

APLICACIÓ DE L'ESPECTROSCÒPIA INFRAROJA A L'ANÀLISI ESTRUCTURAL DE LA PERMEASA DE MELIBIOSA D'*ESCHERICHIA COLI*

NATÀLIA DAVE¹, VÍCTOR A. LÓRENZ-FONFRÍA¹, JOAQUIM VILLAVARDE¹, RAYMONDE LEMONNIER², GÉRARD LEBLANC² i ESTEVE PADRÓS¹

¹Unitat de Biofísica. Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona.

²Laboratori de Fisiologia de les Membranes Cel·lulars - LRC-CEA 16V. Universitat de Niça Sophia-Antipolis i CNRS (URA 6078). 06238 Villefranche-sur-Mer Cedex. França.

Adreça per a la correspondència: Esteve Padrós. Unitat de Biofísica. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona. Adreça electrònica: esteve.padros@uab.es.

Paraules clau: Espectroscòpia infraroja, bescanvi protó/deuteró, melibiosa, canvis conformationals.

Keywords: Infrared spectroscopy, proton/deuteron exchange, melibiose, conformational changes.

RESUM

En aquest treball es revisa l'aplicació de l'espectroscòpia infraroja de transformada de Fourier (FTIR) a l'estudi de la permeasa de melibiosa d'*Escherichia coli*. L'estimació del contingut d'estructura secundària mitjançant FTIR està d'acord amb una estructura de dotze hèlixs α transmembrana, amb un contingut aproximat d'estructura β d'un 20 %. L'accessibilitat de la proteïna reconstituïda pel dissolvent aquós es va estudiar seguint el bescanvi protó/deuteró per espectroscòpia de FTIR de reflexió total atenuada. A partir de les dades de quatre condicions que donen lloc a complexos diferents amb els substrats (H^+ , Na^+ , melibiosa), es demostra que la interacció amb melibiosa (és a dir, en el complex H^+ -melibiosa-permeasa) protegeix la proteïna envers el bescanvi, especialment pel que fa a les estructures β . En menor magnitud, les hèlixs α també es troben protegides en aquest complex, mentre que els girs reversos no mostren diferències. El conjunt de resultats suggereixen que la unió del sucre a la permeasa indueix una compactació de la proteïna, especialment pel que fa a les estructures β , les quals poden estar incloses en els llaços IV-V i X-XI. Finalment, es discuteix un possible paper catalític d'aquests llaços en la funció de la permeasa.

SUMMARY

The application of Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) to the study of *Escherichia coli* melibiose permease is reviewed. Estimation of secondary structure content of melibiose permease by FTIR spectroscopy agrees with a disposition of the transporter in 12 transmembrane α helices and indicates the presence of about 20 % β sheets. The accessibility of the reconstituted protein to aqueous solvent was studied following hydrogen-deuterium exchange kinetics monitored by attenuated total reflection FTIR under four distinct conditions where MelB forms different complexes with its substrates (H^+ , Na^+ , melibiose). Analysis of the amide II band upon 2H_2O exposure discloses a significant sugar protection of the protein against aqueous solvent. Investigation of the amide I exchange reveals clear substrate effects on β -sheet accessibility, being the complex H^+ -melibiose-permease the most protected state against exchange. Although of smaller magnitude, similar changes in α -helices plus non-ordered structures are detected. Finally, no differences are observed when analysing reverse turn structures. The results suggest that sugar binding induces a significant compactness of the carrier's structure, affecting mainly β -sheet domains of the transporter, which according to secondary structure predictions may include cytoplasmic loops IV-V and X-XI. A possible catalytic role of these two loops in the functioning of MelB is hypothesized.

INTRODUCCIÓ

Els sistemes de transport a través de les membranes biològiques formen un conjunt molt heterogeni que va des del transport d'ions o de molècules petites com l'aigua, fins al transport de molècules més grans i complexes com lípids, aminoàcids o pèptids. A més, els sistemes de transport adopten mecanismes diversos, des del transport passiu (a favor del gradient) fins al transport actiu que es realitza amb despesa d'energia. En aquest treball, analitzarem un dels sistemes de transport de sucre, la permeasa de melibiosa (MelB). Existeixen un gran nombre de proteïnes de membrana que pertanyen a la família dels transportadors de Na^+ /solut de forma simport que, per causa de la dificultat de purificació i cristallització, tenen una organització estructural molt poc coneguda. La permeasa de melibiosa és una de les proteïnes d'aquesta família que s'ha pogut purificar i reconstituir en estat actiu en quantitats suficients per a permetre'n l'estudi estructural

(Pourcher *et al.*, 1995). La MelB és un transportador de membrana d'*Escherichia coli* codificada pel gen *melB* (Yazu *et al.*, 1984) que catalitza l'acumulació de galactòsids α o β utilitzant els ions H^+ , Na^+ o Li^+ com a co-transportadors dins el citoplasma bacterià. Aquests ions competeixen pel mateix lloc d'unió i augmenten l'afinitat del sucre co-transportat per la proteïna, i el Na^+ i el Li^+ són millor activadors que el H^+ (Damiano-Forano *et al.*, 1986; Bassilana *et al.*, 1988). La MelB és una proteïna molt hidrofòbica (el 70 % dels residus són apolars) de 473 aminoàcids que, sobre la base de diversos tipus d'estudis —immunològics (Botfield i Wilson, 1988; Pourcher *et al.*, 1996), fusió de MelB-phoA (Botfield i Wilson, 1992; Pourcher *et al.*, 1996), proteòlisi (Gwizdek *et al.*, 1997) i FTIR (Dave *et al.*, 2000)— es prediu un model topològic de dotze hèlixs transmembrana amb el costat N i C-terminal a la cara citoplasmàtica (figura 1). Estudis de marcatge mitjançant activació per llum (Ambroise *et al.*, 2000) i de mutagènesi dirigida, conjuntament amb fluorescència (Cor-

del cervell (Jursky i Nelson, 1999). Per aquestes raons, també estan implicats directament en l'acció de fàrmacs antidepressius i en abusos de drogues (Pacholczyk *et al.*, 1991; Tate *et al.*, 1999). Aquesta família de transmissors té característiques estructurals i funcionals homòlogues a les del transportador de melibiosa, ja que consten de dotze o tretze hèlixs transmembrana i, a més, el transport és Na^+ -dependent (Uhl, 1992). També existeixen moltes malalties degudes a la mala absorció de glucosa, o bé degudes al transport deficient de glucosa al cervell, com la síndrome de la proteïna transportadora de glucosa (Klepper *et al.*, 1999), o relacionades amb l'entrada de drogues al cervell que utilitzen el transportador de glucosa (Jolliet-Riant i Tillement, 1999). Cal també indicar que existeix un grau d'homologia elevat en el funcionament del transport Na^+ -dependent entre el transportador de glucosa humana i el transportador de melibiosa, cosa que no passa amb el transportador de lactosa d'*Escherichia coli*, el qual utilitza el H^+ en comptes de Na^+ (Poolman i Konings, 1993; Reizer *et al.*, 1994). De la mateixa manera, existeix una altra família de cotransportadors de membrana dependents de Na^+ , un membre de la qual és el transportador simport de sodi-iode de la tiroide, implicat en el hipotiroïdisme i el càncer de tiroide. Així, es plantegen teràpies d'acumulació de iode radioactiu per a tractar el càncer de mama (Tazebay *et al.*, 2000), cosa que implica un estudi en profunditat del transportador de iode, el qual té homologia funcional i estructural amb la MelB (Reizer *et al.*, 1994).

CANVIS ESTRUCTURALS ASSOCIATS AMB EL MECANISME DE TRANSPORT

Les primeres indicacions de l'existència de canvis conformationals associats al trans-

port de melibiosa van procedir d'una sèrie d'estudis en què s'utilitzava espectroscòpia de fluorescència. L'addició, en condicions saturants de NaCl , de sucres α -galactòsids, incrementa el senyal de fluorescència un 13-17 %, depenent de si són mono-, di- o trisacàrids i l'addició de β -galactòsids en un 7 % del total del senyal de fluorescència (Mus-Veteau *et al.*, 1995). Per contra, l'addició d'ions Na^+ o Li^+ disminueix el senyal total en un 2 %. A més, l'addició de sucre posterior a l'addició de Na^+ o Li^+ incrementa el senyal de fluorescència, cosa que fa pensar en un augment d'afinitat del sucre per la MelB en presència de l'ió. Es van fer mesures també de constant d'afinitat i eren de l'ordre d'una magnitud més alta per als α -galactòsids que per als β -galactòsids, de la mateixa manera que els canvis mesurats per fluorescència (Mus-Veteau *et al.*, 1995). Així doncs, es pot parlar de complexos ternaris de MelB-sucres-íon que causen canvis conformationals observables per fluorescència.

ESPECTROSCÒPIA INFRAROJA

Un dels mètodes que proporciona més informació dels sistemes de membrana és l'espectroscòpia infraroja de transformada de Fourier (FTIR). D'una banda, aquesta tècnica permet estimar els percentatges d'estructura secundària de les proteïnes, així com estudiar els canvis estructurals que es produeixen durant l'activitat de la proteïna. De l'altra, el procés de substitució de protons de l'enllaç amida per deuterons pot ser també seguit amb FTIR, i això permet l'estudi de canvis en l'accessibilitat de la cadena polipeptídica. Finalment, aquesta tècnica permet estudiar els altres components de les membranes, com són els lípids. Així doncs, en l'absència d'estructures tridimensionals obtingudes per mètodes de difracció, l'espectroscòpia infraroja és capaç de

proporcionar informació estructural valuosa. En aquest treball presentem una sèrie de resultats obtinguts aplicant aquesta tècnica a l'estudi estructural de la MelB tant en presència com en absència de substrats (Dave *et al.*, 2002).

ESTUDIS ESTRUCTURALS DE LA MELB PER ESPECTROSCÒPIA INFRAROJA

El procés d'obtenció de la proteïna en requereix l'aïllament i purificació en estat solubilitzat, és a dir, en presència de detergent. Malgrat que el detergent utilitzat no desnaturalitza la proteïna, per a obtenir dades estructurals com més pròximes possibles a l'estat natiu, cal reconstituir la proteïna en liposomes. Cal tenir en compte, doncs, que el resultat final d'aquest procés dependrà, en una mesura o altra, d'almenys dos paràmetres essencials: els lípids utilitzats per a la reconstitució, i la relació molar inicial lípid/proteïna. Després de realitzar una sèrie d'estudis preliminars, es va determinar que els millors resultats quant a l'activitat dels proteoliposomes s'aconsegueixen amb una reconstitució amb un extracte de lípids d'*E. coli*, a una relació molar lípid/proteïna de 120 (equivalent a una relació en pes/pes de 2).

A la figura 2a es mostra un espectre d'infraroig típic, obtingut per transmissió, d'una suspensió de proteoliposomes. En la zona de 1.800-1.500 cm^{-1} es distingeixen tres bandes principals, que corresponen a l'absorció dels lípids (banda a 1.740 cm^{-1}), i a les bandes degudes a l'absorció de la proteïna (amida I a 1.657 cm^{-1} i amida II a 1.545 cm^{-1}). Aquests espectres ja han estat corregits per l'absorció del tampó aquós emprat (vegeu la llegenda de la figura 2). Aquestes bandes resulten, en realitat, de la superposició d'una sèrie de bandes més estretes. Per a tenir una idea de la localització d'aquestes ban-

des components i de llur intensitat, cal aplicar mètodes matemàtics que ajudin a resoldre els espectres complexos. Així, a la figura 2b es mostra l'espectre desconvulat, el qual presenta una sèrie de detalls que permeten identificar les bandes components. Les més importants corresponen a hèlixs α (bandes a 1.660 i 1.653 cm^{-1}), la zona de 1.669-1.685 cm^{-1} , que es pot assignar majoritàriament a girs reversos, i la regió de 1.640-1.628 cm^{-1} , en la qual apareixen les bandes corresponents a estructura β (Byler i Susi, 1986). En la regió de l'amida II, la banda principal a 1.547 cm^{-1} confirma la presència majoritària d'hèlixs α . De manera destacada, pot veure's la banda a 1.517 cm^{-1} , que correspon a l'anell de la tirosina. L'estudi dels espectres desconvulats, tant en suspensió d'aigua normal com en aigua pesada, ha permès comprovar que els percentatges d'estructures secundàries estan d'acord amb les prediccions d'estructura secundària (Pourcher *et al.*, 1996) i amb altres resultats com els experiments de proteòlisi enzimàtica (Gwizdeck *et al.*, 1997). Tots aquests resultats són coherents amb una estructura formada per 12 hèlixs α transmembrana (al voltant d'un 50 % de l'estructura), una proporció relativament elevada de làmines β (aproximadament un 20 %), i la resta de l'estructura (30%) repartida entre girs reversos i estructura no ordenada (Dave *et al.*, 2000).

ANÀLISI DE CANVIS ESTRUCTURALS DE LA MELB MITJANÇANT BESCANVI H/D

El protó de l'enllaç amida que forma la cadena polipeptídica pot bescanviar-se per un protó del medi, sempre que el protó de l'enllaç amida sigui mínimament accessible al medi aquós. És a dir, els protons que siguin inaccessibles a causa de l'estructura o

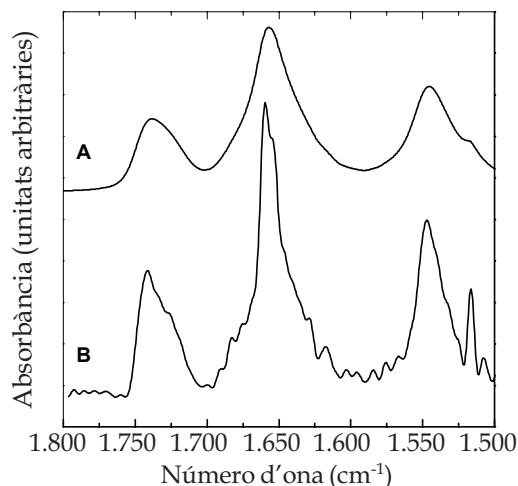


FIGURA 2. Espectres d'infraroig de MelB reconstituïda en liposomes de lípids extrets d'*E. coli*, resuspesos en fosfat potàssic 100 mM, pH 7,0. a) Espectre d'absorció, després de restar la contribució del tampó. Es poden identificar tres bandes o regions: la banda amb màxim d'absorció a 1.740 cm^{-1} , corresponent a l'absorció dels grups -C=O dels lípids, la banda amida I, deguda als grups amida de la cadena polipeptídica, i la banda amida II, procedent principalment dels grups -NH dels enllaços peptídics. b) Espectre desconvulat, utilitzant una amplada de banda de 14 cm^{-1} i un factor k (factor d'aprimament) de 2,4. Pot observar-se com aquest tractament matemàtic permet descobrir la majoria de bandes constituents de l'espectre, les quals estaven encavalcades abans d'aplicar la desconvolució.

al fet que formen un pont d'hidrogen fort, no es bescanviaran per protons del medi. Els estudis d'accessibilitat es realitzen utilitzant deuterons: en el moment en què una proteïna es posi en presència d'aigua pesada, hi haurà una sèrie de protons que es bescanviaran per deuterons. Mitjançant una espectroscòpia infraroja és possible detectar i quantificar aquest bescanvi, ja que la banda amida II conté principalment la vibració -NH . El bescanvi per deuteró (-ND) fa que la vibració corresponent es desplaci 100 cm^{-1} cap a freqüències baixes i, per tant, es pot quantificar i estudiar la cinètica de bescanvi. La figura 3 mostra els espectres d'absorció

de la MelB reconstituïda, obtinguts en presència d'aigua normal, i en presència d'aigua pesada. Pot observar-se perfectament que la banda de l'amida II ($1.500\text{-}1.600\text{ cm}^{-1}$) ha disminuït en l'espectre pres en D_2O , com a conseqüència del bescanvi d'una certa proporció de protons de la cadena polipeptídica per deuterons.

La figura 4 mostra la disposició experimental que permet realitzar aquests tipus d'experiments. Es parteix de la tècnica d'ATR (reflexió total atenuada), en què la mostra es diposita en la superfície del cristall. Tal i com es detalla en la llegenda de la figura 4, això permet realitzar el bescanvi protó-deuteró al mateix temps que es controlen els diferents paràmetres de l'experiment. Una vegada començada l'adquisició d'espectres, a un ritme d'un cada 5 minuts, es comença el bombeig de nitrogen gasós, el qual s'ha fet bombollejar per una sèrie de recipients que contenen D_2O . D'aquesta manera s'aconsegueix que el nitrogen que finalment es fa arribar a la mostra estigui saturat d'aigua pesada. Així, comença el procés de substitució dels protons accessibles de la proteïna per deuterons. Per a evitar artefactes, és important que tot el

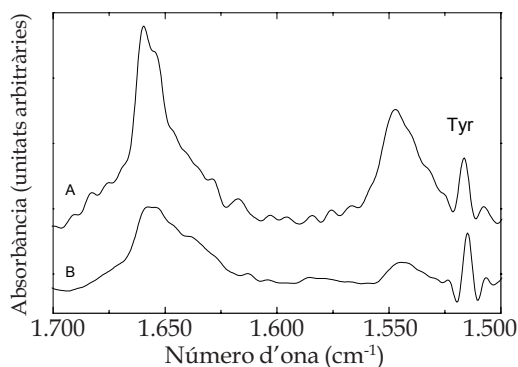


FIGURA 3. Comparació dels espectres desconvulats de MelB, obtinguts en H_2O (A) i en D_2O (B). Els espectres s'han escalat a la mateixa concentració de proteïna, tal i com es pot comprovar comparant l'àrea de la banda de tirosina a 1.517 cm^{-1} .

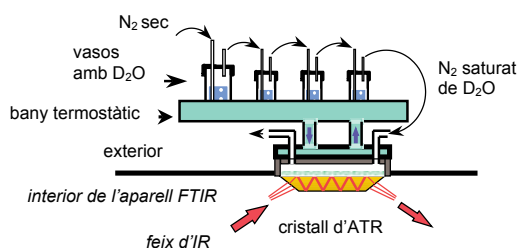


FIGURA 4. Disposició dels elements per a realitzar el bescanvi protó/deuteró. En la modalitat d'ATR (reflexió total atenuada), el feix d'infraroig incideix sobre el cristall i forma l'angle adequat perquè en la superfície es produeixi la reflexió total interna. A la superfície superior es diposita la mostra en forma de film sec. A cada reflexió, el feix d'infraroig penetra una certa distància en el film ($0,5 \mu\text{m}$, dependent de la freqüència), i se'n obté així l'espectre.

montatge es mantingui a la mateixa temperatura, i fins i tot que aquesta temperatura sigui el més semblant possible a la temperatura ambient; el més adequat és realitzar l'experiment en un laboratori mantingut amb termòstat a temperatura constant. Cal tenir en compte que l'experiment dura unes 14 h. i, si no es fes així, les oscil·lacions naturals de temperatura podrien influir en els resultats.

Una vegada obtinguts els espectres d'absorció al llarg de l'experiment de bescanvi, cal realitzar una sèrie de correccions, entre les quals podem esmentar: *a*) la correcció de la contribució dels lípids en les zones de l'amida I i amida II; *b*) la correcció per les bandes d'absorció del vapor d'aigua residual; *c*) la correcció per l'inflament del film. Aquesta darrera correcció és, segurament, la més important, i cal, doncs, comentar-la més extensament. En el moment inicial, el film és sec, però a mesura que es va hidratant amb el vapor d'aigua pesada es va inflant, i això comporta una separació de la superfície del cristall, i per tant una disminució de l'absorbència. Per a corregir aquest inflament es va normalitzar pel factor amida II/amida I. A la figura 5 es mostra la representació gràfica

de la disminució de l'àrea de l'amida II, en quatre condicions diferents, una vegada realitzades totes les correccions esmentades. Pot observar-se que en finalitzar l'experiment (és a dir, després d'un 13 h. d'haver començat l'administració de vapor d'aigua deuterada), el percentatge de bescanvi per als complexos binaris $\text{H}^+\cdot\text{MelB}$ i $\text{Na}^+\cdot\text{MelB}$ són similars, de l'ordre del 54 %. En canvi, el complex ternari $\text{Na}^+\cdot\text{mel}\cdot\text{MelB}$ mostra un bescanvi del 50 %, mentre que el complex ternari $\text{H}^+\cdot\text{mel}\cdot\text{MelB}$ mostra un 46 %. Aquests resultats indiquen que la interacció del sucre amb la permeasa induïx canvis conformacionals que protegeixen del bescanvi de protons per deuterons. Cal indicar que la interacció amb la sacarosa, un sucre que no és un substrat de la permeasa, no induïx cap variació en el bescanvi, i això demostra que l'efecte observat per la melibiosa és específic.

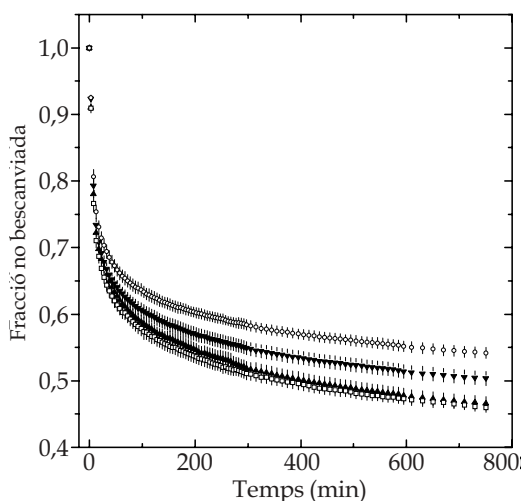


FIGURA 5. Representació de la fracció no bescanviada de l'amida II en funció del temps d'exposició al vapor d'aigua pesada, en quatre condicions diferents (tampó MES 20 mM, KCl 10 mM, pH 6,6). Els símbols corresponen a la incubació amb: (▲) sense substrats; (□) NaCl 10 mM; (○) melibiosa 5 mM; (▼) NaCl 10 mM i melibiosa 5 mM. Les barres corresponen a l'error estàndard calculat a partir de tres experiments.

Per un altre costat, la banda amida I també és sensible al bescanvi protó-deuteró, ja que les bandes d'absorció corresponents a les diferents estructures són conseqüència principalment de la vibració del grup $-C=O$, que forma pont d'hidrogen amb el grup $-NH$, o amb les molècules d'aigua del medi, en el cas d'estructures exposades al dissolvent. Naturalment, el bescanvi del protó per deuteró afectarà la vibració del grup

$-C=O$, i es produirà un desplaçament de la freqüència de vibració envers valors menors. En aquest cas, però, el desplaçament és de l'ordre d'una desena de cm^{-1} , per tant, és més difícil d'analitzar, a causa de la superposició amb bandes corresponents als grups no bescanviats. Malgrat aquesta dificultat, és possible realitzar aquests estudis si abans es fa una selecció acurada dels valors de les freqüències a les quals se segueix la variació de cada estructura. La figura 6a mostra diferències entre parelles d'espectres desconvulats: un espectre adquirit a un temps t després de l'inici del bescanvi es desconvula i se li resta l'espectre a temps zero, desconvulat. Així, aquests espectres de diferència ens indiquen a quins valors de la freqüència trobarem els canvis més importants, dins de cada zona corresponent a una estructura secundària concreta. D'aquesta manera, es poden seleccionar els següents valors de la freqüència: 1678 cm^{-1} per a seguir els canvis en els girs reversos; 1660 cm^{-1} per a les hèlixs α i estructures no ordenades, i 1626 cm^{-1} per a les estructures en làmina β . A la figura 6b es mostren els canvis d'intensitat, mesurats en aquests valors en funció del temps, a més de la variació observada a 1860 cm^{-1} , que s'utilitza com a línia base, ja que en aquesta freqüència no hi ha cap absorció. Pot observar-se com la cinètica corresponent als girs reversos (1678 cm^{-1}) és molt ràpida, mentre que la corresponent a les hèlixs més estructura no ordenada és una mica més lenta, i la corresponent a les estructures β és encara més lenta. Aquest tipus d'anàlisi, però, és especialment interessant quan es volen comparar els efectes de diferents substrats. A la figura 7 es presenten les cinètiques de deuteració corresponents als tres tipus d'estructures esmentats. S'observa que les cinètiques corresponents als girs reversos són molt semblants entre elles, mentre que les cinètiques corresponents a les estructures β presenten diferen-

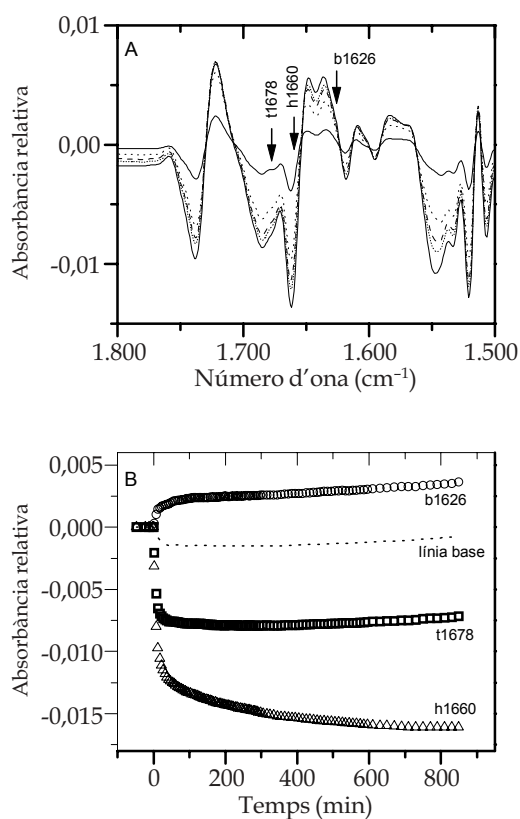


FIGURA 6. Gràfica superior a): diferència d'espectres desconvulats, corresponents a la resta d'espectres obtinguts a temps diferents després d'iniciar el flux de vapor d'aigua deuterada, i la mostra inicial (film assecat, però amb protons). Gràfica inferior b): representació de les intensitats mesurades als números d'ona indicats a la gràfica superior, en funció del temps. S'ha inclòs també la intensitat a 1860 cm^{-1} , la qual serveix com a línia base.

cies importants, i les hèlixs més estructures no ordenades tenen un comportament intermedi. En correspondència amb el comportament observat per a l'amida II (figura 5), s'observa que la incubació de la permeasa amb el sucre melibiosa proporciona una elevada protecció en el bescanvi protó/deuteró de les estructures en làmina plegada β , i la forma més bescanviada és la corresponent a la incubació amb Na^+ . Quant a les hèlixs α més estructures no ordenades, s'observa un comportament intermedi, tenint en compte que la proporció d'aquest conjunt d'estructures és majoritari en la permeasa.

Arribem, doncs, a la conclusió que la interacció del sucre melibiosa amb la per-

measa indueix un canvi conformacional en la proteïna que té com a resultat la disminució del bescanvi protó/deuteró, especialment pel que fa a les estructures β . En aquest context, és molt interessant considerar les característiques de dos llaços citoplàsmics (IV-V i X-XI). En efecte, les prediccions d'estructura secundària indiquen que ambdós llaços tenen una alta probabilitat d'adoptar estructura β i, per altra banda, s'ha demostrat que alguns residus d'aquests llaços tenen un paper destacat en el mecanisme de transport. Així, l'Arg141 en el llaç IV-V és modificada específicament per un anàleg fotoactivable de la melibiosa (Ambroise *et al.*, 2000), i si aquesta arginina és reemplaçada per un residu neutre, s'inhibeix el transport de melibiosa (Abdeldayem *et al.*, enviat a publicar). Algunes mutacions en el llaç X-XI també alteren la translocació del sucre. Per exemple, la neutralització del residu Glu365 inhibeix el transport de melibiosa (Ding i Wilson, 2000). Encara més, una anàlisi comparativa de la seqüència d'aminoàcids dels llaços hipotètics IV-V i X-XI de la permeasa d'*E. coli*, amb les seqüències homòlogues de transportadors bacterians ens revela que hi ha una sèrie d'aminoàcids molt conservats: en el llaç IV-V, trobem la seqüència (P/G)¹³²-(X)₄-D-X-R-E-R¹⁴¹ en gairebé cadascun dels transportadors analitzats (vegeu la figura 8a). Quant al llaç X-XI (figura 8b), cal notar la seqüència conservada (D³⁵¹-(X)₂-(E/D)-Y-G-(X)₆-R³⁶⁴) en aquests transportadors homòlegs (Poolman *et al.*, 1996). Aquestes dades realcen encara més la importància funcional i estructural d'aquests llaços.

A partir d'aquestes consideracions, és lícit plantejar la hipòtesi que aquests dos llaços puguin interaccionar entre ells i comportar-se com a llaços mòbils, de manera que en el mecanisme del transport anirien a raure en la zona interna del transportador, entre les hèlixs α transmembrana. De fet, en

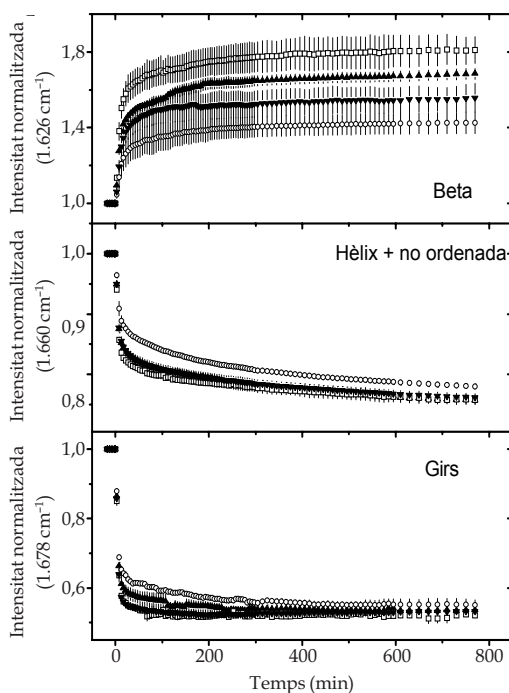


FIGURA 7. Representació de les intensitats mesurades als números d'ona indicats a l'eix vertical, en funció del temps d'exposició al vapor d'aigua deuterada, corresponents a les estructures secundàries indicades. Els símbols corresponen a la incubació amb: (▲) sense substrats; (□) NaCl 10 mM; (○) melibiosa 5 mM; (▼) NaCl 10 mM i melibiosa 5 mM.

	127	150
	
melb_ecoli	FWSLVPTITLDKREERQLVPPRF	
melb_salty	FWSLVPTITLDKREERQLVPPRF	
melb_klepn	FWSLVPTITLDKREERQLVPPRF	
melb_entae	FWSLVPTITLDKREERQLVPPRF	
lacp_staxy	YWSWLNLTHTDPREREELSVIPRF	
yagg_ecoli	YCAMPGVITADPKERHALQSWRF	
xylp_lacpe	ITSILPSLTSNPQERVTLSTIRQF	
lacy_lacde	FWAMIPALSLSREERKTSTFARV	
yicj_ecoli	YCALGGVITNDPTQRISLQSWRFV	
lacy_leula	YWGMVPAISEDSEKERGIFTSLGSF	
rafp_pedpe	FWSMLPSLTTDSREERKTATFARL	
guta_bacsu	VNSLTGRMTNSVEERTVLTTTRMI	
lacy_strtr	FWSMIPALSLSHEREKMATFARI	

a)

	347	378
	
melb_ecoli	IMVADIVDYGEYKLVRCESIAYSVQTMVVKG	
melb_salty	IMVADIVDYGEFKLNIRCESIAYSVQTMVVKG	
melb_klepn	IMVADIVDYGETMNIIRCESIAYSVQLVVKA	
melb_entae	IMVADIVDYGETMNIIRCESIAYSVQLVVKA	
yihp_ecoli	ALVSDTVEYGEWRTGVRSEGTVYTGFTFFRKV	
uidb_ecoli	---ADTVEYGEYLTGVRIEGLTYSLFSFRKC	
yjmb_bacsu	--VSDIIDYGEWKSGERKEATTYSLFNFSRKL	
yiho_ecoli	ALVSDTVDYGEWKTGIRAEQSVYTGFTFFRKI	
guta_bacsu	GMVADCVDYAEWKTGIRADGVVSSMSFINKL	
lacp_staxy	VSLADVIDYGEVFKGQRNESIITSTNTFLTKT	
ycr3_erwhe	---ADVADYGEWSQGRMDGIIIFSTFLAVLKL	
xylp_lacpe	VMLADSVDYGEWKNQVRAEGIVTSFSSSAKF	
yicj_ecoli	---SDTVDYGEWCNGKRLTGISFAGTLFVLKL	

b)

FIGURA 8. Comparació de les seqüències d'aminoàcids corresponents als llaços IV-V (a) i X-XI (b) de la permeasa de melibiosa d'*E. Coli*, amb les corresponents a proteïnes homòlogues: permeasa de melibiosa de *Salmonella typhimurium* (melb_salty), *Klebsiella pneumoniae* (melb_klepn) i *Enterobacter aerogenes* (melb_entae); permeasa de lactosa de *Staphylococcus xylosum* (lacp_staxy), *Lactobacillus delbrueckii* (lacy_lacde), *Leuconostoc lactis* (lacy_leula) i *Streptococcus thermophilus* (lacy_strtr); YAGG d'*E. coli* (yagg_ecoli), transportador de xilosa de *Lactobacillus pentosus* (xylp_lacpe), permeasa de rafinosa de *Pediococcus pentosaceus* (rafp_pedpe), YICJ d'*E. coli* (yicj_ecoli), transportador de glucitol de *Bacillus subtilis* (guta_bacsu), simporters d'*E. coli* (yihp_ecoli), (yiho_ecoli) i *Bacillus subtilis* (yjmb_bacsu), transportador de glucurònid d'*E. coli* (uidb_ecoli) i la proteïna de 29,9 kDa (ycr3_erwhe). La numeració segueix la seqüència d'aminoàcids de la permeasa de melibiosa d'*E. coli*.

alguns sistemes de transport ja ha estat descrita la presència de llaços mòbils com, per exemple, en els transportadors de glutamat (Slotboom *et al.*, 2001). En la permeasa de melibiosa el moviment d'aquests llaços podria ser un element essencial en el procés del transport, amb la interacció amb la molècula de sucre i la canalització d'aquest cap a una zona de la molècula en què l'espai entre les hèlixs tingués característiques hidrofíliques. Dintre d'aquesta hipòtesi, la següent etapa del transport seria ja l'alliberament de la molècula de sucre a l'espai intracel·lular.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat possible gràcies al finançament següent: Bio4-CT97-2119 (European Commission); Picasso 98127; BMC2000-0121 (Direcció General de Investigació, MCYT); HF1997-0239 (SEUID); BIO97-1918-CE (CICYT); i 1999SGR-0102 (Direcció General de Recerca, DURSI). N. D. i J.V. agraeixen les beques de l'European Commission (Bio4-CT97-2119). V. L. agraeix una beca de la Generalitat de Catalunya (1998-FI-00215).

BIBLIOGRAFIA

- AMBROISE, Y.; G. LEBLANC; B. ROSSEAU (2000). «Active-site-directed photolabeling of the melibiose permease of *Escherichia coli*». *Biochemistry*, núm. 39, pàg. 1338-1345.
- BASSILANA, M.; T. POURCHER; G. LEBLANC (1988). «Melibiose permease of *Escherichia coli*». *J. Biol. Chem.*, núm. 263, pàg. 9663-9667.
- BOTFIELD, M. C.; T. H. WILSON (1988). «Mutations that simultaneously alter both sugar and cation specificity in the melibiose carrier of *Escherichia coli*». *J. Biol. Chem.*, núm. 263, pàg. 12909-12915.
- BYLER, D. M.; H. SUSI (1986). «Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra». *Biopolymers*, núm. 25, pàg. 469-487.

- CORDAT, E.; G. LEBLANC; I. MUS-VETEAU (2000). «Evidence of a role of helix IV in connecting cation – and sugar-binding sites of *Escherichia coli* melibiose permease». *Biochemistry*, núm. 39, pàg. 4493-4499.
- CORDAT, E.; I. MUS-VETEAU; G. LEBLANC (1998). «Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 33198-33202.
- DAMIANO-FORANO, E.; M. BASSILANA; G. LEBLANC (1986). «Sugar binding properties of the melibiose permease in *Escherichia coli* membrane vesicles». *J. Biol. Chem.*, núm. 261, pàg. 6893-6899.
- DAVE, N.; A. TROULLIER; I. MUS-VETEAU; M. DUÑACH; G. LEBLANC; E. PADRÓS (2000). «Secondary structure components and properties of the melibiose permease from *Escherichia coli*: A Fourier transform infrared spectroscopy analysis». *Biophys. J.*, núm. 79, pàg. 747-755.
- DAVE, N.; V. A. LÓRENZ; J. VILLAVARDE; R. LEMONNIER; G. LEBLANC; E. PADRÓS (2002). «Study of amide-proton exchange of *Escherichia coli* melibiose permease by ATR-FTIR: evidence of structure modulation by substrate binding». *J. Biol. Chem.*, núm. 277, pàg. 3380-3387.
- DING, P. Z.; T. H. WILSON (2000). «Sugar recognition mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*: possible structural information concerning the arrangement of membrane-bound helices and sugar-cation recognition site». *J. Membr. Biol.*, núm. 174, pàg. 135-140.
- GWIZDEK, C.; G. LEBLANC; M. BASSILANA (1997). «Proteolytic mapping and substrate protection of the *Escherichia coli* melibiose permease». *Biochemistry*, núm. 36, pàg. 8522-8529.
- HAMA, H.; H. WILSON (1993). «Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 10060-10065.
- JOLLIET-RIANT, P.; J. P. TILLEMENT (1999). «Mechanisms of nutrient and drug transfer through the blood-brain barrier and their pharmacological changes». *Encephale*, núm. 25, pàg. 135-145.
- JURSKY, F.; N. NELSON (1999). «Developmental expression of the neurotransmitter transporter NTT4». *J. Neurosci. Res.*, núm. 55, pàg. 24-35.
- KLEPPER, J.; D. WANG; J. FISCHBARG; J. C. VERA; I. T. JARJOUR; K. R. O'DRISCOLL; D. C. DE VIVO (1999). «Defective glucose transport across brain tissue barriers: a newly recognized neurological syndrome». *Neurochem. Res.*, núm. 24, pàg. 587-594.
- MAEHREL, C.; E. CORDAT; I. MUS-VETEAU; G. LEBLANC (1998). «Structural studies of the melibiose permease of *Escherichia coli* by fluorescence resonance energy transfer». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 33192-33197.
- MUS-VETEAU, I.; G. LEBLANC (1996). «Melibiose permease of *Escherichia coli*: structural organization of co-substrate binding sites as deduced from tryptophan fluorescence analyses». *Biochemistry*, núm. 35, pàg. 12053-12060.
- MUS-VETEAU, I.; T. POURCHER; G. LEBLANC (1995). «Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy». *Biochemistry*, núm. 34, pàg. 6775-6783.
- PACHOLCZYK, T.; R. D. BLAKELY; S.G. AMARA (1991). «Expression cloning of a cocaine – and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter». *Nature*, núm. 350, pàg. 350-354.
- POOLMAN, B.; W. N. KONINGS (1993). «Secondary solute transport in bacteria». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1183, pàg. 5-39.
- POOLMAN, G. T.; J. KNOL; C. VAN DER DOES; P. J. F. HENDERSON; W.-J. LIANG; G. LEBLANC; T. POURCHER; I. MUS-VETEAU (1996). «Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins». *Mol. Microbiol.*, núm. 19, pàg. 911-922.
- POURCHER, T.; E. BIBI; R. KABACK; G. LEBLANC (1996). «Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli*». *Biochemistry*, núm. 35, pàg. 4161-4168.
- POURCHER, T.; S. LECLERCQ; G. BRANDOLIN; G. LEBLANC (1995). «Melibiose permease of *Escherichia coli*: large scale purification and evidence that H⁺, Na⁺, and Li⁺ sugar symport is catalyzed by a single polypeptide». *Biochemistry*, núm. 34, pàg. 4412-4420.
- POURCHER, T.; M. L. ZANI; G. LEBLANC (1993). «Mutagenesis of acidic residues in putative membrane spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 3209-3215.
- REIZER, J.; A. REIZER; H. S. MILTON (1994). «A functional superfamily of sodium/solute symporters». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1197, pàg. 133-166.
- SLOTBOOM, D. J.; W. N. KONINGS; J. S. LOKEMA (2001). «The structure of glutamate transporters shows channel-like features». *FEBS Lett.*, núm. 492, pàg. 183-186.
- TATE, C. G.; E. WHITELEY; M. J. BETENBAUGH (1999). «Molecular chaperones stimulate the functional expression of the cocaine-sensitive serotonin transporter». *J. Biol. Chem.*, núm. 274, pàg. 17551-17558.
- TAZEBAY, U. H.; I. L. WAPNIR; O. LEVY; O. DOHAN; L. S. ZUCKIER; Q. H. ZHAO; H. F. DENG; P. S. AMENTA; S. FINEBERG; R. G. PESTELL; N. CARRASCO (2000). «The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer». *Nat. Med.*, núm. 6, pàg. 871-878.
- UHL, G. R. (1992). «Neurotransmitter transporters (plus): a promising new gene family». *Trends Neurosci.*, núm. 15, pàg. 265-268.
- WILSON, D. M.; T. H. WILSON (1992). «Asp-51 and

Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier». *J. Bacteriol.*, núm. 174, pàg. 3083-3086.
YAZU, H.; S. SHIOTA-NIYA; T. SHIMAMOTO; H. KANAZAWA;

M. FUTAI; T. TSCUCHIYA (1984). «Nucleotide sequence of the Melb gene and characteristics of deduced aminoacid sequence of the melibiose carrier of *Escherichia coli*». *J. Biol. Chem.*, núm. 259, pàg. 4320-4326.