no translocadas, o citoplásmicas, muestran una mayor proporción de aminoácidos con carga positiva (principalmente arginina y lisina), en comparación con las asas que son translocadas al periplasma.

ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

El papel de las proteínas de membrana depende en gran parte de sus interacciones con la fase lipídica, por lo que la determinación de su topología es importante. La topología de una proteína permite conocer la localización de residuos o regiones esenciales, ya sea para la función o para mantener la estructura correcta de la proteína en estudio. Un primer paso para este fin es la localización de regiones hidrofóbicas en la secuencia de aminoácidos. Esto se logra mediante la obtención de un "perfil hidropático", empleando programas de computadora (2). El perfil hidropático es un análisis del grado de hidrofobicidad que presenta una proteína a lo largo de su secuencia de aminoácidos (Fig. 1). Este perfil permite identificar regiones o dominios hidrofóbicos que representen STM potenciales, así como localizar las posibles asas hidrofílicas que los conectan.

Para predecir la orientación precisa de los probables STM se han diseñado y aplicado diversos métodos que modifican las proteínas, generalmente mediante la manipulación del gen correspondiente. Los principales métodos empleados se describen a continuación.

A) Fusiones traduccionales con proteínas reporteras

En las fusiones génicas, el gen que

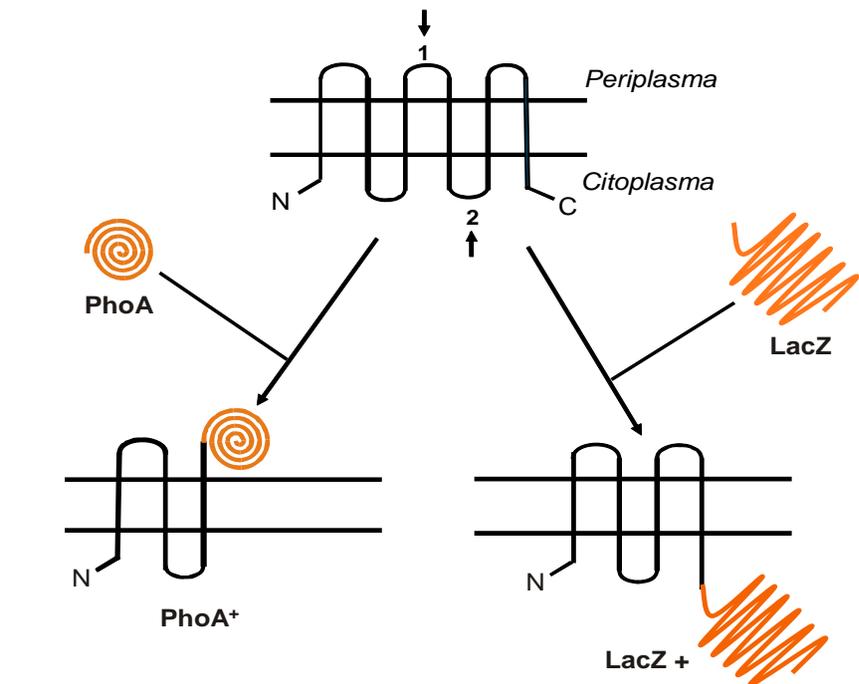


Figura 2. Fusiones traduccionales con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ). Se representa una proteína de membrana con seis segmentos transmembranales con los extremos amino y carboxilo terminales en el citoplasma. Una fusión periplásmica en la posición 1 con PhoA produce actividad de fosfatasa alcalina, mientras que una fusión citoplásmica con LacZ en la posición 2 origina actividad de β -galactosidasa. (Adaptada de la referencia 16).

codifica una proteína "reportera" (cuyas propiedades, por ejemplo su actividad enzimática, dependen de su localización celular) se fusiona con el gen de la proteína de membrana en estudio en sitios en los que se predice codifican asas o dominios hidrofílicos. La proteína generada por la fusión es el resultado de la transcripción y traducción de los dos genes, unidos de tal forma que conservan sus marcos de lectura "en fase". Las propiedades de la proteína reportera fusionada resultante indicarán en qué parte de la membrana se localiza el sitio donde ocurrió la fusión (3).

La proteína reportera más utilizada para estudios de fusiones génicas en bacterias es la enzima fosfatasa alcalina (PhoA), codificada por el gen *phoA* de *Escherichia coli*. La forma activa de PhoA se localiza en el espacio periplásmico y se sintetiza como un precursor con una secuencia señal N-terminal que es eliminada durante

su transporte a través de la membrana (4). El plegamiento y ensamble correctos de PhoA ocurren después de su exportación al periplasma, por lo que sólo en este compartimiento la enzima es activa (Fig. 2).

Las fusiones con la enzima β -galactosidasa (LacZ), también de *E. coli*, con frecuencia son usadas de manera complementaria a las fusiones con PhoA. A diferencia de PhoA, LacZ sólo tiene actividad enzimática en el citoplasma, debido a que los grupos sulfhidrilo de sus residuos de cisteína permanecen reducidos por el pH más ácido de este compartimiento y se oxidan en el periplasma (5). Cuando LacZ se une a una señal de exportación, la enzima queda atrapada en la membrana, lo cual evita su plegamiento apropiado y la enzima es inactiva (3) (Fig. 2). De esta manera, la determinación de la actividad de estos dos enzimas, en fusiones construidas de distintas regiones de la proteína de

membrana en estudio, permite conocer su localización celular.

Una ventaja de estos métodos es que los ensayos enzimáticos son fáciles de realizar al cuantificar los productos de manera sencilla. Además, existe una gran variedad de vectores de expresión para construir las fusiones. Sin embargo, estos procedimientos pueden presentar algunas dificultades, como la alta actividad de PhoA cuando se fusiona en el extremo amino terminal de un asa citoplásmica. Por otra parte, cuando PhoA o LacZ se fusionan dentro de un STM su actividad puede variar y originar resultados confusos.

Otra proteína reportera que se ha empleado como alternativa de PhoA es la enzima β -lactamasa (BlaM). Cuando la enzima se expresa en el periplasma es activa y confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos. En contraste, las células que expresan BlaM en el citoplasma son sensibles a estos agentes. Así, la distinta susceptibilidad a antibióticos de bacterias que expresan fusiones de proteínas de membrana con BlaM se puede usar para determinar su localización. El empleo de esta enzima presenta algunas desventajas que han limitado su uso. Por ejemplo, cuando BlaM se fusiona al extremo amino de un asa periplásmica no confiere resistencia a β -lactámicos; en otros casos, cuando se fusiona a un sitio citoplásmico llega a conferir resistencia a los antibióticos.

Como una alternativa para el análisis de la topología de proteínas de membrana se ha empleado la proteína verde fluorescente (GFP). Esta proteína fluoresce sólo si se encuentra en el citoplasma. La actividad de GFP se produce al excitar con luz ultravioleta el fluoróforo interno localizado en la proteína, lo cual origina la emisión de luz verde que puede ser detectada en un fluorómetro (6). Cuando se fusiona en diferentes sitios de la proteína de membrana en estudio, la fluorescencia

de la GFP se puede usar para localizar regiones citoplásmicas. GFP es una proteína monomérica, lo cual puede representar una ventaja para su expresión sobre LacZ, que es un tetrámero. Este reportero se ha usado aún muy poco para el análisis topológico de proteínas de membrana.

La enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) cataliza la acetilación del cloranfenicol sólo cuando la proteína está en el citoplasma. Esta modificación inactiva al cloranfenicol confiriendo resistencia al antibiótico a las bacterias que expresan la enzima. Cuando CAT se fusiona a una proteína de membrana, su localización puede ser determinada con base en la susceptibilidad al cloranfenicol de la bacteria que expresa la fusión (7). Otra enzima reportera, la β -glucuronidasa (GUS), lleva a cabo la hidrólisis de β -glucurónidos sólo cuando se encuentra en el citoplasma. Su actividad es determinada por la velocidad de hidrólisis de sustratos cromogénicos como el p-nitrofenil glucurónido (8). El uso de CAT y GUS es muy reciente por lo que se han utilizado en muy pocos casos para el análisis topológico, no habiéndose aún reportado problemas en su aplicación.

B) Mutagénesis y monitoreo de cisteínas

Debido a que la cisteína posee un grupo R relativamente pequeño e hidrofílico (-SH), su sustitución por otro aminoácido (usualmente serina) es tolerada por la mayoría de las proteínas de membrana, conservando éstas su función. Para el análisis topológico de transportadores se ha empleado el método de monitoreo ("scanning") de cisteínas. Este procedimiento consiste en sustituir mediante mutagénesis todos los residuos de cisteína de la proteína y después reemplazar determinados aminoácidos por nuevas cisteínas. A continuación

se emplean reactivos específicos para grupos sulfhidrilo que permiten conocer la localización del residuo con respecto a la membrana. Los compuestos más utilizados con estos fines son los derivados de la maleimida (Fig. 3), la cual se une formando un enlace de tioéter con los grupos sulfhidrilo. Así, se han usado reactivos permeables o impermeables a la membrana, que contienen biotina o grupos fluorescentes o radioactivos que se pueden detectar por su unión con estreptavidina, por su fluorescencia o mediante autorradiografía. Estos reactivos se usan para cuantificar la accesibilidad del sitio bajo estudio y pueden conducir a su localización celular (Fig. 3). La principal ventaja del método de monitoreo de cisteínas sobre las fusiones traduccionales, es que la proteína se conserva prácticamente intacta con sólo algunas modificaciones menores en su secuencia de aminoácidos que no alteran su topología. La desventaja es que los procedimientos son más complejos y costosos, ya que se requiere la modificación de la proteína por mutagénesis del gen que la codifica y su posterior identificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o incluso por ensayos de inmunodetección.

C) Inserción de sitios de reconocimiento para anticuerpos o proteasas

Otro de los enfoques empleados para el análisis de la topología de proteínas de membrana hace uso de la inserción de epítomos. Un epítomo es una pequeña región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo. La inserción de epítomos es útil para obtener información de proteínas de membrana externa, principalmente cuando se desconoce la estructura tridimensional. El método consiste en insertar un péptido reportero corto, correspondiente a un epítomo, en regiones hidrofílicas de la proteína de membrana en estudio; las proteínas por lo general toleran la in-

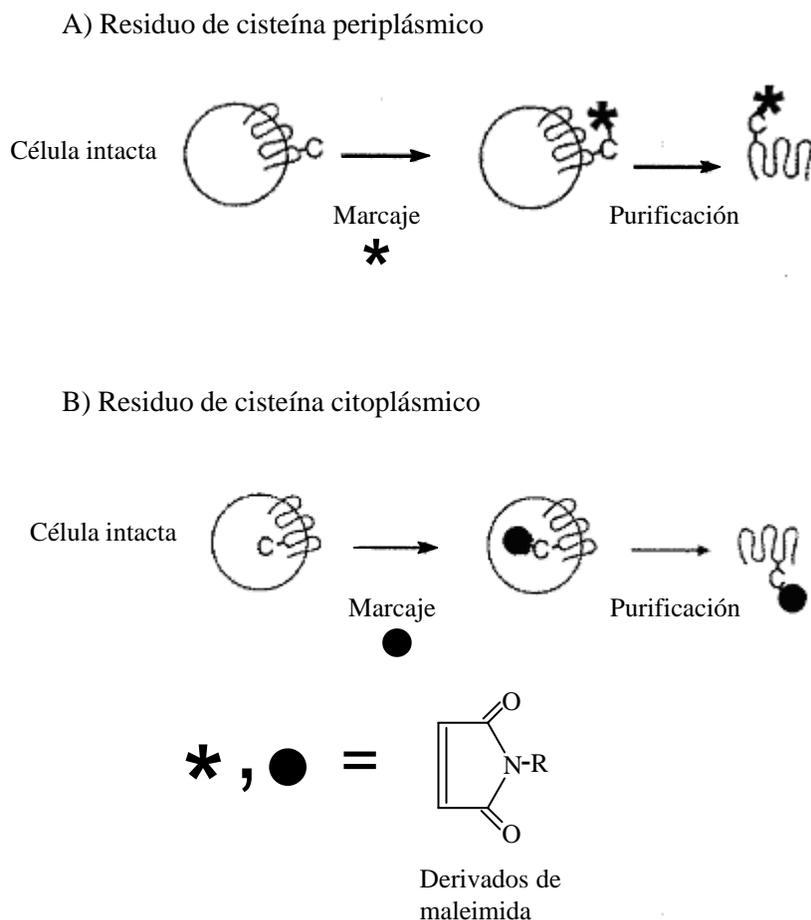


Figura 3. Monitoreo de cisteínas para el análisis topológico de transportadores de membrana. Para la localización de residuos periplásmicos de cisteína (A) introducidos en la proteína de membrana, se pueden realizar ensayos de accesibilidad en células completas utilizando reactivos derivados de maleimida permeables (*) o impermeables (●), en donde ambos compuestos pueden reaccionar con el aminoácido. Para residuos citoplásmicos (B), sólo con derivados permeables de maleimida se podrá marcar la cisteína. En la parte inferior se muestra la estructura de la parte reactiva de los derivados de la maleimida. (Modificado de la referencia 3).

serción sin sufrir cambios drásticos en su estructura y localización celular y, por lo tanto, sin alterar sus propiedades biológicas. La inserción de los epítopos se realiza por medio de mutagénesis dirigida o mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica el epítipo reportero en el gen que codifica la proteína de interés. Las células que expresan las proteínas híbridas así generadas se ensayan con anticuerpos específicos para el epítipo reportero insertado (9). Con los resultados obtenidos en ensayos de accesibilidad del anticuerpo correspondiente, usando células intactas o vesículas de membrana invertidas, se puede determinar la localiza-

ción del sitio de inserción del epítipo en la proteína de membrana. La ventaja que este método presenta es que la proteína se conserva prácticamente intacta, excepto por la inserción del epítipo; sin embargo, los procedimientos son relativamente complicados y costosos, además de que no todos los epítopos insertados son accesibles al anticuerpo.

Las enzimas proteolíticas o proteasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Su uso en el análisis de la topología de las proteínas se debe a que las membranas son impermeables a las proteasas. Así, cuando las proteasas se adicionan a suspensiones bacterianas, las regiones proteicas de

la membrana expuestas pueden ser digeridas mientras que los sitios citoplásmicos no son susceptibles a la hidrólisis (3). Los fragmentos producidos por la hidrólisis de las proteínas de membrana se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida y se identifican con anticuerpos específicos para la proteína en estudio mediante inmunodetección. El hecho de que en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de membrana se encuentran comunmente sitios de reconocimiento para ciertas proteasas puede llegar a complicar este análisis. Para resolver este problema, por manipulación genética se pueden insertar sitios de reconocimiento para proteasas específicas en regiones de la proteína expuestas a cualquiera de los dos lados de la membrana. El análisis de los sitios de reconocimiento se puede hacer usando células intactas, para determinar la accesibilidad a los sitios expuestos en el lado exterior de la membrana. Los sitios localizados en el interior se analizan usando vesículas de membrana invertidas. De esta forma, se puede determinar la localización de sitios de reconocimiento insertados en diferentes regiones de la proteína de membrana (10). La presencia de sitios de reconocimiento para proteasas dentro de la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas, así como que la proteína se conserva por lo general intacta cuando los sitios son insertados, representan ventajas de la técnica. Las desventajas se relacionan con el hecho de que no todos los sitios son accesibles a las proteasas, por lo que en algunos casos éstos tienen que ser insertados en regiones específicas. Una complicación adicional es que se requiere, por supuesto, tener anticuerpos para la proteína de estudio.

TOPOLOGÍA DE LOS TRANSPORTADORES BACTERIANOS

En nuestro laboratorio estamos tratando de dilucidar la topología

membranal del transportador de cromato ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*, una proteína que confiere resistencia a ese ión tóxico mediante su expulsión del citoplasma (11). Por esta razón se analizaron las proteínas transportadoras de bacterias con topología conocida, así como los métodos que se han usado para su determinación. Con este fin se realizó una búsqueda, que abarcó el periodo de noviembre de 1987 a octubre de 2004, de reportes sobre los transportadores bacterianos que han sido analizados desde el punto de vista topológico y cuyo estudio condujo al establecimiento del número y la orientación de los STM. En muchos de los casos reportados, el análisis topológico ha permitido confirmar la información preliminar obtenida a partir del perfil hidropático, pero también se han descrito ejemplos en los que la información obtenida con este perfil no concuerda con la topología determinada experimentalmente. Para este trabajo se tomaron en cuenta principalmente los transportadores de la membrana interna ya que ahí reside la mayoría de los sistemas de transporte bacterianos importantes desde el punto de vista fisiológico. Además, también se incluyeron las proteínas que, aunque por sí solas no tienen la función de transportador, forman parte de un sistema de transporte membranar.

Se identificó un total de 111 proteínas. Como era de esperar, la mayoría de los transportadores analizados (62 proteínas o 55%) corresponde a proteínas de *E. coli* y le siguen, aunque en menor cantidad, otras bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (nueve proteínas) y *Salmonella typhimurium* (siete proteínas). Sólo nueve transportadores (8%) pertenecen a especies de bacterias Gram positivas.

Con relación a la estrategia experimental elegida, sobresale el uso de los procedimientos que utilizan fusiones con la proteína reportera fosfatasa

alcalina (77 casos o 69%) ya sea sola, en combinación con β -galactosidasa, o con otras reporteras (Tabla 1). Como se mencionó antes, esto probablemente se debe a la sencillez de los ensayos enzimáticos y a la disponibilidad de vectores de expresión para esos genes reporteros. En la Tabla 1 se observa que el uso de fusiones con la β -lactamasa y el monitoreo de cisteínas también han sido empleados con frecuencia.

Para facilitar su análisis las proteínas de membrana se dividieron en dos grupos: en el primero se incluyeron las que tienen la función de transportador por sí solas, excepto aquellas que llevan a cabo el transporte de protones; en el segundo grupo se incluyó a las proteínas que forman canales, a las que forman parte de un sistema de transporte, pero que solas no tienen la función de transportador, y a los transportadores de protones. La exclusión de estas últimas proteínas del primer grupo se debe a que muchas de ellas están formadas por varias subunidades en las que no es claro aún cual lleva a cabo el transporte; además de que el transporte se puede considerar como una función secundaria de estas proteínas, cuya función principal en muchos casos es la transferencia de electrones.

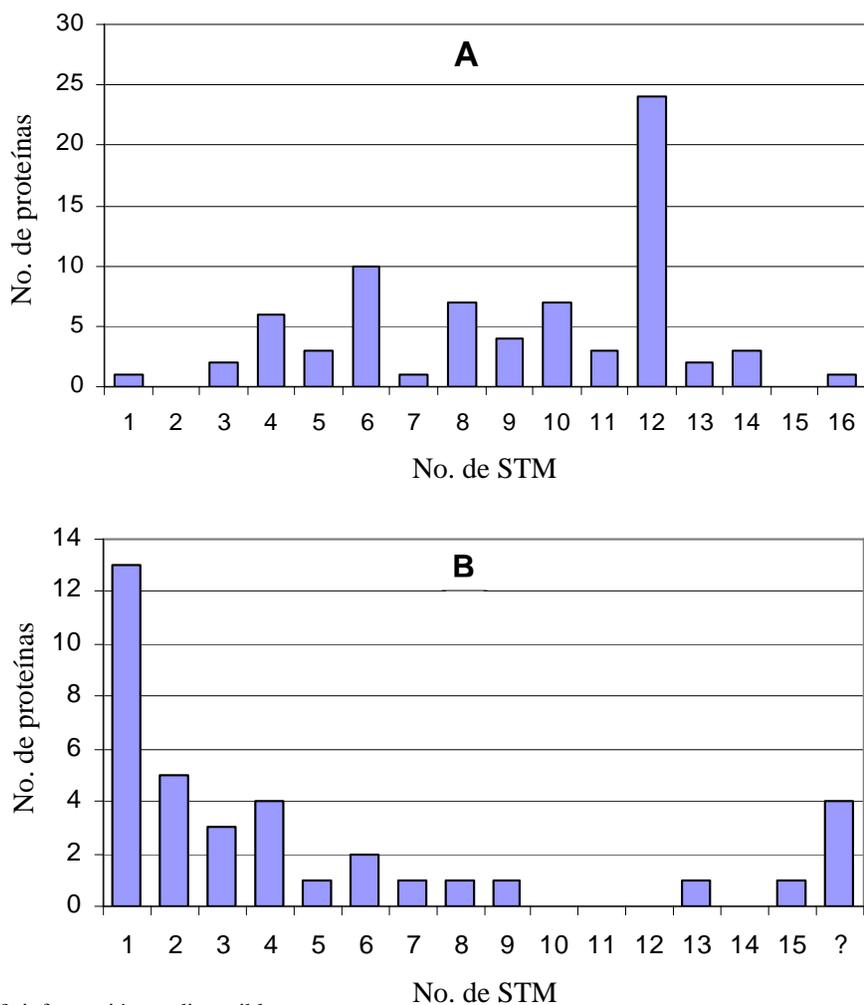
La figura 4 muestra la distribución de los transportadores reportados con respecto al número de STM que poseen. En el primer grupo (Fig. 4A) se encontraron 74 proteínas (66%) donde sobresalen los transportadores con 4, 6, 8, 10 y 12 STM, que comprenden casi la mitad de los ejemplos estudiados (54 casos, o 48%); sólo los transportadores de 6 y 12 STM representan casi un tercio del total (34 proteínas, o 30%). Los datos de la figura 4A acerca de los transportadores con 4, 6, 8, 10 y 12 STM concuerdan con reportes que señalan que los transportadores de la membrana se han originado a partir de la amplificación, probablemente mediante procesos de duplicación génica, de proteínas con dominios más pequeños (12). Se postula que las proteínas más grandes, formadas a partir de una duplicación, adquirieron una mayor especificidad hacia el sustrato a transportar, así como un mejor acoplamiento de energía para llevar a cabo su función. De acuerdo con esta hipótesis, las proteínas de 8 y 12 STM se formaron de la duplicación de dominios de 4 y 6 STM, respectivamente, aunque aún prevalecen estos transportadores pequeños (Fig. 4A). Esta suposición ha sido reforzada por el análisis de las secuencias de

TABLA 1

Métodos usados para el análisis topológico de los transportadores bacterianos analizados en este trabajo

Método	No. de proteínas
PhoA /LacZ	39
PhoA	32
BlaM	15
Monitoreo de cisteínas	10
PhoA con otros reporteros	6
Inserción de epítomos	3
Uso de proteasas	2
Otros	4
Total	111

Abreviaturas: PhoA, fosfatasa alcalina; LacZ, β -galactosidasa, BlaM; β -lactamasa.



?, información no disponible

Figura 4. Distribución de las 111 proteínas de membrana analizadas en este trabajo, con base en el número de segmentos transmembranales (STM). (A) transportadores; (B) proteínas auxiliares de transportadores y canales.

aminoácidos de las mitades amino y carboxilo de algunos transportadores. Por ejemplo, un análisis filogenético de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* ha mostrado que algunos aminoácidos, y probablemente ciertos motivos, se conservan de manera simétrica en ambas porciones de la proteína (Díaz-Pérez y col, en preparación); datos similares se han reportado para el transportador de arsénico ArsB (13) y el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ YrbG (14), ambos de *E. coli*.

El segundo grupo de transportadores incluye proteínas con un menor número de STM (Fig. 4B). Se advierte que, excepto un grupo de proteínas que atraviesan la membrana una sola vez

(13 casos, todos caracterizados como proteínas auxiliares de sistemas de transporte), la mayoría contienen 2, 3 y 4 STM. La diferencia en el número de STM, con relación a las proteínas del primer grupo, podría relacionarse con una menor especificidad o con una participación secundaria en el fenómeno de transporte de los transportadores de este segundo grupo.

La distribución de los STM de los transportadores bacterianos en la figura 4 es muy similar a la obtenida por Saier (12) analizando tanto proteínas con topología establecida experimentalmente como predicciones topológicas de transportadores de organismos que abarcan los dominios

Arquea, Eubacteria y Eucaria. Los dos grupos de proteínas, con un bajo o elevado número de STM, están presentes también en ese amplio estudio.

Cuando los transportadores bacterianos reportados se clasificaron de acuerdo con su función específica, se encontró que el grupo principal (con 78 proteínas, o 70%) comprende a los que transportan compuestos orgánicos, entre ellos los que participan en la secreción de proteínas o en el transporte de intermediarios metabólicos. Esta relativa abundancia es probablemente debida a que este tipo de transportadores fisiológicos han sido más ampliamente estudiados.

Un segundo grupo (33 proteínas, o 30%) se relaciona con transportadores de iones inorgánicos (Tabla 2). La gran mayoría (26 proteínas, o 79%) tienen funciones homeostáticas y captan o expulsan cationes fisiológicos (incluyendo protones). En contraste, sólo siete transportadores de este grupo participan en el transporte (expulsión) de iones tóxicos; la mayoría de estos transportadores (cinco ejemplos) se encuentran codificados en plásmidos y constituyen sistemas de resistencia bacteriana. La cantidad de transportadores de iones inorgánicos tóxicos analizados es muy baja debido a que muchos de los sistemas de resistencia aún no se han estudiado con detalle, por lo que se desconoce la topología del transportador. La distribución de la topología de los transportadores de sustratos inorgánicos es muy amplia, desde los que tienen un solo STM hasta los de 15 STM. Entre estos predominan, sin embargo, los que poseen de 8-12 STM (18 proteínas, o 55%; Tabla 2). La amplia distribución de estas proteínas de acuerdo con el número de STM es probablemente debida a que dentro de este grupo se encuentran tanto proteínas que forman canales como transportadores primarios y secundarios.

TABLA 2

Características de los transportadores bacterianos de iones inorgánicos

Nombre	Género	Sustrato (s)	Función	No. de STM*
AmtB	<i>Escherichia coli</i>	Amonio	Captura	11
ArsB	<i>Escherichia coli</i>	Arsenicales	Expulsión	12
ATPasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	5
ATPasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	8
CadA	<i>Helicobacter pylori</i>	Cadmio	Expulsión	8
CadA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cadmio	Expulsión	8
ChrA	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Cromato	Expulsión	10
ChrA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cromato	Expulsión	12
Citocromo d	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	¿
CorA	<i>Salmonella typhimurium</i>	Magnesio	Captura y expulsion	3
CydA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	9
CyoA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	2
CyoB	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	15
CyoC	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	4
CyoD	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	3
CyoE	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	7
CzcA	<i>Ralstonia sp.</i>	Zinc, Cobalto y Cadmio	Expulsión	12
HoxN	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Niquel	Captura	7
Kch	<i>Escherichia coli</i>	Potasio	Captura	6
MgtB	<i>Salmonella typhimurium</i>	Magnesio	Captura	10
MntB	<i>Synechocystis sp.</i>	Manganeso	Captura	9
MntH	<i>Escherichia coli</i>	Manganeso	Captura	11
MotA	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	4
MotB	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Captura	1
MscL	<i>Escherichia coli</i>	Potasio	Captura	2
NhaA	<i>Escherichia coli</i>	Sodio y Protones	Antiportador	12
NhaB	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Sodio y Protones	Antiportador	9
NixA	<i>Helicobacter pylori</i>	Niquel	Captura	8
OadB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sodio	Expulsión	9
ATPasa tipo P	<i>Helicobacter pylori</i>	Cationes	Captura	8
Trans-Hasa	<i>Escherichia coli</i>	Protones	Expulsión	13
YrbG	<i>Escherichia coli</i>	Sodio y Calcio	Captura	10
ZntB	<i>Salmonella typhimurium</i>	Zinc	Expulsión	2

*STM, segmentos transmembranales; ¿, información no disponible

Referencias bibliográficas adicionales así como información más detallada acerca de los transportadores que se incluyen en este trabajo se pueden encontrar en: www.tcdb.org/ y www.membranetransport.org/

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se estima que 20 a 30% de las proteínas codificadas en el genoma de un organismo son proteínas de

membrana (15), lo que refleja la gran importancia de los transportadores para el funcionamiento celular. Desafortunadamente en las bases de datos, como el Protein Data Bank, se encuentra reportada la estructura tridimensional de sólo cerca de una decena de transportadores. Por esto se ha recurrido a otros métodos para obtener información detallada acerca de su estructura. Una de estas metodologías se basa en la predicción

in silico de estructuras secundarias con base en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, ninguno de los métodos de predicción disponibles en la actualidad es absolutamente confiable. Por esta razón, el uso de métodos bioquímicos y moleculares ha sido de gran ayuda para el análisis topológico de los transportadores bacterianos.

Una vez que se tiene la información topológica de una proteína de membrana, se puede proceder a

identificar los aminoácidos relevantes para su estructura o función. Es importante estudiar desde el enfoque filogenético los residuos conservados dentro de la familia a la cual pertenece el transportador. A continuación, esta información puede ser utilizada para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de esos residuos con el fin de determinar su papel específico en la función del transportador, ya sea de tipo estructural o participando directamente en la interacción con el sustrato a transportar. Los datos estructurales obtenidos mediante el análisis topológico de los transportadores conocidos se han utilizado para obtener información sobre transportadores homólogos aún no estudiados. También, dado que la homología entre las proteínas indica que éstas provienen de un ancestro común, el análisis topológico de las proteínas de membrana puede ayudar a conocer el origen evolutivo de los transportadores con base en sus características estructurales

REFERENCIAS

1. von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225:487-94.
2. Moller S, Croning MD, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17:646-53.
3. van Geest M, Lolkema JS (2000) Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:13-33.
4. Derman AI, Beckwith J (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* 173:7719-22.
5. Snyder WB, Silhavy TJ (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:953-63.
6. Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:4068-76.
7. Adler J, Bibi E (2002) Membrane topology of the multidrug transporter MdfA: complementary gene fusion studies reveal a nonessential C-terminal domain. *J Bacteriol* 184:3313-20.
8. Gouffi K, Gerard F, Santini CL, Wu LF (2004) Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem* 279:11608-15.
9. Newton SM, Klebba PE, Michel V, Hofnung M, Charbit A (1996) Topology of the membrane protein LamB by epitope tagging and a comparison with the X-ray model. *J Bacteriol* 178:3447-56.
10. Mondigler M, Ehrmann M (1996) Site-specific proteolysis of the *Escherichia coli* SecA protein *in vivo*. *J Bacteriol* 178:2986-88.
11. Aguilera S, Aguilar ME, Chávez MP, López-Meza JE, Pedraza-Reyes M, Campos-García J, Cervantes C (2004) Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 232:107-12.
12. Saier MH Jr (2003) Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol Microbiol* 48:1145-56.
13. Rensing C, Ghosh M, Rosen BP (1999) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 181:5891-97.
14. Saaf A, Baars L, von Heijne G (2001) The internal repeats in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-related *Escherichia coli* protein YrbG have opposite membrane topologies. *J Biol Chem* 276:18905-07.
15. Wallin E, von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7:1029-38.
16. Manoil C, Beckwith J (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233:1403-08.