

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Étude de la relation structure/fonction  
de la protéine MntH d' *Escherichia coli***

par  
Pascal Courville

Thèse présentée  
pour l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury	Rolf Morosoli (INRS-IAF)
Examineur externe 1	Hervé Le Moual (Université McGill)
Examineur externe 2	Martine Raymond (Université de Montréal)
Directeur de recherche	Mathieu Cellier (INRS-IAF)

## Table des matières

Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures et tableaux .....	vi
Résumé.....	vii
Introduction .....	1
Revue de littérature.....	6
1. Importance physiologique du fer ( $Fe^{2+}$ ) et du manganèse ( $Mn^{2+}$ ).....	7
1.1 Le fer.....	7
1.2 Le manganèse.....	8
2. Les protéines membranaires intégrales .....	9
2.1 Les différents types de protéines transmembranaires.....	9
2.2 La classification universelle des systèmes de transport.....	9
2.3 Transport actif.....	10
2.3.1 Transport actif primaire.....	10
2.3.2 Transport actif secondaire .....	11
3. Les transporteurs ioniques.....	15
3.1 Transporteurs de fer.....	15
3.2 Transporteurs de manganèse.....	15
4. Utilisation d'homologues procaryotes comme modèle d'étude de leurs homologues eucaryotes .....	19
4.1 Homologues procaryotes informatifs (LeuT et CIC).....	19
4.1.1 CIC, une famille hybride de type canal et transporteur .....	19
4.1.2 La famille NSS; homologues avec différents substrats .....	23
5. Nramp eucaryote : 'prototype' et 'archétype' .....	24
5.1 Nramp 'archétype' 1 et 2.....	24
5.2 Homologues 'prototype Nramp chez la levure, Smfp.....	26
5.3 Homologues bactériens MntH.....	28
5.3.1 Caractérisation des homologues bactériens.....	28
5.3.2 L'outgroup de la famille Nramp/MntH.....	30
5.3.3 Évolution des homologues Nramp/MntH .....	31
6. Topologie transmembranaire de la famille Nramp/MntH.....	34
6.1 Conservation de séquence dans la famille Nramp/MntH .....	34
6.2 Résultats topologiques concernant les homologues Nramp/MntH .....	35
6.2.1 Homologues eucaryotes Nramp.....	35

6.2.2 Homologues procaryotes MntH.....	36
7. Modèle d'étude pour la famille Nramp/MntH .....	40
7.1 Expression fonctionnelle dans les œufs de xénope.....	40
7.1.1 Mécanisme d'action de l'homologue Nramp2.....	41
7.2 Homologues procaryotes comme modèle d'étude .....	42
7.2.1 Choix et avantage d'un modèle d'étude <i>in vivo</i> pour les homologues MntH .....	43
7.2.2 Approche pour étudier le mécanisme d'action <i>in vitro</i> .....	44
7.2.3 Introduction de cystéines par mutagénèse dirigée .....	46
8. Objectifs et Hypothèses .....	49
Partie II Articles.....	51
Article 1. Gene organizations and expression of divalent cation transporter Nramp in the protistant parasite <i>Perkinsus marinus</i> , <i>Journal of Parasitology</i> <b>90</b> 2004 .....	52
Article 2. Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton co-transport <i>in vivo</i> , <i>Biochemistry</i> <b>44</b> 2005 .....	64
Article 3. Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal ion transporters, <i>Biochemistry and Cell Biology</i> <b>84</b> 2006 .....	78
Article 4. Nramp phagocyte intracellular metal withdrawal defence, <i>Microbes and Infection</i> <b>9</b> 2007 .....	98
Article 5. Solute carrier 11 cation symport requires distinct residues in transmembrane helices 1 and 6, <i>Journal of Biological Chemistry</i> <b>283</b> 9651-9658.....	108
Discussion et conclusion.....	127
1. Choix d'un épitope pour permettre la détection et la purification d'EcoliA .....	128
2. Étude fonctionnelle des résidus correspondant à des mutations de type II entre l'outgroup et Nramp/MntH .....	128
3. Transport de type symport par EcoliA .....	129
4. Caractérisation cinétique et thermodynamique du transport via EcoliA .....	129
5. Effet des substitutions entre l'outgroup et EcoliA .....	130
6. Asymétrie du transport via EcoliA.....	132
7. Rôle du CaCl <sub>2</sub> .....	133

8. Accessibilité des substitutions cystéines aux sites spécifiques entre l'outgroup et la famille Nramp.....	134
9. Modèle 3D pour la famille Nramp/MntH basé sur LeuT.....	135
10. Problématique et perspective .....	136
Avancement des connaissances .....	138
Remerciements .....	140
Bibliographie .....	141

## Liste des abréviations

$\Delta\psi$	: potentiel de membrane
ABC	: «ATP Binding Cassette»
ADN	: acide désoxyribonucléique
AmDis	: «4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2-2' disulfonic acid»
Asn, N	: asparagine
Arg, R	: arginine
ARN	: acide ribonucléique
Asp, D	: acide aspartique
ATP	: adénosine 5'-triphosphate
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
Blam	: $\beta$ -lactamase
Ca	: calcium
Cat	: chloramphénicol acétyl transférase
CCCP	: hydrazone méta-chlorophénylique de cyanure carbonyle
Cd	: cadmium
CDF	: «Cation Diffusion Facilitator»
CIC	: «Chloride Channel»
CMI	: concentration minimale inhibitrice
Co	: cobalt
CTAB	: «Cetyltrimethyl ammonium Bromide»
Cu	: cuivre
Cys, C	: cystéine
Da	: dalton
DDM	: n-dodécyl- $\beta$ -D maltoside
DFO	: desferrioxamine
Ea	: énergie d'activation
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EGTA	: «Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid»
ExbB, D	: «excretion of colicin»
Fe <sup>2+</sup>	: fer divalent
FeoB	: «Ferrous Iron Uptake System»
FhuA	: «ferric hydroxamate uptake system»
F5M	: Fluoresceine-5-maléimide
Gaba	: gamma-aminobutyrique
GFP	: «green fluorescent protein»
Gln, Q	: glutamine
Glu, E	: acide glutamique
GTP	: guanosine 5'-triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: peroxyde d'hydrogène
HA	: hémagglutinine
Ile, I	: isoleucine
ICPMS	: «Induced couple plasma mass spectrometry»

IRE	: «Iron responsive element»
IRP	: «Iron responsive protein»
ISO	: «Inside-out vesicles»
$K_{0.5}$	: constante d'affinité
Leu, L	: leucine
LeuT	: «Leucine transporter»
Lys, K	: lysine
LacZ	: $\beta$ -galactosidase
Met, M	: méthionine
$Me^{2+}$	: métaux divalents
MEMSAT	: «membrane protein structure and topology»
$Mn^{2+}$	: manganèse divalent
Mn SOD	: «Mn-superoxide dismutase»
MntA	: «Manganese Transporter A»
MntABC(D)	: «Manganese Transporter ABC»
MntH	: transporteur de manganèse dépendant du proton
MntR	: « $Mn^{2+}$ transport repressor»
MTSES	: «2-sulfonatoethylmethane thiosulfonate»
NEM	: n-éthylmaleimide
NO	: oxyde nitrique
NOS	: «nitric oxyde synthase»
Nramp	: «Natural resistance associated macrophage protein»
NSS	: «Neurotransmitter sodium symporter»
$O_2^-$	: anion superoxyde
$O_2$	: oxygène
pH	: potentiel d'hydrogène
PhoA	: phosphatase alcaline
PMS	: Phénazine méthasulfate
RSO	: «Right side-out vesicles»
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
SitABCD	: «Salmonella Iron Transporter»
Slc 11	: «Solute carrier family 11»
Smfp	: «suppressor of mitochondrial import function»
smFRET	: «single molecule Fluorescence resonance energy transfer»
SOD	: superoxyde dismutase
STM	: segment transmembranaire
TC	: commission sur le transport
TetAB	: antiporteur de la tétracycline
TMHMM	: «transmembrane hidden markov model»
TonB	: «T-one resistance in <i>E. coli</i> »
Val, V	: valine
$V_{max}$	: vitesse maximale

**Liste des figures et tableaux**

Figure 1	Représentation des différents types de transporteur protéiques .....	13
Figure 2	Modèle du transport des sidérophores à l'aide de la protéine FhuA chez <i>E. coli</i> .....	17
Figure 3	Modèle structural des homologues CIC de type transporteur et canal .....	21
Figure 4	Modèle topologique pour la protéine MntH d' <i>E. coli</i> ....	38

## Résumé


Le fer et le manganèse sont deux métaux de transition essentiels pour la plupart des organismes cellulaires, servant principalement de cofacteurs à de multiples enzymes. Cependant, l'accumulation excessive de ces métaux peut engendrer différentes réactions cytotoxiques. Dans les cellules eucaryotes, les protéines Nramp ou Slc11 ("natural resistance-macrophage protein ou Solute carrier family 11") servent de perméases aux cations divalents comme le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{Mn}^{2+}$ . Cette famille de perméases est également présente chez les bactéries. Chez les mammifères, les homologues Nramp 1 et 2 sont impliqués dans la défense contre différents pathogènes intracellulaires et dans l'homéostasie du fer, respectivement. La caractérisation moléculaire de ces perméases représente un défi de taille de par leur nature intégralement membranaire. Très peu de données sont connues à ce jour concernant leur structure en relation avec leur fonction. Les homologues procaryotes se nomment MntH (transporteur de manganèse dépendant du proton ( $\text{H}^+$ )). Des analyses phylogénétiques détaillées ont permis de distinguer trois groupes de séquences bactériennes, MntH A, B et C, le dernier étant subdivisé en sous-groupes  $\text{Ca}$ ,  $\text{Cb}$  et  $\text{Cc}$ . Dans le cadre de ce doctorat, nous avons décidé d'étudier des résidus transmembranaires pouvant jouer un rôle critique dans le mécanisme d'action des protéines Nramp/MntH. Nous utilisons la protéine MntH d'*E. coli* (EcoliA) comme modèle car son activité est semblable aux homologues Nramp et sa topologie transmembranaire est établie. De plus, nous avons démontré pour la première fois le symport  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  *in vivo* via un homologue bactérien appartenant à la famille Nramp.

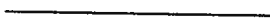
Les résidus clés ont été identifiés à l'aide d'une approche phylogénétique qui consiste à prédire les sites de divergence fonctionnelle en comparant différents groupes de séquences alignées d'homologues (outgroup et famille Nramp/MntH). Cinq sites permettent de discriminer les homologues de la famille Nramp des protéines appartenant à l'outgroup (correspondant aux résidus d'EcoliA: D34, N37, H211, N250 et N401). Chacun des résidus a été remplacé par celui présent dans l'outgroup et par d'autres résidus aux propriétés a priori dites plus conservatives. L'étude du mécanisme d'action d'EcoliA a été effectuée avec des préparations membranaires dans lesquelles la protéine



est soit dans son orientation native (RSO-Right-Side-Out), soit inversée (ISO-Inside-Out). Dans ces deux préparations, EcoliA a démontré un niveau d'activité différent vis-à-vis du transport de  $\text{Cd}^{2+}$ . Nous avons choisi d'utiliser le Cd comme substrat car il s'agit d'un substrat universel de la famille Nramp, et parce qu'il induit une forte accumulation de  $\text{H}^+$  via EcoliA. Ces préparations membranaires ont également servi pour analyser la localisation transmembranaire des sites étudiés et préalablement substitués par une cystéine dans EcoliA.

À l'aide de ces différentes techniques, nous avons démontré que les 5 résidus discriminant la famille Nramp/MntH sont tous impliqués dans le mécanisme d'action, en affectant soit le transport du  $\text{Cd}^{2+}$ , du  $\text{H}^+$  ou le changement de conformation. La caractérisation de MntH dans des vésicules RSO démontre que le  $\text{CaCl}_2$  favorise l'accumulation du  $\text{Cd}^{2+}$ . De plus, le rôle respectif et l'accessibilité des résidus correspondant à des sites de divergence de type II entre l'outgroup et la famille Nramp, sont en accord avec le modèle topologique existant et avec la structure tridimensionnelle prédite pour EcoliA, basée sur une homologie possible avec la famille de la protéine LeuT ("Leucine transporter"), dénommé "Neurotransmitter : sodium symporter".

  
Pascal Courville

  
Mathieu Cellier

## INTRODUCTION

La majorité des organismes cellulaires requiert la présence de fer et de manganèse, deux cations divalents. Ce sont deux micro-nutriments essentiels car ils agissent principalement à titre de cofacteurs redox pour de nombreuses enzymes. Du fait de leur importance, les bactéries utilisent plusieurs moyens pour acquérir et assimiler ces cations divalents. Un de ces transporteurs, découvert vers la fin des années 90, est la protéine bactérienne MntH (transporteur de manganèse dépendant du proton; (Makui *et al*, 2000) appartenant à la vaste famille Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein) également présente chez les organismes supérieurs tel les mammifères (Gruenheid *et al*, 1995; Vidal *et al*, 1993), les plantes (Belouchi *et al*, 1995) et les levures (West *et al*, 1992). L'homologue *Nramp1* est un des premiers gènes découverts appartenant à cette famille. Il code pour une protéine transmembranaire qui permet de contrôler la répllication intracellulaire de certains microbes pathogènes (par exemple *Salmonella* ou *Mycobacterium spp.*), qui résident à l'intérieur de vacuoles dans les phagocytes professionnels, en pompant les métaux divalents présents à l'intérieur du phagosome vers le cytosol (Gros *et al*, 1983; Jabado *et al*, 2000). Cependant, la protéine *Nramp2* est localisée dans la membrane de nombreux tissus périphériques et est également impliquée dans l'acquisition des métaux provenant de l'alimentation car elle est active au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin. *Nramp2* est fortement exprimée dans les cellules précurseures des érythrocytes, au niveau des reins et du cerveau. Elle est également impliquée dans l'acquisition du fer par les cellules de l'organisme via le cycle de la transferrine (Canonne-Hergaux *et al*, 2000; Canonne-Hergaux & Gros, 2002). Différentes mutations dans le gène *Nramp2* sont associées à une forme d'anémie microcytique chez la souris, le rat et chez l'humain (Courville *et al*, 2006; Fleming *et al*, 1998) tandis que l'absence du gène *Nramp1* fonctionnel augmente la susceptibilité des mammifères vis-à-vis d'une infection bactérienne telle que *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* et *Leishmonia donovani*. Chez l'homme et d'autres espèces de mammifères, les différents polymorphismes reliant les gènes *Nramp1* et *Nramp2* respectivement soit à la résistance aux infections soit au contrôle de l'homéostasie du fer impliquent donc des fonctions non-redondantes. Chez les autres organismes où des homologues ont été étudiés, les

protéines Nramp semblent toujours être impliquées dans l'homéostasie du fer ou du manganèse.

Dernièrement, un grand nombre d'homologues bactériens appartenant à la famille Nramp/MntH ont été révélés grâce aux projets de séquençage des génomes. L'étude des homologues MntH bactériens, par alignement multiple des séquences disponibles et analyses phylogénétiques a révélé trois groupes d'homologues dénommés MntH A, B et C (Cellier *et al*, 2001). Les homologues bactériens les mieux étudiés appartiennent au groupe A. Par exemple, la protéine MntH d'*Escherichia coli* (EcoliA) a été caractérisée comme étant un transporteur de cations divalents ayant une préférence pour le manganèse (Courville *et al*, 2004; Makui *et al*, 2000). L'homologue MntH chez *Bacillus subtilis* fonctionne également comme un transporteur de  $Mn^{2+}$  car il est nécessaire pour la croissance en milieu minimum en présence d'une faible concentration de manganèse (Que & Helmann, 2000).

Les travaux du Dr. Mathieu Cellier concernent particulièrement l'évolution structurelle et fonctionnelle de la famille Nramp/MntH, en utilisant comme modèle de prédilection la protéine EcoliA. Dans le but de mieux cibler les acides aminés potentiellement impliqués dans la relation structure/fonction de MntH, nous avons utilisé une approche phylogénétique qui se base sur l'évolution de la famille Nramp. En résumé, l'outgroup aurait donné naissance aux groupes B et A qui sont d'origine ancestrale tandis que le groupe C serait d'origine plus récente, probablement acquis par transfert horizontal (Cellier *et al*, 2001) à partir d'un homologue eucaryote (Richer *et al*, 2003). Les homologues eucaryotes seraient apparus suite à un évènement endosymbiotique impliquant un homologue du groupe A (Richer *et al*, 2003). Différents transferts pourraient être à l'origine de trois sous-groupes distincts ( $C\alpha$ ,  $C\beta$  et  $C\gamma$ ).

Les protéines transmembranaires constituent près de 30% des protéines connues (Booth *et al*, 2001). Elles sont impliquées dans différents aspects du fonctionnement cellulaire comme la signalisation cellulaire et le transport de nombreux solutés qui

influencent diverses fonctions physiologiques. Des altérations chez les protéines membranaires induisent diverses pathologies telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, le diabète et l'anémie (Aridor & Hannan, 2002). Les protéines transmembranaires constituent donc des cibles de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Étant donné l'implication des protéines Nramp dans diverses pathologies liées au métabolisme du fer et à l'immunité innée, il apparaît important d'identifier les résidus impliqués dans le mécanisme d'action des protéines Nramp (Slc11) et d'étudier en détail le mécanisme d'action des protéines Nramp. L'utilisation d'orthologues bactériens présente certains avantages facilitant les études de mutagenèse dirigée. L'approche utilisée pour cibler les résidus impliqués dans le co-transport de  $Me^{2+}$  et  $H^+$  est basée sur la comparaison des taux de variation à des sites spécifiques entre différents groupes de séquences homologues afin d'identifier des sites de divergence possible. Cette approche considère deux types de divergence : soit de type I, pour les sites conservés dans un groupe mais variable dans l'autre, et de type II, pour les sites conservés dans chacun des groupes mais différents entre ces groupes (Chaloupka *et al*, 2005; Knudsen *et al*, 2003; "supplementary data" 2, article 2). Nous avons choisi les mutations de type II car ce sont celles qui ont le plus de chances de correspondre à des changements structuraux ou fonctionnels survenus au cours de l'évolution des groupes considérés et qui ont pu résulter d'une pression fonctionnelle sélective subie par les différents résidus dans chacun des groupes.

Pour une meilleure caractérisation du mécanisme d'action d'EcoliA et des mutations créées aux sites de divergence de type II identifiés, nous avons caractérisé le transport des cations divalents (Mn, Fe Co et Cd) selon deux approches complémentaires, *in vivo* et *in vitro*. L'activité *in vitro* a été caractérisée à l'aide de vésicules membranaires (dépourvue de cytoplasme) où la protéine se retrouve soit dans une orientation native (Right-side-out; RSO) ou bien inversée (Inside-out; ISO). Une approche *in vitro* par fluorescence a permis de démontrer pour la première fois le co-transport de type symport du  $Me^{2+}$  et du  $H^+$  avec un homologue bactérien de la famille Nramp à l'aide d'une protéine fluorescente dite GFP ratiométrique (pHLuorin; Chaloupka *et al*, 2005). Cette variante de la GFP possède la caractéristique de réagir à la concentration ambiante en

protons qui détermine l'intensité relative d'excitation du fluorochrome à deux longueurs d'ondes distinctes (410nm, maximum à pH 8.0, et 470nm, maximum à pH 6.0).

Pour établir la localisation des résidus choisis, c'est-à-dire déterminer s'ils se trouvent dans une interface aqueuse, enfouis dans la membrane ou bien exposés du côté périplasmique ou cytoplasmique, nous avons élaboré une approche permettant d'étudier l'accessibilité des mutants cystéines vis-à-vis de réactifs sulphydryles de différentes taille, polarité et perméabilité transmembranaire.

Les résultats obtenus au cours de mes recherches sont présentés en détail dans les 5 articles situés dans la partie II de cette thèse : «Gene organizations and expression of the divalent cation transporter Nramp in the protistan parasite *Perkinsus marinus*» publié dans *Journal of Parasitology* (2004) **90**, 1004-1014, «Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton co-transport *in vivo*» publié dans *Biochemistry* (2005) **44**,726-733, «Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal ion transporters» publié dans *Biochemistry and Cell Biology* (2006) **84**, 960-978, «Nramp phagocyte intracellular metal withdrawal defence» publié dans *Microbes and Infection* (2007) **9**, 1662-1670, et «Solute carrier 11 cation symport requires distinct residues intransmembrane helices 1 and 6» publié dans *Journal of Biological Chemistry* (2008) **283**, 9651-9658.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1 Importance physiologique du fer (Fe) et du manganèse (Mn)

### 1.1 Le fer

Le fer est un micro-élément essentiel pour la très grande majorité des organismes cellulaires, autant eucaryotes que procaryotes. Il y a certaines espèces bactériennes, comme *Lactobacillus plantarum* (Byers *et al*, 1998) et *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000), qui font exception à cette règle car elles ont remplacé le Fe par le Mn. Le fer est impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction (Braun *et al*, 2001) en permettant la libération d'un électron en passant de la forme ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) au fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Le  $\text{Fe}^{3+}$ , comme le  $\text{Mn}^{3+}$ , peuvent agir en tant qu'accepteur final d'électron lors de la respiration anaérobie chez certaines bactéries. Le fer peut également agir en tant que cofacteur lors de nombreuses réactions enzymatiques incluant celle pour la synthèse d'ADN (Braun *et al*, 2001; Chasteen, 2003). Cependant, le fer libre peut aussi être nocif car, en présence d'oxygène ( $\text{O}_2$ ), il catalyse des réactions potentiellement dangereuses, comme la réaction de Fenton suivie de la réaction de Haber-Weiss, qui augmentent la concentration de radicaux oxygénés dans la cellule (réaction de Fenton :  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$ , réaction de Haber-Weiss :  $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}$ ). Les radicaux oxygénés générés peuvent causer des dommages en attaquant notamment l'ADN. De même, le fer peut agir comme cofacteur d'enzymes protectrices telles que la superoxyde dismutase ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ) et la catalase ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), qui permettent l'élimination des radicaux oxygénés nouvellement créés (Fridovich, 1978). Inversement, certaines enzymes qui génèrent de grandes quantités de radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) et l'oxyde nitrique (NO) (oxydase des phagocytes, phox et synthase d'oxyde nitrique NOS; Braun *et al*, 1998) nécessitent également la présence de fer. Lors d'une infection, l'hôte se défend notamment en séquestrant tout le fer disponible; cependant des espèces pathogènes virulentes telles que *Salmonella typhimurium* expriment différents systèmes de capture du fer de haute efficacité. Par exemple : l'opéron *sitABCD* qui code pour "Salmonella Iron Transporter", un transporteur de métaux divalents de type ABC ("ATP binding cassette"; Kehres *et al*, 2002b), le système Feo composé des protéines (FeoABC) permet d'acquérir le fer ferreux



présent dans l'environnement (Cartron *et al*, 2006), ainsi que les sidérophores qui agissent en tant que chélateurs de métaux qui facilitent l'adsorption du fer ferrique par la bactérie (Braun & Killmann, 1999). Par exemple, il a été démontré que le fer est impliqué dans la virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide d'un mutant *tonB*, dépourvu de systèmes d'acquisition de fer<sup>3+</sup> utilisant le sidérophore pyoverdine, est capable de croître dans les poumons et les muscles de souris immunosupprimés; par contre, il est incapable de causer la mort de l'animal (Takase *et al*, 2000).

Malgré leurs effets bénéfiques pour les cellules vivantes, une concentration intracellulaire trop élevée de ces métaux (fer et manganèse) peut être nocive et causer la mort cellulaire. Il est donc crucial de réguler strictement leur entrée et sortie à travers les membranes ainsi que leur emmagasinage sous une forme moins toxique. Dans le but de limiter ses effets toxiques, le fer (mais pas le Mn) est entreposé dans la cellule sous forme ferrique, couplé à la ferritine (Chasteen, 2003). Le fer se retrouve la plupart du temps dans l'hôte, couplé à des protéines possédant un groupement hème, telles que l'hémoglobine et la phagocyte oxydase. Le fer peut également se lier avec une forte affinité à des protéines de transport comme la transferrine et la lactoferrine (Bullen *et al*, 2005).

## 1.2 Le manganèse

Ce métal est un micro-élément à l'état de trace non seulement important pour les espèces *Lactobacillus* et *Borrelia* mais aussi pour la grande majorité des organismes cellulaires. Cependant, peu d'études portent sur le rôle physiologique du manganèse (Mn). Ce cation joue un important rôle dans la vie aérobie sur terre en tant que cofacteur dans le photosystème II pour l'oxydation de l'eau lors de la photosynthèse (Debus, 2000). Le manganèse peut aussi favoriser la survie des cellules car il facilite la détoxification des radicaux oxygénés en permettant la conversion de l'ion  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$ , de manière catalytique (Mn SOD ("Mn-superoxyde dismutase"), Mn peroxydase) ou selon des mécanismes encore peu connus (Archibald & Fridovich, 1982). Il semble également que le Mn pourrait jouer un rôle dans le métabolisme du carbone car la plupart

des enzymes nécessaires pour convertir les intermédiaires tels que le pyruvate, l'oxaloacétate et le phosphoglycérate sont soit dépendants ou bien stimulés en présence de ce métal (Kehres & Maguire, 2003). Dernièrement, des systèmes de transport du manganèse ont été impliqués dans la virulence de plusieurs pathogènes bactériens (Cellier *et al*, 2001). Il semble également clair que l'hôte compétitionne pour l'assimilation des métaux en limitant l'accès des pathogènes à cette ressource lors de l'infection (Jabado *et al*, 2000). Pour surmonter la toxicité reliée au Mn, les cellules ont développé plusieurs mécanismes de défense : la conversion du cation en un complexe inactif (Mn-chélateur; Culotta *et al*, 2005; Jensen *et al*, 2003), la séquestration du Mn à l'intérieur de la vacuole ou bien l'élimination de la cellule grâce à la protéine Pmr1P via la voie de sécrétion, et l'appareil de Golgi chez la levure (Culotta *et al*, 2005; Durr *et al*, 1998). Chez les bactéries, et les cellules eucaryotes le Mn peut être exporté par un membre de la famille CDF ("Cation Diffusion Facilitator")(Culotta *et al*, 2005; Montanini *et al*, 2007).

## **2. Les protéines membranaires intégrales**

### **2.1 Les différents types de protéines transmembranaires**

Les protéines transmembranaires sont classifiées en quatre groupes selon leur topologie respective, à savoir le nombre et l'orientation des segments membranaires. Les protéines de types I et II sont composées d'un seul segment transmembranaire et leur extrémité N-terminale est située soit du côté extracellulaire (Type I) ou cytoplasmique (Type II). Les protéines de type III correspondent aux protéines composées de plusieurs segments transmembranaires à l'intérieur d'une même chaîne peptidique (Singer, 1990), par exemple les protéines appartenant à la famille Nramp/MntH (Courville *et al*, 2004).

### **2.2 La classification universelle des systèmes de transport**

Le laboratoire du Dr. Saier a développé une méthode pour faciliter la classification de tous les types de transporteurs membranaires (commission sur le transport; TC transport commission; Saier, 1999). Cette classification accessible via Internet (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>) répartit les transporteurs en familles selon leur phylogénie et leur fonction. Une famille phylogénétique est définie par une famille de protéines ou les membres possèdent un taux d'identité de séquences supérieures à 30%, une fonction similaire et une structure conservée (Granseth *et al*, 2007). Certaines exceptions ont cependant pu être décelées (Saier & Winkelmann, 2001). Les membres d'une même famille d'homologues doivent également posséder un mécanisme de transport similaire. À la lumière de ces principes, la classification de Saier regroupe 4 critères hiérarchiques. Tout d'abord, les transporteurs sont classés selon le type d'énergie utilisé. Ensuite, ils sont divisés en familles reconnaissables, selon les critères qui sont propres à chacune d'elles, en troisième lieu en groupes phylogénétiquement proches et dernièrement, selon le substrat spécifique à chacune de ces familles (Saier & Winkelmann, 2001). Une superfamille de protéines comprend des homologues eucaryotes et procaryotes.

### **2.3 Transport actif**

Le transport actif de substrats nécessite des transporteurs protéiques spécifiques. Le transport actif permet de transporter le substrat contre son gradient de concentration en utilisant une source d'énergie générée par le métabolisme cellulaire. Ce type de transport peut être soit primaire ou secondaire selon la source d'énergie qu'il utilise, respectivement l'ATP ou le gradient chemiosmotique d'un ion,  $H^+$  par exemple. Ce type de transport permet soit l'influx soit l'efflux de composés très divers et incluant des molécules chargées ( $Cl^-$ ,  $Me^{2+}$ ), les acides aminés ainsi que des antibiotiques ou médicaments.

#### **2.3.1 Transport actif primaire**

Ce type de transport utilise une source d'énergie primaire pour véhiculer activement un soluté contre son gradient de concentration. La source d'énergie primaire provient souvent de l'hydrolyse des liaisons anhydrides de l'ATP ou d'un lien pyrophosphate inorganique.

L'ATP est généralement utilisé par les protéines appartenant à la superfamille ABC (ATP-binding cassette) comme les protéines FeoB ("Ferrous Iron Uptake System") ou MntABC(D) ("Manganese Transporter ABC") qui se retrouvent chez différentes espèces bactériennes et permettent le transport du fer ferreux et du manganèse, respectivement (Greie *et al*, 2001). Cependant le GTP au lieu de l'ATP pourrait être la source d'énergie utilisée par FeoB (Hantke, 2003). L'ATP est la source d'énergie la plus couramment utilisée. Une autre source d'énergie primaire est la décarboxylation d'un substrat situé du côté cytoplasmique. Comme par exemple "oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump" chez *K. pneumoniae* fait partie de la famille "sodium ion-translocating decarboxylases" qui grâce à la conversion de l'oxaloacétate en pyruvate, par l'oxaloacétate décarboxylase, permet l'échange d'ions Na<sup>+</sup> par un H<sup>+</sup> à travers la membrane (Buckel, 2001). Les cellules peuvent également utiliser l'énergie de la lumière comme les rhodopsines microbiennes, retrouvées chez les archaebactéries, les bactéries et les moisissures (Saier & Winkelmann, 2001).

### 2.3.2 Transport actif secondaire

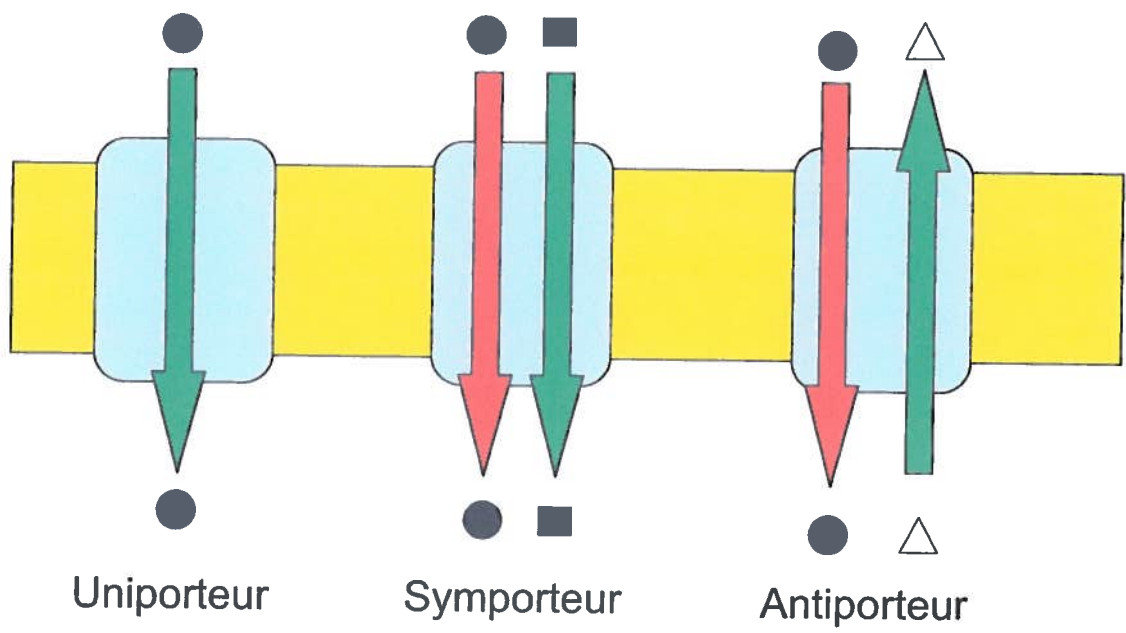
Contrairement au transport actif primaire, le transport actif secondaire est actionné par dissipation d'un gradient d'ions, car il utilise le gradient de potentiel électrochimique préétabli pour transporter le soluté (Voet and Voet, 1998). Plusieurs catégories de transporteurs sont identifiées selon leur mécanisme d'action (Figure 1).

Le premier est de type uniporteur, c'est à dire qu'il véhicule une seule substance à la fois, soit par diffusion facilitée (le transport spécifique d'une molécule selon son gradient de concentration), soit en utilisant l'énergie du potentiel membranaire (Figure 1). Les deux autres mécanismes (symporteur et antiporteur) utilisent l'énergie générée par

le transport d'un premier soluté selon son gradient de concentration pour véhiculer le substrat. Il s'agit de symporteur si les deux solutés sont véhiculés dans la même direction (MntH,  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ ) et antiporteur s'ils sont transportés dans une direction opposée (ClC transporteur,  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ; Figure 1).

MntH (Transporteur de Manganèse dépendant du Proton) est un transporteur de type symporteur qui utilise le gradient électrochimique du proton comme source d'énergie pour transporter différents cations divalents à l'intérieur de la cellule. La dépendance du transport vis-à-vis du gradient de protons peut être vérifiée en utilisant différents protonophores, comme le "carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone" (CCCP) qui dissipe le gradient des protons et rend impossible le transport actif (Makui *et al*, 2000).

**Figure 1. Représentation des différents types de transporteurs protéiques** (uniporteur, symporteur et antiporteur). Les flèches correspondent au sens du transport du soluté selon (en vert) ou contre (rouge) son gradient de concentration.



**Figure 1**

### 3. Les transporteurs ioniques

#### 3.1 Transporteurs de fer

Dans un environnement aérobie et à un pH physiologique, le fer se trouve sous forme  $\text{Fe}^{3+}$  et a tendance à précipiter et à former un polymère solide et insoluble  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (van der Helm *et al*, 2001). Pour contourner ce problème, les bactéries possèdent plusieurs moyens pour solubiliser et assimiler le fer ferrique. Un des mécanismes est de synthétiser des sidérophores qui agissent comme chélateurs de fer capables de lier l'ion ferrique avec une très haute affinité (Braun & Killmann, 1999). Le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore, ayant une masse variant entre 500 et 1,500 Dalton (Da) supérieure à la taille d'exclusion des porines de la membrane externe sera activement véhiculé à travers la membrane externe par l'entremise d'un récepteur de très haute affinité, par exemple FhuA. L'énergie nécessaire pour transloquer le complexe provient de l'association des protéines TonB, ExbB et ExbD localisées dans la membrane cytoplasmique (Figure 2; Braun *et al*, 2001). Alternativement, le fer peut être réduit à l'aide d'une ferriréductase en  $\text{Fe}^{2+}$  et diffuser librement à travers la membrane externe. Plusieurs espèces bactériennes utilisent le système codé par les gènes *feoABC* pour assimiler le  $\text{Fe}^{2+}$  à l'intérieur de la bactérie (Kammler *et al*, 1993). L'opéron SitABCD et la protéine MntH peuvent également faciliter le transport de manganèse et de fer divalent à travers la membrane interne (Kehres *et al*, 2002b; Makui *et al*, 2000).

#### 3.2 Transporteurs de manganèse

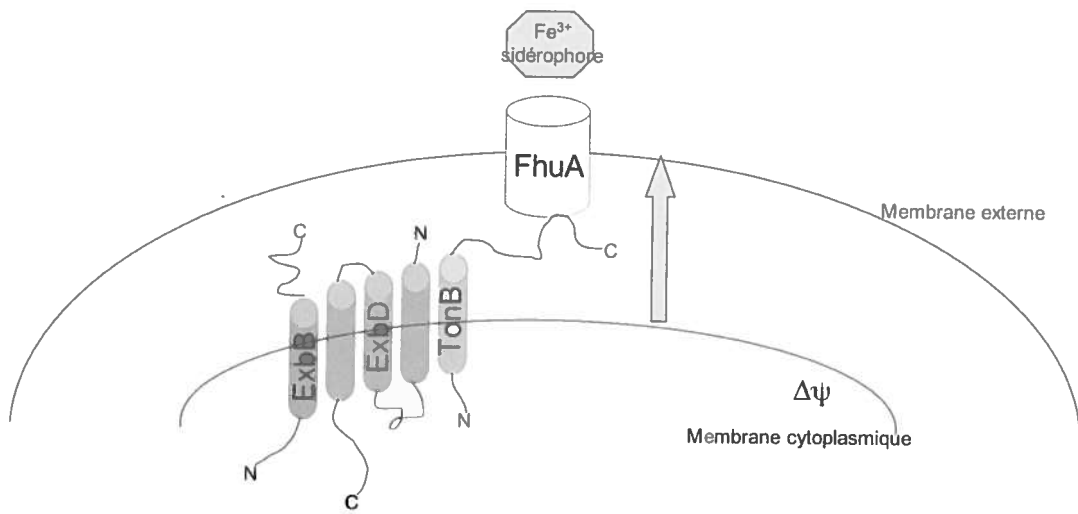
L'accumulation du manganèse se fait par l'entremise de trois grandes classes de transporteurs. Tout d'abord, la famille MntABC(D) qui fait partie de la superfamille des ATPases et constitue un sous-groupe répandu chez de nombreuses espèces bactériennes (Dintilhac *et al*, 1997). On y retrouve également les homologues appartenant à la famille Nramp (MntH) qui définissent une autre superfamille très conservée au cours de son évolution (Cellier *et al*, 1995). Ensuite, les lactobacilles possèdent également un troisième type de transporteur dénommé MntA ("Manganese Transporter A"), une



ATPase de type P (Hao *et al*, 1999), c'est à dire une pompe d'ions mue par l'ATP qui permet le transport de différents ions comme le  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Ca^{2+}$ , en oppositions aux ATPase de classe F et V qui peuvent seulement véhiculer le  $H^+$  (Pedersen, 2007). Chez *Lactobacillus plantarum*, on retrouve 5 gènes potentiellement impliqués dans le transport du manganèse (1 *mntA*, 1 *mntABCD* et 3 *mntH* du sous-groupe C $\beta$ ). La redondance en transporteurs de manganèse reflète bien la dépendance de cet organisme vis-à-vis ce métal. D'autres transporteurs doivent exister car *Helicobacter pylori* et *Vibrio cholerae* possèdent des enzymes dépendantes du Mn, mais on n'y retrouve aucun homologue des transporteurs précédemment mentionnés (Kehres & Maguire, 2003).

Récemment, le transporteur ZupT, chez *E. coli* agit principalement en tant que transporteur de Zinc pouvant également véhiculer le fer, le cobalt et le manganèse. Cependant, il constitue un transporteur de manganèse de très faible affinité, de l'ordre du mM (Grass *et al*, 2005a).

**Figure 2. Modèle du transport des sidérophores à l'aide de la protéine FhuA chez *E. coli*.** La protéine FhuA permet le transport du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore au travers de la membrane externe. Le complexe protéique ExbB, ExbD et TonB permet le transfert énergétique provenant de la membrane cytoplasmique vers la membrane externe. La flèche indique l'orientation du transfert énergétique.

**Figure 2**

#### **4. Utilisation d'homologues procaryotes comme modèle d'étude de leurs homologues eucaryotes**

La bactérie *E. coli* est couramment utilisée comme vecteur pour la surexpression et la purification de protéines transmembranaires (Wang *et al*, 2003). Elle constitue un excellent système simple, peu dispendieux et un grand nombre de vecteurs plasmidiques sont disponibles pour l'expression de protéines. *E. coli* est également utilisée pour la surexpression et la purification à grande échelle dans le but ultime d'élucider la structure tridimensionnelle par cristallographie. La très grande majorité des cristaux obtenus pour les protéines transmembranaires ont été obtenus à partir d'homologues procaryotes (Abramson *et al*, 2004; Jiang *et al*, 2002; Yamashita *et al*, 2005).

##### **4.1 Homologues procaryotes informatifs (LeuT et CIC)**

Les homologues procaryotes et eucaryotes à l'intérieur d'une famille (ou même entre familles) semblent posséder une structure similaire (Beuming *et al*, 2006; Kasho *et al*, 2006; Miller, 2006). L'obtention par cristallographie des structures d'homologues procaryotes, EcCIC (*S. typhimurium* et *E. coli*; Dutzler *et al*, 2002) et LeuT (Yamashita *et al*, 2005) appartenant respectivement aux familles protéiques CIC ("Chloride Channel") et NSS ("Neurotransmitter Na<sup>+</sup> Symporters"), ont grandement facilité la compréhension du mécanisme d'action de protéines appartenant à ces familles.

##### **4.1.1 CIC, une famille hybride de type canal et transporteur**

La famille CIC est présente autant chez les eucaryotes que chez les procaryotes et ses membres sont impliqués dans le transport d'ions chlore (Cl<sup>-</sup>) à travers la membrane cellulaire. Cette superfamille est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le transport du sel, l'acidification intracellulaire et le potentiel musculaire au repos (Dutzler, 2006). Il était généralement admis que la famille CIC formait un groupe de protéines membranaires de type canal. Cependant, à la grande surprise des chercheurs, il a été récemment démontré que certains homologues procaryotes et eucaryotes agissent en tant que transporteur de type antiporteur permettant l'échange de Cl<sup>-</sup> et de H<sup>+</sup> dans des

directions opposées (Accardi & Miller, 2004; Picollo & Pusch, 2005). C'est la première fois que des protéines de type transporteurs et canaux possédant des structures très similaires coexistent à l'intérieur d'une même famille (Gadsby, 2004). Malgré cette différence, les homologues possèdent une structure conservée qui consiste en une portion transmembranaire et un sous-domaine cytoplasmique (Dutzler, 2006).

La structure obtenue par cristallographie grâce à deux homologues bactériens de la famille EcCIC, a permis de démontrer que la protéine est composée de deux pores identiques constitués à l'intérieur de la portion membranaire qui est présente sous forme d'homodimère d'orientation opposée (Dutzler *et al*, 2002). Cette architecture antiparallèle permet de définir un filtre de sélectivité (Figure 3). Cependant, les différences structurales et de mécanisme d'action entre les transporteurs et canaux CIC demeurent encore un mystère.

De par le fait que les membres de la famille CIC possèdent une structure et des propriétés de liaison au Cl<sup>-</sup> similaires (Kuang *et al*, 2007) entre homologues procaryotes et eucaryotes, l'homologue d'*E. coli* (EcCIC) semble donc un excellent modèle pour les homologues eucaryotes.

**Figure 3. Modèle structural des homologues CIC de type transporteur et canal.** L'acide aminé Glu<sub>cx</sub>, situé du côté extracellulaire agit comme barrière lorsque le canal et le transporteur sont en position fermée (en rouge), filtre de sélectivité. En présence d'une concentration élevée d'ion Cl<sup>-</sup>, de H<sup>+</sup>, ou en réponse à la dépolarisation de la membrane, Glu<sub>cx</sub> (en vert) subit un changement de conformation pour ouvrir le canal, permettant à un ion Cl<sup>-</sup> de venir se fixer à l'endroit où était située la chaîne latérale de Glu<sub>cx</sub>. Sur le côté intracellulaire, un autre résidu glutamate (Glu<sub>in</sub>) qui est présent uniquement chez les homologues de type transporteur (une valine invariante est présente chez les homologues de type canaux). Une substitution à cette position élimine le transport du H<sup>+</sup>. Les flèches indiquent l'orientation du transport du Cl<sup>-</sup> et du H<sup>+</sup> (Dutzler, 2006).

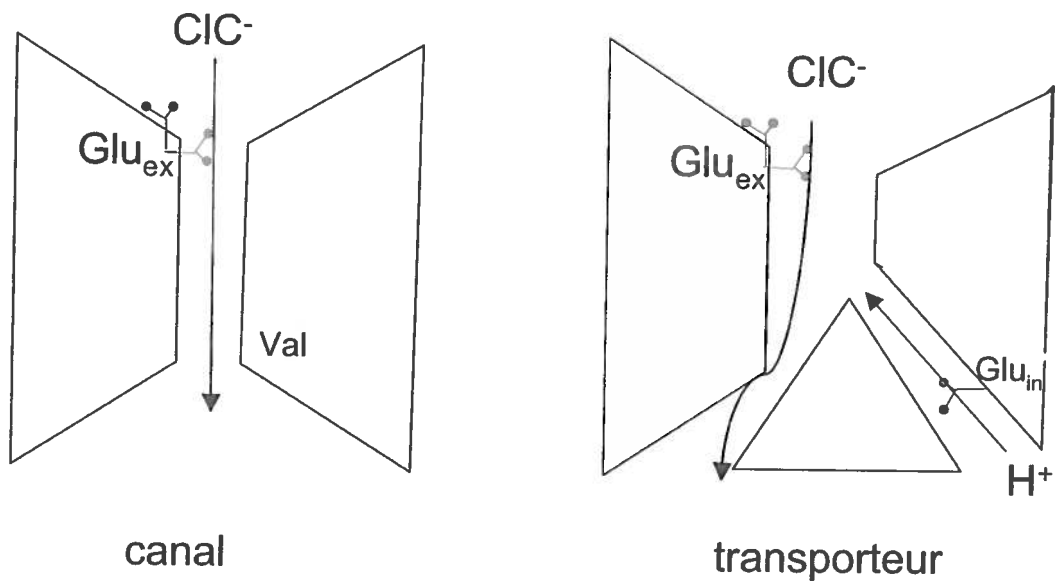


Figure 3 (adaptée de Miller 2006).

#### 4.1.2 La famille NSS; homologues avec différents substrats

La découverte par cristallographie de la structure d'un transporteur bactérien a facilité la compréhension du mécanisme d'action des homologues de la famille NSS ("Neurotransmitter Na<sup>+</sup> Symporter") qui sont présents chez les organismes eucaryotes et procaryotes. Les homologues eucaryotes constituent un groupe de transporteurs responsables de la terminaison des neurotransmissions en permettant le transport de différents neurotransmetteurs comme par exemple la dopamine, la norépinéphrine, la sérotonine et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA; Beuming *et al*, 2006). Le mauvais fonctionnement de ces transporteurs est impliqué dans de nombreuses maladies telles que l'autisme, la dépression et la fibrose kystique, ce qui en fait des cibles de choix pour la pharmacothérapie (Quick & Javitch, 2007). Les homologues bactériens tels que TnaT (*Symbiobacterium thermophilum*), LeuT (*Aquifex Aeolicus*) et Tyt1 (*Fusobacterium nucleatum*) sont respectivement responsables de l'accumulation des acides aminés tryptophane, leucine et tyrosine (Androutsellis-Theotokis *et al*, 2003; Quick & Javitch, 2007; Quick *et al*, 2006; Yamashita *et al*, 2005).

L'obtention récente de la structure 3D de l'homologue bactérien LeuT a permis de montrer que le site de liaison de la leucine et de l'ion sodium sont définis par deux segments transmembranaires sous forme d'hélices alpha partiellement discontinus en leur centre (Dodd & Christie, 2007). Ce type d'hélice discontinues semble couramment impliqué dans le mécanisme d'action de différents transporteurs tels que CIC, NhaA et LeuT (Screpanti & Hunte, 2007). Cependant, l'orientation et l'arrangement des hélices discontinues diffèrent entre ces protéines. Elles peuvent soit se croiser (NhaA), être parallèles l'une à l'autre (LeuT) ou bien former un motif de type "hairpin" (CIC; Screpanti & Hunte, 2007). La structure de LeuT a également servi comme modèle pour la modélisation d'homologues eucaryotes comme SERT (Transporteur de sérotonine; Ravna *et al*, 2006). De plus, la structure a permis de révéler le site de liaison d'un médicament de type antidépresseur (Singh *et al*, 2007). Le groupe du Dr. Christie a démontré que la combinaison de mutations à quatre positions, déterminées selon le modèle LeuT, a permis de transformer un homologue NSS qui est responsable du



transport de la créatine en transporteur de l'acide gamma-aminobutyrique (Dodd & Christie, 2007).

Les exemples mentionnés démontrent clairement qu'un homologue procaryote peut servir d'excellent modèle pour étudier le mécanisme d'action des protéines transmembranaires correspondant à des homologues eucaryotes. Cependant seulement 15% des familles eucaryotes possèdent des homologues bactériens (Granseth *et al*). Étant donné que les homologues de la famille Nramp démontrent une topologie transmembranaire et une fonction conservée avec leurs homologues bactériens, nous croyons que la protéine MntH d'*E. coli* pourrait servir d'excellent modèle pour les homologues eucaryotes afin d'approfondir les connaissances sur le mécanisme d'action ainsi que sur la relation structure/fonction des protéines Nramp/MntH.

## 5 Nramp eucaryote : 'prototype' et 'archétype'

### 5.1 Nramp 'archétype' 1 et 2

Le gène *Nramp* ("Natural Resistance Associated Macrophage protein") ou nouvellement dénommé Slc11 ("Solute Carrier family 11") a été découvert par clonage positionnel du locus *Bcg/Lsh/Ity* (Vidal *et al*, 1993). Initialement, le gène *Nramp* désignait un facteur permettant de limiter la réplication intracellulaire de certains pathogènes pouvant résider à l'intérieur des vacuoles (par exemple *Salmonella* ou *Mycobacterium spp.* (Gros *et al*, 1983). L'activité du gène *Nramp1* est démontrée par son effet sur la réplication microbienne intracellulaire durant la phase initiale de l'infection. Cette dernière est uniquement contrôlée en présence du gène fonctionnel. L'expression de différents homologues de la famille Nramp comme les protéines de rat DMT1 (Nramp2; Fleming *et al*, 1998) et de levure Smf1p (West *et al*, 1992) dans des œufs de xénope, a permis de démontrer des fonctions similaires (Gunshin *et al*, 2007). C'est à dire que les homologues Nramp agissent en tant que transporteurs secondaires de type symporteur

facilitant le co-transport d'ion métallique divalent ( $\text{Me}^{2+}$ ) et de  $\text{H}^+$  dans la même direction en utilisant l'énergie du gradient électrochimique du proton (Chen *et al*, 1999).

Pour la protéine Nramp1, une controverse existe sur le sens du transport des métaux à travers la membrane phagosomale via ce transporteur. Certaines études indiquent que Nramp1 évacue les cations du phagosome privant ainsi les bactéries de ces éléments nutritifs (Jabado *et al*, 2000). Tandis que d'autres laboratoires proposent que Nramp1 pourrait favoriser l'accumulation des métaux à l'intérieur du phagosome dans le but de faciliter la réaction de Fenton pour ainsi permettre l'élimination des bactéries pathogènes (Blackwell *et al*, 2001; Kuhn *et al*, 2001). Cette opposition suggère des mécanismes d'action très différents : soit que Nramp1 possède une topologie inversée (Kuhn *et al*, 2001) ou bien qu'elle fonctionne en tant qu'antiporteur (transport du  $\text{Me}^{2+}$  et  $\text{H}^+$  dans des directions opposées; Blackwell *et al*, 2001). Malgré ces hypothèses divergentes, la très grande majorité des études sont en accord avec le fait que différents polymorphismes du gène *Nramp1* augmentent la susceptibilité de l'hôte vis-à-vis l'infection (Courville *et al*, 2006). Des nouvelles études tendent à valider la première hypothèse. Ce mécanisme de symport  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  est également impliqué dans le rôle joué par Nramp2 dans l'homéostasie du fer chez les mammifères (Fleming *et al*, 1998) ainsi que les rôles démontrés des protéines Nramp 'prototypes' Smf1-3p dans l'homéostasie du  $\text{Fe}^{2+}$  et du  $\text{Mn}^{2+}$  chez la levure (Portnoy *et al*, 2000).

Le second gène appartenant à la famille Nramp découvert chez les mammifères est Nramp2 (DCT1, DMT1 ou Slc11A2). Contrairement à Nramp1 qui a été détecté spécifiquement dans les membranes du phagosome des phagocytes, Nramp2 est actif au niveau de l'intestin grêle (duodénum) où le niveau d'expression est régulé de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Gruenheid *et al*, 1997; Hentze *et al*, 2004). Différentes isoformes de Nramp2 peuvent être produites par épissage alternatif aux extrémités 5' et/ou 3' (Mackenzie *et al*, 2007). L'isoforme 1 (*Nramp2-1*) est régulée par la quantité de fer disponible et par la liaison d'IRP ("Iron responsive protein") en son extrémité 3' à la séquence IRE ("Iron responsive element"). Cette liaison a comme effet de stabiliser l'ARNm et régule à la hausse l'expression de la protéine Nramp2 au niveau

du rein (Canonne-Hergaux & Gros, 2002) et également dans la membrane apicale des cellules de l'intestin grêle (duodénum). Cette fonction est indépendante de la transferrine (Canonne-Hergaux *et al*, 1999); l'isoforme *Nramp2-II* est par contre impliquée dans le cycle de la transferrine qui permet l'absorption du fer ferreux par les tissus périphériques. *Nramp2* est alors actif au niveau de la membrane plasmique et de l'endosome, facilitant ainsi l'acquisition du fer dépendant de la transferrine. La présence de mutations dans la protéine *Nramp2* est associée à une forme d'anémie (anémie microcytique) chez la souris, chez le rat et chez l'homme (Courville *et al*, 2006; Fleming *et al*, 1998).

Chez l'agent étiologique de la maladie "Dermo de l'huitre", *Perkinsus marinus*, le groupe du Dr. Vasta a démontré la présence d'un homologue *Nramp* 'archétype'. L'expression de cet homologue est modulée selon la disponibilité du fer, indiquant un rôle possible lors de l'infection des mollusques par ce parasite (Robledo *et al*, 2004; Article 1).

## 5.2 Homologues 'prototype' *Nramp* chez la levure, *Smfp*

Des membres de la famille *Nramp* ont également été caractérisés chez d'autres mammifères (Cellier *et al*, 1994), des invertébrés (Cellier *et al*, 1995) et chez les plantes (Belouchi *et al*, 1995), où ils participent également au métabolisme des cations divalents. Chez la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, on retrouve 3 homologues appartenant à la famille *Nramp* (West *et al*, 1992). Leur dénomination *Smf1p*, *Smf2p* et *Smf3p*, vient du fait que la surexpression de *Smf1-2p*, ou bien l'ajout de Mn, permet d'éliminer le défaut associé à *mif1p* ("suppressor of mif1"); *Mif1p* est une peptidase mitochondriale impliquée dans l'importation des protéines à l'intérieur de la mitochondrie. West *et al*. pensaient donc que *Smf1p* et *Smf2p* correspondaient à des facteurs impliqués dans la translocation des protéines dans la mitochondrie (West *et al*, 1992). Cependant, le groupe du Dr. N. Nelson travaillant à caractériser les gènes de levure permettant de résister à l'appauvrissement du milieu en présence du chélateur EGTA a démontré que *Smf1p* et *Smf2p*, qui sont fortement apparentés, sont des

transporteurs de manganèse de haute affinité (Nelson, 1999). Le troisième homologue Smf3p, qui montre un taux d'identité de 50% avec Smf1p et Smf2p, semble plutôt être impliqué dans l'homéostasie du fer chez la levure (Luk *et al*, 2004; Portnoy *et al*, 2000).

Smf1p, est un transporteur de cations divalents dépendant de la force proton motrice ayant comme substrat préférentiel le manganèse. Cependant, il peut également véhiculer le fer, le zinc, le cadmium et le cuivre (Liu *et al*, 1997). Cette protéine se retrouve au niveau de la surface cellulaire. L'élimination du gène chromosomique a un effet marginal; ce qui indique que Smf1p n'est pas le seul transporteur de manganèse dans les conditions normales. Les mutants de *smf1p* sont très sensibles à la présence du chélateur de métaux EGTA, principalement en période de stress oxydatif (Supek *et al*, 1996). Il est possible d'y remédier en supplémentant le milieu avec du manganèse, qui peut agir comme anti-oxydant.

Contrairement à Smf1p, Smf2p est présente dans la membrane de vésicules intracellulaires permettant l'approvisionnement en manganèse et sa distribution dans la cellule. Le manganèse peut agir à titre de cofacteur de l'enzyme superoxyde dismutase 2 (SOD2) retrouvée dans la mitochondrie et de l'invertase, enzyme impliquée dans la glycosylation à l'intérieur de l'appareil de Golgi (Rudolph *et al*, 1989). Ces deux homologues sont régulés de façon post-traductionnelle en fonction de l'accessibilité du manganèse. Lorsque la cellule trouve suffisamment de manganèse, Smf1p et Smf2p sont reconnues par Bsd2p qui les dirige vers la vacuole pour y être dégradées (Liu *et al*, 1997; Portnoy *et al*, 2000). Cependant, lorsque la quantité de Mn est limitante, Bsd2p est incapable de reconnaître Smf1-2p, ce qui leur permet d'être dirigées vers leurs compartiments respectifs. Cependant, des mutations chez Smf1-2p qui limitent l'accumulation du Mn empêchent le transporteur d'être reconnu par Bsd2p (Luk *et al*, 2004).

Le dernier homologue Nramp chez la levure, Smf3p, qui possède près de 50% d'homologie avec les autres Smfp semble être impliqué dans l'homéostasie du fer

emmagasiné à l'intérieur de la vacuole. Smf3p est localisée dans la membrane vacuolaire chez la levure. Contrairement à Smf1p et Smf2p qui sont régulés par Bsd2p de manière post-traductionnelle, *smf3p* est plutôt régulé de façon transcriptionnelle au niveau de l'ARNm. Elle est régulée distinctement par trois éléments différents. Premièrement, *smf3p* est sous contrôle du fer grâce au facteur de transcription Aft1p (Rutherford *et al*, 2001), et deuxièmement par l'intermédiaire d'une autre régulation, indépendante de Aft1p (Portnoy *et al*, 2002). Troisièmement, l'expression de *smf3p* est également régulée par l'oxygène. Smf3p est exprimée lorsque la levure se trouve en condition anaérobie; cette régulation implique le répresseur Rox1p (Kastaniotis & Zitomer, 2000). La double régulation de *smf3p* par le fer et l'oxygène permet donc à la cellule de limiter les effets néfastes de ce métal en condition aérobie afin de maximiser la mobilisation du fer intracellulaire stocké à l'intérieur de la vacuole (Soborg *et al*, 2002). Le double mutant *smf1p* et *smf2p* est utilisé comme souche permettant de tester la fonction de différents homologues Nramp, autant bactériens qu'eucaryotes, afin de déterminer s'ils peuvent supprimer la sensibilité à l'EGTA. *Nramp2* a permis de compléter ce double mutant mais pas *Nramp1* (Pinner *et al*, 1997). Il a été démontré par le groupe du Dr. Nelson que l'expression de l'homologue Nramp chez la bactérie *Mycobacterium leprae* est également capable de compléter le triple mutant *smf1p*, *smf2p* et *smf3p* chez la levure (Reeve *et al*, 2002). La complémentation des doubles mutants *smf1-2p* a été utilisée pour isoler des homologues chez les plantes (Curie *et al*; Thomine *et al*, 2004). Ceci démontre la grande conservation fonctionnelle de la famille Nramp à travers l'évolution.

### 5.3 Homologues bactériens MntH

#### 5.3.1 Caractérisation des homologues bactériens

Depuis la réalisation des différents projets de séquençage génomique, un nombre important d'homologues bactériens appartenant à la famille Nramp a été découvert; on les dénomme MntH (Transporteur de Manganèse dépendant du Proton (H<sup>+</sup>)). Des

homologues bactériens ont été caractérisés chez plusieurs organismes autant Gram positive que Gram négative (Cellier *et al*, 2001). La plupart des homologues caractérisés appartiennent au groupe A tels que la protéine MntH d'*E. coli* (EcoliA) qui est la plus étudiée parmi les homologues bactériens. EcoliA a démontré une activité de transporteur, de type symporteur ( $\text{Me}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) qui utilise l'énergie du gradient électrochimique du proton pour permettre l'accumulation des cations divalents contre leur gradient de concentration. EcoliA permet le passage de plusieurs métaux tel le manganèse, le fer, le cobalt, le cuivre, le zinc et le cadmium (Makui *et al*, 2000). Ce dernier est un substrat universel pour tous les homologues Nramp/MntH. Cependant, le manganèse est son substrat préférentiel avec un  $K_M$  de l'ordre de  $1\mu\text{M}$  (Canonne-Hergaux & Gros, 2002; Kehres *et al*, 2000; article 5). Le gène *mntH* d'*E. coli* est réprimé par la protéine Fur ("ferric uptake regulator") et par MntR ("Mn<sup>2+</sup> transport repressor") en présence de fer et de manganèse, respectivement (Patzner & Hantke, 2001).

L'homologue MntH du groupe A présent chez *Bacillus subtilis* (BsubA), est également un transporteur de manganèse dépendant du proton ( $\text{H}^+$ ) nécessaire pour la croissance en milieu minimum. L'ajout de manganèse au milieu minimum permet de compléter la perte du gène. BsubA confère également une sensibilité au cadmium et est nécessaire pour la résistance au peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tout comme son homologue EcoliA, *bsubA* est réprimé en présence de manganèse par MntR (Helmann *et al*, 2004; Que & Helmann, 2000). La protéine de *Mycobacterium tuberculosis*, qui facilite également le transport de certains cations (Agranoff *et al*, 1999), ne semble pas jouer un rôle important dans la virulence de cette espèce (Domenech *et al*, 2002). Cependant un rôle dans la dernière phase de la tuberculose pulmonaire n'est pas exclu (Domenech *et al*, 2002).

Chez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, l'homologue MntH (StyA) joue également le rôle de transporteur de manganèse dépendant du proton et est nécessaire pour la résistance au peroxyde d'hydrogène. Il est régulé par les métaux de la même manière que EcoliA, cependant le rôle d'un troisième régulateur, l'activateur OxyR

répondant au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a également été démontré (Kehres *et al*, 2002a; Kehres *et al*, 2000). Le rôle physiologique des transporteurs de fer et de manganèse chez *S. typhimurium* n'est pas encore totalement compris. Un rôle majeur de StyA dans la virulence de *S. typhimurium in vivo* n'a pas encore été démontré, bien que cela soit déjà le cas pour SitABCD et que le fer et le manganèse soient essentiels à la pathogenèse de cette bactérie (Boyer *et al*, 2002; Zaharik *et al*, 2004).

Chez *Staphylococcus aureus* l'homologue MntH fait partie du sous-groupe C $\beta$  (SaurC $\beta$ ). Contrairement aux homologues précédents qui font partie du groupe A, *saurC $\beta$*  serait régulé positivement par MntR. Cette différence au niveau de la régulation des gènes pourrait s'expliquer soit par le fait que *saurC $\beta$*  soit éloigné et distinct de *bsubA* ou qu'il ait été acquis par transfert horizontal à partir d'un homologue eucaryote (Cellier *et al*, 2001; Helmann *et al*, 2004). SaurC $\beta$  est également impliquée dans la virulence de *S. aureus* conjointement avec un autre transporteur de manganèse, MntABC(D), homologue de SitABCD (Horsburgh *et al*, 2002).

Des homologues MntH du groupe A se sont révélés être des transporteurs de fer et de manganèse chez les espèces *Yersinia pestis* (Perry *et al*, 2007) et *Shigella flexneri* (Runyen-Janecky *et al*, 2006). Peu d'études portent sur les homologues du groupe B, cependant des études effectuées dans le laboratoire du Dr. Cellier, sur les homologues présents chez les espèces *Chlorobium tepidum* et *Clostridium acetobutylicum* (Richer *et al*, 2003), semblent indiquer qu'ils sont également impliqués dans le transport de cations divalents tel le fer, le cobalt et le cadmium (Richer *et al*, 2003). À ce jour, très peu de séquences correspondant aux gènes *mntH* ont pu être identifiées chez les archaebactéries (ex. *Haloferax volcanii*, *Pyromaculum calidifontis* et *Pyromaculum arsenaticum*).

### 5.3.2 L'outgroup de la famille Nramp/MntH

L'outgroup de la famille MntH/Nramp comprend les séquences qui sont les plus similaires à la famille MntH/Nramp mais sans en faire partie ("supplementary data" 1 et

2 de l'article 2). Les séquences appartenant à l'outgroup démontrent entre 25 et 30% d'identité avec les représentants de la famille Nramp/MntH, ce qui est en dessous du seuil généralement accepté (30%) pour appartenir à une famille de protéines membranaires (Granseth *et al*, 2007). Le profil d'hydrophobicité déduit des séquences de l'outgroup et l'utilisation de plusieurs algorithmes permettant de prédire la topologie transmembranaire et les structures secondaires indiquent que les protéines de l'outgroup possèdent 11 segments transmembranaires, qui semblent correspondre aux régions les plus conservées des homologues Nramp/MntH. Cependant aucune donnée fonctionnelle n'existe pour ce groupe de protéines. Une partie de mon travail a consisté à prouver expérimentalement que l'outgroup diffère fonctionnellement de la famille Nramp, en démontrant que la substitution de 5 résidus spécifiques de la famille Nramp par les résidus correspondants de l'outgroup affecte la fonction de transport via *EcoliA*. L'absence des résidus clés pour le transport via les homologues MntH/Nramp indique que les membres de l'outgroup sont donc bien à l'extérieur de la famille MntH/Nramp du point de vue fonctionnel.

### 5.3.3 Évolution des homologues Nramp/MntH

Les projets de séquençage génomique (procaryotes et eucaryotes) ont permis d'identifier et séparer les homologues Nramp/MntH en différents groupes dénommés MntH-A, B, C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ , Nramp 'archétype' et 'prototype'. Le fait qu'une analyse phylogénique basée sur les séquences MntH A soit en accord avec la phylogénie déduite de l'analyse des séquences d'ARN 16S, ou de l'analyse des génomes complets, suggère fortement qu'un gène *mntH* A serait apparu avant la séparation des espèces bactériennes en Gram positive et Gram négative (environ 3 milliards d'années). Les homologues du groupe MntH B sont les plus éloignées du reste de la famille Nramp et sont plus apparentés à l'outgroup, leur origine semble être plus ancienne (jusqu'à 3.5 milliards d'années). Il est donc probable qu'un gène *mntH* A ait donné naissance aux gènes *Nramp* eucaryotes ('prototype', 'archétype'; Richer *et al*, 2003).



Dernièrement, une analyse phylogénétique approfondie, incluant des gènes issus du séquençage génomique de différentes espèces eucaryotes a permis de démontrer que les homologues eucaryotes sont séparés en deux groupes paralogues dénommés 'prototype' et 'archétype'. Les données indiquent que cette divergence résulte de la duplication d'un gène avant la divergence des règnes des Fungi et Animalia (2.5 milliards années (Richer *et al*, 2004). Les Nramp 'prototype' (homologues Smf1-3p de la levure) correspondent à des protéines qui sont plus similaires entre elles et avec leurs homologues bactériens (MntH) qu'avec le groupe des Nramp 'archétype'. La divergence des gènes 'archétype' fût accompagnée de l'insertion d'un intron en amont du premier segment transmembranaire qui est conservé chez les homologues humains et de la drosophile (Richer *et al*, 2004). Les Nramp 'archétypes' se retrouvent majoritairement chez les plantes, les mammifères et les levures; les vertébrés n'ont conservé que les Nramp 'archétype'.

Les protéines MntH appartenant au groupe C montrent une plus grande similarité aux protéines Nramp eucaryotes 'prototypes' qu'aux protéines bactériennes MntH B et A. De plus, des analyses phylogéniques déduites d'analyses avec les ARN16S basées sur les séquences du groupe MntH C sont en désaccord avec la phylogénie connue des espèces bactériennes dont elles dérivent, ce qui indique la possibilité de transferts horizontaux de gènes *mntH* C entre espèces éloignées. On distingue les homologues du groupe C en 3 sous-groupes dénommés MntH-C $\alpha$ , C $\beta$  et C $\gamma$  (Cellier *et al*, 2001; Richer *et al*, 2003). Plusieurs séquences se retrouvant dans le sous-groupe C $\alpha$  démontrent une très forte conservation avec des protéines eucaryotes, suggérant la possibilité d'un transfert horizontal de gène *Nramp* 'prototype' vers un génome bactérien (Richer *et al*, 2003). Chez les homologues du sous-groupe C $\beta$  on retrouve principalement des bactéries à Gram positive (un faible contenu en G+C) comme les Staphylococcaceae et les bactéries lactiques. Ce sous-groupe inclut cependant la séquence d'une entérobactérie qui est un endosymbionte obligatoire, possédant également un génome riche en nucléotides AT. Le sous-groupe C $\gamma$  est le plus hétérogène des groupes C et de plus, il présente des similarités avec des homologues autant du groupe C $\alpha$  que du groupe A.

À l'intérieur d'une même espèce bactérienne, on peut retrouver jusqu'à 3 gènes *mntH* appartenant à un ou deux groupes ou sous-groupes, comme par exemple un gène du groupe A et un du groupe C $\gamma$ . Ce qui suggère qu'au cours de l'évolution, une espèce bactérienne pourrait avoir acquis ces gènes soit par duplication ou bien possédait déjà dans son bagage génétique un gène et aurait acquis le second par transfert horizontal. Il est possible que cette évolution complexe corresponde à une différence au niveau du mécanisme d'action ou bien à leur régulation comme c'est le cas entre *bsubA* et *saurC $\beta$*  qui sont régulés de façon différente par MntR.

Plusieurs hypothèses sur l'évolution des homologues Nramp/MntH sont proposées. Initialement, l'outgroup aurait donné naissance aux homologues du groupe MntH B qui seraient apparus dans des bactéries de type anaérobies, lorsque l'atmosphère contenait très peu d'oxygène. Par la suite, MntH A serait apparu dans des bactéries aérobies avant l'émergence des bactéries Gram positive et Gram négative, dans un environnement adéquat pour leur développement il y a environ 3 milliard d'années. Et puis, à partir d'un événement endosymbiotique, les eucaryotes auraient acquis un gène du groupe A pour donner naissance au Nramp 'prototype'. Chez les eucaryotes, il y a eu duplication du gène ancestral générant les Nramp 'prototype' et 'archétype' et ce, avant la séparation des plantes, animaux et mycetoza (*Dictyostelium discoideum*). Enfin, un Nramp 'prototype' pourrait avoir donné naissance à un gène du groupe MntH C par transfert horizontal et les différents sous groupes de MntH C pourraient découler de différents transferts à partir d'un ancêtre commun (Richer *et al*, 2003).

Une analyse des taux de substitution d'acides aminés à des sites spécifiques selon le paramètre alpha, permet de démontrer si les groupes sont d'origines anciennes ou récentes des groupes étudiés; le paramètre  $\alpha$  indique le taux de variations entre les groupes, plus ce dernier est élevé, plus l'origine peut être ancienne (Gu & Zhang, 1997). Cette analyse valide cette hypothèse car les homologues MntH A ( $\alpha=1.1$ ) et B ( $\alpha=1.31$ ) pourraient effectivement être d'une origine plus ancienne comparativement aux groupes C $\alpha$  ( $\alpha=0.64$ ), C $\beta$  ( $\alpha=0.61$ ) et C $\gamma$  ( $\alpha=0.65$ ) selon cette méthode (Richer *et al*, 2004).

L'hypothèse du transfert horizontal d'un gène *Nramp* eucaryote permet donc de supposer un gain fonctionnel par la bactérie receveuse, lui conférant un avantage dans certaines conditions. Si les protéines MntH A, B et C ont apparemment conservé des modes d'action et des substrats similaires, il serait logique que les différences de séquence entre les groupes correspondent à des variations de structure (ex : arrangement/contact des segments transmembranaires), de mécanisme d'action et/ou de régulation. L'adaptation de la protéine Nramp à la cellule eucaryote pourrait avoir permis son utilisation dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, en facilitant l'acquisition des métaux divalents par la cellule hôte, limitant ainsi leur accessibilité pour les bactéries pathogènes phagocytées. Les protéines MntH C pourraient présenter certaines propriétés avantageuses d'origine eucaryote, permettant aux bactéries qui les exprimeraient d'être plus performantes lors de l'infection de l'hôte ou vis-à-vis d'autres bactéries qui compétitionnent pour coloniser une même niche. Les bactéries *Burkholderia mallei* et *Lactococcus lactis* démontrent une adaptation à des conditions particulières en présence d'un gène *mntH C* (Richer *et al*, 2003). Cependant, avant de vérifier si les différences de séquences entre groupes correspondent à des divergences structurelles et/ou fonctionnelles, il est essentiel de connaître la topologie transmembranaire des protéines étudiées à défaut de disposer de leur structure tridimensionnelle.

## **6 Topologie transmembranaire de la famille Nramp/MntH**

### **6.1 Conservation de séquence dans la famille Nramp/MntH**

Les homologues microbiens de la famille Nramp/MntH possèdent un haut taux d'identité entre eux variant de 36% parmi les procaryotes du groupe B jusqu'à 52% entre les homologues de levure Smfp. En général, les homologues se retrouvant chez les plantes et les animaux démontrent une identité entre 35 % et 40%. Cependant, ce taux d'identité est supérieur ( $\geq 50\%$ ) entre homologues Nramp 'archétypes'.

De plus, les différents membres de la famille Nramp/MntH possèdent un caractère hautement hydrophobe démontré par les profils d'hydrophobicité qui sont très similaires entre les protéines procaryotes et celles des vertébrés (Cellier *et al*, 1995; Richer *et al*, 2003). Cette conservation se limite aux dix premiers segments hydrophobes qui constituent le cœur hydrophobe des membres de la famille Nramp; le profil d'hydrophobicité de l'outgroup semble correspondre à ces 10 segments hydrophobes. Cependant, le nombre de segments totaux varient entre les homologues eucaryotes et procaryotes. Les protéines eucaryotes possèdent 12 segments hydrophobes comparativement aux procaryotes qui n'en possèderaient que 11. Par contre, certains homologues bactériens comme *Enterococcus faecalis* (EfeaC $\beta$ ) et *Lactococcus lactis* (LlaC $\beta$ ) contiennent probablement un douzième segment transmembranaire d'après leur profil d'hydrophobicité (Richer *et al*, 2003).

## 6.2 Résultats topologiques concernant les homologues Nramp/MntH

### 6.2.1 Homologues eucaryotes Nramp

Les données expérimentales sur la topologie des homologues eucaryotes sont très fragmentaires. Cependant, elles permettent de vérifier l'orientation du premier et du dernier segments transmembranaires. Chez l'homologue Smf3p, localisé dans la membrane de la vacuole chez la levure, un épitope HA (Hémagglutinine) a été introduit en amont et en aval du dernier segment transmembranaire (11<sup>e</sup>) et ce, sans altérer la fonction et la localisation de Smf3p à l'intérieur de la cellule (Portnoy *et al*, 2000). La protéolyse de l'épitope C-terminal a permis de démontrer que l'extrémité de la protéine est située du côté externe de la membrane, impliquant que le onzième segment est orienté du cytoplasme vers le côté intravacuolaire.

Pour ce qui est de l'homologue Nramp2, un groupe a démontré que la quatrième boucle périplasmique située entre les segments membranaires 7 et 8 se situe du côté extracellulaire (Picard *et al*, 2000). De plus, ce même groupe a introduit dans la boucle correspondante chez l'homologue Nramp1 un épitope HA et a démontré que cette

insertion était située du côté extracellulaire. Cependant, cette insertion modifiait la localisation de la protéine qui se retrouvait localisée dans la membrane plasmique et non dans les membranes lyso-et phagosomales (Touret *et al.*, 2003). L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de démontrer que les deux extrémités de Nramp1 sont situées du côté cytoplasmique, en faisant réagir d'une part un sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine ainsi qu'un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope c-myc préalablement inséré à l'extrémité C-terminale d'autre part (Vidal *et al.*, 1996). Dans les deux cas, il était nécessaire de perméabiliser au préalable la membrane plasmique afin d'obtenir un signal *in situ*. Récemment, le groupe du Dr. Qian a synthétisé le peptide correspondant au quatrième segment hydrophobe de Nramp2, plus précisément entre les résidus R<sub>179</sub> à Y<sub>202</sub>. Leur étude indique que les résidus V<sub>187</sub> à K<sub>201</sub> adopte une conformation hélicoïdale dans des micelles formées à partir du détergent SDS et que son extrémité N-terminale n'a pas de structure ordonnée (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003).

Une autre étude effectuée sur Nramp1 a montré qu'un sérum polyclonal dirigé contre la même 4<sup>e</sup> boucle extracellulaire inhibait l'association de fer radioactif avec des phagosomes purifiés, tandis qu'un sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité C-terminale ne l'inhibait pas. Les auteurs ont donc proposé que la boucle entre les segments 7-8 est située du côté cytoplasmique (Kuhn *et al.*, 2001). Cette étude suggère que Nramp1 pourrait adopter une topologie inversée par rapport à Nramp2, ce qui est en contradiction avec les autres études effectuées avec des protéines de levure et Nramp1 (Forbes & Gros, 2001).

### 6.2.2 Homologues procaryotes MntH

Durant mes études de maîtrise, nous avons effectué la première étude systématique concernant la topologie transmembranaire de la protéine EcoliA. Pour ce faire, plusieurs algorithmes topologiques ont été utilisés pour déduire une prédiction consensus de la topologie d'EcoliA. Cette prédiction a été validée expérimentalement en utilisant deux gènes rapporteurs complémentaires: la  $\beta$ -lactamase (Blam) et la

chloramphénicol acétyl transférase (CAT), deux protéines actives lorsque fusionnées à l'intérieur de boucles périplasmique et cytoplasmique, respectivement. La création de 9 fusions et 3 insertions avec le rapporteur Blam et de 5 fusions complémentaires CAT nous ont permis de proposer que EcolIA possède 11 segments transmembranaires (STM), avec son extrémité N-terminale située du côté cytoplasmique et la portion C-terminale du côté périplasmique (Figure 4; Courville *et al*, 2004; Rahman *et al*, 2007). Ces données ont récemment été confirmées (Rahman *et al*, 2007). Le groupe du Dr. von Heijne a effectué une analyse topologique portant sur 602 protéines transmembranaires de la membrane interne d'*E. coli*. Ils ont déterminé l'orientation de leur extrémité C-terminale à l'aide des rapporteurs topologiques, comme la phosphatase alcaline et la 'green fluorescent protein' (GFP), qui sont actifs du côté périplasmique et cytoplasmique, respectivement (Daley *et al*, 2005). Ces deux études valident nos résultats, indiquant que l'extrémité C-terminale d'EcolIA se retrouve du côté périplasmique.

**Figure 4. Modèle topologique pour la protéine MntH d'*Escherichia coli*.** Modèle basé sur les algorithmes de prédiction ainsi que les résultats des fusions et insertions avec les rapporteurs BlaM et CAT obtenus au cours de ma maîtrise. Les résidus en gras et numérotés correspondent aux sites conservés mais différents entre l'outgroup et la famille Nramp/MntH. Les extrémités N-et C- terminales sont indiquées par NH<sub>2</sub> et COOH. Les résidus impliqués dans les contacts inter-hélices sont indiqués en rouge tandis que ceux en bleu correspondent aux résidus directement impliqués dans le transport du Me<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>.

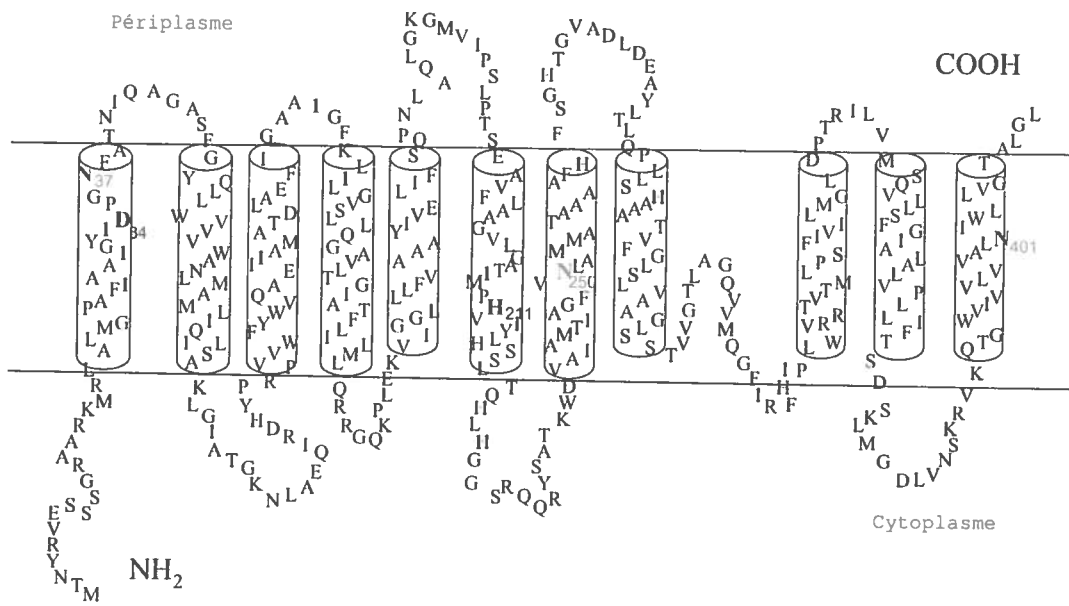


Figure 4



Une autre étude a proposé un modèle différent pour l'homologue MntH A de *Mycobacterium leprae* en se basant sur l'étude de prédictions et de la réactivité d'une cystéine unique à la position 299 (Cys<sub>299</sub>) en présence du marqueur méthaneithiosulfonate (voir section 7.2.3). L'analyse par spectroscopie de résonance paramagnétique de l'interaction dipolaire entre le groupement nitroxyde-Cys<sub>299</sub> et un métal paramagnétique (Cu), a démontré que cette cystéine se situe dans un environnement fluide et hydrophobe. Selon ces analyses, cette cystéine serait située dans le segment transmembranaire 10 (Reeve *et al*, 2002).

Cette conclusion apparaît en contradiction avec la majorité des analyses effectuées sur les homologues eucaryotes Nramp1, Nramp2, Smf3p, et avec le modèle topologique vérifié pour EcolIA (Daley *et al*, 2005; Rahman *et al*, 2007). Leur résultat est également en désaccord avec les prédictions basées sur l'analyse des séquences eucaryotes et procaryotes (Cellier *et al*, 1995; Richer *et al*, 2003).

Le modèle topologique établi pour EcolIA est en accord avec la majorité des données structurales obtenues sur les homologues eucaryotes. Nous pouvons par le fait même cibler les résidus transmembranaires susceptibles de jouer un rôle important dans le mécanisme de co-transport du Me<sup>2+</sup> et du H<sup>+</sup>. Une substitution cystéine à cette position (L333C; position chez EcolIA correspondant à la cys 299 chez MntH de *M. leprae*) permettrait également d'étudier son accessibilité vis-à-vis de différents réactifs sulphydryles afin de déterminer si cette position est située sur une face aqueuse ou lipidique du segment transmembranaire. À la suite des données fonctionnelles et structurales obtenues avec l'homologue EcolIA, il apparaît donc approprié d'utiliser la protéine MntH d'*E. coli* comme modèle d'étude car c'est l'homologue bactérien le mieux caractérisé de la famille Nramp/MntH.

## **7 Modèles d'étude principaux pour la famille Nramp/MntH**

### **7.1 Expression fonctionnelle dans les œufs de xénope**

La première étude a proposé un mécanisme d'action pour la famille Nramp provient du groupe du Dr. Hediger qui a étudié la protéine Nramp2 en l'exprimant dans des œufs de Xénope. Ce groupe a également réussi le clonage fonctionnel du transporteur Nramp2 (DCT1) requis pour l'absorption du fer au niveau intestinal (Gunshin *et al*, 1997). Deux études proposent que Nramp2 facilite le passage du fer en absence de gradient de  $H^+$  à pH neutre (pH 7.4; Mackenzie *et al*, 2006). De même, à pH extracellulaire acide (pH 5.5) le transporteur permettrait également la translocation du  $H^+$  en absence de métal (Mackenzie *et al*, 2006). De plus, en présence de métaux substrats, le passage du  $H^+$  via Nramp2 est augmenté (fuite dépendant des métaux). Ce dernier mécanisme correspond à une fuite du  $H^+$  dont le but pourrait permettre à la cellule de limiter l'entrée aux métaux toxiques (Cohen *et al*, 2003; Sacher *et al*, 2001). L'homologue de levure Smf1p possède également un phénomène de fuite. Cependant, contrairement à Nramp2, Smf1p démontre une fuite de  $Na^+$  (et non du  $H^+$  comme chez Nramp2) qui est dépendante du pH alcalin et non des métaux substrats. Bien que le  $Na^+$  inhibe l'entrée du métal, il semble plutôt que ce dernier compétitionne avec le  $H^+$  et non avec le cation divalent (Chen *et al*, 1999; Sacher *et al*, 2001).

Ces études effectuées sur les homologues Nramp2 et Smf1p nous permettent de reconnaître la remarquable versatilité et l'informativité de l'approche électrophysiologique, quoique peu adaptée pour caractériser les protéines procaryotes.

### 7.1.1 Mécanisme d'action de l'homologue Nramp2

La substitution de résidus histidine en alanine (H267A et H272A), situés à l'intérieur du segment transmembranaire 6 et impliqués dans le transport dépendant du  $H^+$  (Lam-Yuk-Tseung *et al*, 2003) a permis au groupe du Dr. Mackenzie de proposer un mécanisme à 8 étapes. Selon ce modèle, le fer et le  $H^+$  compétitionnent entre eux pour se lier au transporteur. Le  $H^+$  serait le premier à venir se fixer sur la protéine car ce dernier augmente l'affinité du transporteur vis-à-vis du fer et que la fuite du  $H^+$  est possible en absence du métal. Cette étude propose aussi que le  $H^+/Fe^{2+}$  seraient transloqués simultanément (Mackenzie *et al*, 2006).

Le groupe du Dr. Nelson a également analysé par électrophysiologie le mécanisme d'action de Nramp2 en étudiant des sites correspondant à des taux de substitution différents entre les groupes phylogénétiques de la famille Nramp. Les résidus identifiés (Gly88 (du motif DPGN), Glu 91, Asp 93 et Gln95) sont tous situés à l'extrémité du 1<sup>er</sup> segment transmembranaire et dans la 1<sup>ère</sup> boucle périplasmique. L'acide aminé Gly 88 affecte grandement l'accumulation du  $\text{Me}^{2+}$  et la fuite du  $\text{H}^+$  dépendante du substrat mais ce résidu n'affecte pas la fuite du  $\text{H}^+$  indépendante du  $\text{Me}^{2+}$ . L'introduction et l'élimination de la charge négative aux positions Q95 (Q95D) et D93 (D93A) limitent et abolissent respectivement l'accumulation du métal. Cependant, seulement la mutation Q95D élimine la fuite métallodépendante. Les résultats obtenus indiquent que l'extrémité C-terminale du segment transmembranaire 1 ainsi que la boucle périplasmique entre les segments hydrophobes 1 et 2 sont impliqués dans le mécanisme d'action de Nramp2 en affectant le transport du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  ainsi que le mécanisme de fuite du  $\text{H}^+$  (Cohen *et al*, 2003).

Cependant, malgré le fait que les œufs de Xénope ont permis de proposer un premier modèle concernant le co-transport du  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  via la protéine Nramp2, très peu de protéines procaryotes ont pu être exprimées et caractérisées dans ce système (Agranoff *et al*, 1999). Il semble donc opportun de développer un modèle procaryote afin d'étudier le mécanisme d'action *in vivo* et *in vitro* des homologues Nramp/MntH en utilisant comme modèle d'étude la protéine EcolIA. La complémentarité des données obtenues à partir du modèle des œufs de Xénope permettra une meilleure compréhension du mécanisme de transport caractéristique de la famille Nramp.

## 7.2 Homologues procaryotes comme modèle d'étude

Les homologues procaryotes constituent un modèle attractif et relativement facile à étudier. Bien que plusieurs protéines procaryotes ont pu être exprimées fonctionnellement à l'intérieur d'*E. coli*, peu de protéines eucaryotes y ont été exprimées. Plusieurs modèles

sont utilisables pour étudier le mécanisme d'action des transporteurs exprimés dans *E. coli* tant *in vivo* qu' *in vitro*.

### 7.2.1 Choix et avantages d'un modèle d'étude *in vivo* pour les homologues MntH

Plusieurs systèmes rapporteurs ont été mis au point pour l'étude *in vivo*. Plusieurs souches mutantes pour différents transporteurs sont disponibles afin de caractériser le transport des métaux tel que le fer. L'équipe du Dr. Rensing a créé plusieurs souches d'*E. coli* qui sont déficientes de un à cinq transporteurs de fer (Grass *et al*, 2005a). Par exemple la souche GR536 qui ne possède pas les protéines FecABCDE, MntH, ZupT, EntC et FeoABC qui sont toutes impliquées dans le transport du fer. Cette souche permet de mieux caractériser le transport des cations divalents comme le fer et le manganèse, en limitant l'accumulation du fer par d'autres transporteurs chez la bactérie.

Deux mutations ponctuelles dans la protéine HflBI rendent la souche SL93 dépendante des métaux (Mn, Fe, Co) pour croître à la température non permissive de 42°C (Herman *et al*, 1995). Cette souche permet d'établir l'activité d'un transporteur de cations divalents tel MntH, vis-à-vis du fer et du manganèse (Courville *et al*, 2004; Makui *et al*, 2000).

Les études de complémentation et de toxicité permettent un test rapide et simple du niveau d'activité, vis-à-vis du métal, des homologues ou des mutations ponctuelles effectuées sur l'homologue MntH étudié. Cependant, pour étudier la cinétique du transport ou bien vérifier si la mutation introduite n'aurait pas un rôle à jouer lors du changement de conformation, on peut mesurer l'accumulation d'un substrat radioactif ( $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{54}\text{Mn}$  et  $^{55}\text{Fe}$ ). Le laboratoire du Dr. Cellier a démontré l'accumulation du fer et du Mn radioactifs par EcolIA (Makui *et al*, 2000). Au cours de nos recherches, nous avons choisi d'utiliser le Cd comme substrat car il s'agit d'un substrat universel de la famille Nramp, il démontre une meilleure sensibilité pour l'entrée du  $\text{H}^+$  dépendante du métal

mesurée à l'aide de la pHluorin, et sa forme radioactive est moins dangereuse pour l'utilisateur et pour l'environnement.

Considérant que les protéines appartenant à la superfamille Nramp permettent le co-transport du  $H^+$ , il est donc crucial de pouvoir mesurer l'entrée du  $H^+$ . Pour ce faire, une forme de GFP ('Green Fluorescent Protein'), dite ratiométrique et dénommée pHluorin. Cette dernière possède deux pics d'excitation distincts en fonction du pH (pH8.0, 410nm, pH6.0, 470nm). Le ratio d'excitation obtenue (410/470nm) permet de mesurer la variation de la concentration intracellulaire du  $H^+$  (Courville *et al*, 2004). Initialement cette GFP modifiée a été utilisée pour détecter la transmission entre les synapses en observant l'acidité à l'intérieur des vésicules lors de l'exocytose et du recyclage (Miesenbock *et al*, 1998). Par la suite le groupe du Dr. Ingmer a montré qu'il est possible d'utiliser la pHluorin comme rapporteur pour mesurer la variation du pH intracellulaire chez les bactéries Gram positive et négative (Olsen *et al*, 2002). Le Dr. Chaloupka, dans le laboratoire du Dr. Cellier, a utilisé la pHluorin pour mesurer le transport du  $H^+$  par EcoliA *in vivo*. Les travaux permettent de démontrer pour la première fois le co-transport  $Me^{2+}/H^+$  chez un homologue bactérien de la famille Nramp (Courville *et al*, 2005).

Malgré le fait que les modèles *in vivo* demeurent une bonne approche pour l'identification des mutations fonctionnelles impliquées dans le transport du substrat, l'interprétation des résultats peut s'avérer difficile car on possède peu de contrôle sur le métabolisme endogène de la bactérie (Simoni & Postma, 1975).

### **7.2.2 Approche pour étudier le mécanisme d'action *in vitro***

Pour surmonter les difficultés associées à l'utilisation des bactéries entières, le Dr. Kaback et le Dr. Rosen ont mis en place, au début des années 70, une procédure qui permet d'obtenir des vésicules membranaires dépourvues de cytoplasme (Kaback, 1971; Rosen & McClees, 1974). Ces vésicules se nomment RSO (Right-Side-Out vesicles) et

ISO (InSide-Out-vesicles) et facilitent l'étude du mécanisme de transport *in vitro* en relation avec la théorie du gradient électrochimique du H<sup>+</sup> du Dr. Mitchell.

Les vésicules de type RSO sont obtenues par formation de sphéropastes (traitement au lysozyme-EDTA) suivi d'un choc osmotique (Kaback, 1971). Ces vésicules possèdent la même polarité c'est-à-dire que la membrane est orientée selon la même configuration que les cellules entières, et, après énergisation à l'aide de donneur d'électrons (lactate PMS-ascorbate), l'intérieur devient chargé négativement avec un pH alcalin (Robertson *et al*, 1980). Par contre les vésicules de type ISO sont obtenues par passage dans la presse de French (Rosen & McClees, 1974). Comparativement aux RSO, les membranes des vésicules ISO possèdent une polarité et une configuration inversée en comparaison avec les cellules entières. Leur énergisation résulte en un intérieur chargé positivement et acide (Reenstra *et al*, 1980). Dans les vésicules RSO, EcoliA posséderait donc la même configuration que dans la cellule entière tandis qu'en ISO elle serait dans une configuration inversée.

La transport actif à travers les vésicules membranaires est similaire aux cellules entières car il fonctionne selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell où le transfert des électrons à travers la chaîne respiratoire est accompagné d'expulsion de protons à l'extérieur de la cellule, ce qui génère un gradient électrochimique du proton ( $\Delta\bar{u}_H^+$ ) également appelé force proton motrice (Mitchell, 1976). Cette dernière est composée d'une composante électrique (potentiel de membrane;  $\Delta\psi$ ) qui correspond à la différence de charge (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>) et d'une composante chimique (gradient de H<sup>+</sup>;  $\Delta pH$ ). Ces composantes réagissent ensemble selon la formule :

$$\Delta\bar{u}_H^+ = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F} \Delta pH$$

où R est la constante des gaz parfaits (1.987 cal degré<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T la température en degré absolu (en Kelvin) et F la constante de Faraday (23.062 cal V<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>). 2.3RT/F est égal à 58.8mV à 25°C.

Dans les vésicules RSO et ISO, il est possible de générer artificiellement la force proton motrice à l'aide d'un donneurs d'électrons tels que le lactate, le NADH ou bien le PMS-asc (Phénazine méthasulfate-ascorbate; Konings *et al*, 1971). Cette source d'énergie a permis de mesurer le transport de différents substrats à l'intérieur des vésicules RSO et ISO comme par exemple : le lactose, les acide aminés (Proline, Serine, Leucine), le calcium, le fer, le manganèse et le zinc (Bhattacharyya, 1970; Grass *et al*, 2005a; Grass *et al*, 2005b; Konings *et al*, 1971; Quick *et al*, 2003; Rosen & McClees, 1974).

L'étude du mécanisme de transport à l'aide de vésicules permet de mieux contrôler les conditions expérimentales et de séparer le  $\Delta\psi$  et/ou le  $\Delta\text{pH}$  à l'aide de différents ionophores. La valinomycine est un ionophore qui rend la membrane perméable à l'ion  $\text{K}^+$ . Ce qui a comme effet, en présence de  $\text{K}^+$  extérieur, d'éliminer le  $\Delta\psi$ . Par contre, la nigericine permet l'échange à travers la membrane d'un  $\text{K}^+$  avec un  $\text{H}^+$ , ce qui a comme impact d'éliminer le  $\Delta\text{pH}$  en présence de  $\text{K}^+$  extravésiculaires. La présence simultanée de nigericine et de valinomycine a le même effet que le poison CCCP, soit de dissiper totalement le gradient électrochimique du proton. L'utilisation des ionophores permet donc d'étudier l'électrogénicité du transporteur (capacité de permettre le mouvement de charges à travers la membrane) et si l'activité de ce dernier est dépendante du  $\Delta\psi$  et/ou du  $\Delta\text{pH}$ .

L'étude comparative du transport d'EcolIA à l'intérieur des vésicules de type RSO et ISO peut en théorie permettre d'étudier en détail le mécanisme d'action de MntH soit le co-transport du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$ , et si ce transporteur démontre une asymétrie dans le transport du substrat. L'approche *in vitro* peut également permettre de résoudre la controverse sur la direction du transport des homologues Nramp/MntH (symporteur vs antiporteur) et être utilisée pour vérifier le couplage du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$ .

L'utilisation des vésicules RSO et ISO peut servir de point de départ pour faciliter la solubilisation et la purification des protéines membranaires et peut permettre

d'analyser l'accessibilité in situ de groupements thiols introduits dans certains éléments du transporteur étudié.

### 7.2.3 Introduction de cystéines par mutagenèse dirigée

Étant donné la difficulté d'obtenir une structure à haute résolution pour les protéines transmembranaire (Booth *et al*, 2001), une approche de choix pour obtenir une idée générale de la structure tertiaire des protéines membranaires est de remplacer séparément des résidus par l'acide aminé cystéine (Sorgen *et al*, 2002). Ce résidu a la caractéristique d'être très réactif et peut être introduit à plusieurs endroits sans avoir d'effet néfaste sur l'expression et sur l'activité des protéines étudiées (Traxler *et al*, 1993; van Geest & Lolkema, 2000). Pour effectuer un balayage à cystéine, il faut au préalable remplacer chacun des résidus cystéines endogènes par des résidus relativement peu dommageables comme l'alanine ou la sérine.

Les avantages de cette approche sont que : (i) l'analyse est effectuée sur une protéine entière et active; (ii) les modifications sont minimales et altèrent peu la topologie transmembranaire; (iii) l'introduction d'une cystéine est normalement bien tolérée à l'intérieur de la protéine ce qui fait que les analyses sont effectuées sur une protéine fonctionnelle; (iv) les modifications du groupement thiol ont lieu après l'insertion dans la membrane; (v) la banque de mutants cystéine obtenue peut être utilisée pour effectuer des analyses structurales approfondies comme la liaison à l'aide d'un réactif de réticulation qui permet de vérifier la distance entre deux cystéines introduites à l'intérieur de la protéine (van Geest & Lolkema, 2000). Cependant cette technique a quelques limitations car ce ne sont pas toutes les cystéines qui peuvent réagir avec les réactifs sulphydryles. Le fait que la protéine EcolIA ne possède pas de cystéine en fait un excellent modèle pour utiliser cette approche.

Une fois que la protéine ne contient qu'une seule cystéine à la position désirée, la méthode consiste à tester la réactivité de cette cystéine avec différents réactifs spécifiques des groupements sulphydryles. Ces produits possèdent des tailles différentes et diffèrent



par leur degré de perméabilité à la membrane. Un grand nombre de réactifs sulphydryles existe, comprenant des groupements soit fluorescents, radioactifs ou encore, biotinylés. Chacun de ces marqueurs peut être détecté et ainsi démontrer l'accessibilité de la cystéine et permettant d'en déduire la nature de son environnement. Le réactif fluoresceine-5-maléimide est relativement encombrant et peu perméable, ce qui permet de révéler des résidus largement accessibles, s'ils font partie d'un segment transmembranaire ou situé à l'intérieur d'une large cavité dans sa structure. Un second réactif couramment utilisé est le NEM (N-éthylmaleimide), qui est de petite taille et suffisamment hydrophobe pour être perméable dans la membrane. Il permet de localiser pratiquement tous les résidus dans leur environnement local et spécifique au sein de la structure tertiaire, à l'exception des résidus enfouis dans le cœur hydrophobe de la membrane lipidique ou bien impliqués dans des interactions inter-hélices très étroites. La réactivité du NEM ou de la F5M peut être bloquée en pré-traitant la protéine en présence de MTSES ("2-sulfonatoethylmethane thiosulfonate"), un petit réactif hydrophile et imperméable, ou bien par l'AmDis ("4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2-2'-disulfonic acid") un large réactif chargé et imperméable à la membrane. On peut donc combiner des approches de marquage direct avec des étapes de protection où un réactif non marqué est utilisé comme traitement préalable. Cette technique permet une multitude d'approches possibles. Par exemple, il est possible de vérifier si l'addition d'un substrat modifie la réactivité de la cystéine étudiée et/ou induit un changement de conformation de la protéine. Ces différents réactifs permettent d'établir si la cystéine étudiée correspond plutôt à un environnement aqueux, lipidique ou si le résidu est situé à la surface (périplasmique ou cytoplasmique) de la protéine (Riordan & Vallee, 1972).

Cette approche a prouvé qu'elle était efficace car tous les résidus des protéines TetAB (Tamura *et al*, 2001) et de la lactose perméase (LacY; Frillingos *et al*, 1998), ont été remplacés par une cystéine et leur réactivité a été analysée en utilisant le N-éthylmaléimide (NEM (Riordan & Vallee, 1972). Ces protéines, assez différentes par leur séquence d'acides aminés, leur spécificité de substrat et leur mécanisme d'action (H<sup>+</sup>-symporteur ou -antiporteur), possèdent néanmoins une structure tridimensionnelle fortement similaire et possèdent des segments membranaires pleine longueur. C'est à dire

que quatre hélices sont placées dans un environnement totalement hydrophobe et forment la partie extérieure du canal transmembranaire (peu réactif au NEM sur toute leur longueur); quatre autres sont situées dans la région intérieure du canal et démontrent un caractère amphiphile (une face réagissant fortement au NEM sur toute leur longueur) et les quatre derniers segments, démontrent qu'une moitié de leur hélice est située dans l'environnement hydrophobe et l'autre moitié dans l'environnement hydrophile (réactivité au NEM intermédiaire, une moitié inaccessible au NEM, et une moitié présentant une face accessible au NEM). Ce patron de réactivité peut s'expliquer par le fait que les hélices forment un angle dans la membrane. Chez ces deux protéines, les groupes des Dr. Kaback et Yamagushi ont découvert que très peu de résidus sont essentiels pour le bon fonctionnement; 6 chez la lactose perméase (Frillingos *et al*, 1998) et 17 pour l' antiporteur de la tétracycline (Tamura *et al*, 2001). La structure tridimensionnelle de la lactose perméase a permis de confirmer les résultats obtenus grâce au balayage à la cystéine et à l'étude du mécanisme d'action de la LacY à l'aide de vésicules RSO et ISO (Kaback, 2005).

## 8. Objectifs et Hypothèses

Dans cette thèse, sont présentés les résultats de recherches ayant comme principaux objectifs :

- 1) Utiliser la protéine MntH d'*E. coli* (EcoliA) comme modèle d'étude pour la caractérisation et la localisation des résidus impliqués dans le mécanisme d'action (co-transport  $H^+/Me^{2+}$ ) de la famille Nramp/MntH.
- 2) Utiliser une approche phylogénétique pour identifier les résidus impliqués dans le mécanisme d'action de la famille Nramp/MntH.
- 3) Établir une approche pour permettre l'expression, la solubilisation et la purification de MntH.

Les principales hypothèses ayant dirigées mes recherches sont :

- 1) Les homologues Nramp/MntH démontrent une conservation de leur structure secondaire et de leur topologie.
- 2) Les résidus qui sont conservés mais différents entre les membres de la famille Nramp et de l' outgroup participent au mécanisme du transport.
- 3) L'homologie indique que les résidus conservés entre les homologues correspondent à des fonctions également conservées.
- 4) Le fonctionnement de MntH comme une pompe chimio-osmotique, implique une asymétrie entre l'influx et l'efflux du  $Me^{2+}$ .

**Partie II**  
**ARTICLES**

## Article 1

Gene organization and expression of the divalent cation transporter Nramp in the protistan parasite *Perkinsus marinus*, *Journal of Parasitology* (2004) **90**, 1004-1014.

Pour cet article, j'ai effectué les prédictions de topologie transmembranaire basées sur l'analyse des séquences étudiées et j'ai préparé le tableau 1, la figure 2 et participé à la rédaction de la section portant sur la topologie transmembranaire.

## Mise en contexte :

Le séquençage du génome du parasite protozoaire intracellulaire *Perkinsus marinarus*, responsable de la maladie "Dermo" chez l'huître, a permis de déceler un gène codant pour un homologue de la famille Nramp (PmNramp) appartenant aux homologues de type Nramp 'archétype'. Cet article est le premier à caractériser l'expression d'un homologue Nramp à l'intérieur d'un parasite eucaryote intracellulaire en combinant une approche phylogénétique et l'étude de l'expression de *PmNramp* vis-à-vis du stress oxydatif et de la disponibilité des cations divalents (fer et manganèse). Les résultats indiquent que PmNramp appartient aux homologues de type Nramp 'archétype' et possède 12 segments transmembranaires. Par analyse de type Northern, il a été montré que *PmNramp* est exprimé lorsque la quantité de fer est limitante en présence du chélateur des ferrioxamines (DFO). Cependant en présence de fer (100µM) ou d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *PmNramp* est réprimé. Ces résultats indiquent que durant l'ingestion, l'homologue Nramp de *P. marinarus* peut compétitionner avec l'hôte, l'huître *Crassostera* pour le fer disponible durant l'infection.

## GENE ORGANIZATION AND EXPRESSION OF THE DIVALENT CATION TRANSPORTER NRAMP IN THE PROTISTAN PARASITE *PERKINSUS MARINUS*

José-Antonio F. Robledo, Pascal Courville\*, Mathieu F. M. Cellier\*, and Gerardo R. Vasta†

Center of Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute, 701 East Pratt Street, Suite 236, Baltimore, Maryland 21202-3101. e-mail: vasta@umbi.umd.edu

**ABSTRACT:** Trophozoites of the protistan parasite *Perkinsus marinus* reside and proliferate inside phagosomelike structures of hemocytes from the host, the eastern oyster *Crassostrea virginica*. In a murine model, it has been proposed that the outcome of intracellular parasite–host interactions is determined, at least in part, by the activity of the host's divalent cation transporter natural resistance–associated macrophage protein 1 (Nramp1). Although nucleotide sequences from members of the Nramp family in protozoan parasites have recently become available in public databases, little is known about their molecular, structural, and functional aspects that may relate to the parasite's survival of intracellular killing by the host. The complementary DNA (cDNA) sequence of the Nramp from *P. marinus* (*PmNramp*) was obtained by polymerase chain reaction amplification with degenerated primers, followed by rapid amplification of cDNA ends. The 2,082-bp cDNA sequence encoded a predicted protein of 558 amino acids. *PmNramp* is a single-copy gene composed of 7 exons and 6 short introns (44–61 bp) with the canonical splicing signal (GT/AG). A phylogenetic analysis indicates that *P. marinus* and apicomplexan Nramp genes derive from a common "archetype" Nramp ancestor. However, the apicomplexan Nramps are highly divergent from the *P. marinus* sequence and the rest of the archetype Nramp group. Preliminary studies suggest that expression of *PmNramp* in in vitro-cultured *P. marinus* trophozoites is modulated by metals and by exogenous oxidative stress.

*Perkinsus marinus* (Perkinsozoa: Perkinsea), the ethiological agent of "Dermo" disease in the eastern oyster *Crassostrea virginica*, produces extensive damage to natural and farmed oyster populations along the Atlantic and Gulf coasts of United States. The life cycle of *P. marinus* includes a free-living stage (zoospore) and a nonmotile vegetative stage (trophozoite). Once inside the host, trophozoites are phagocytosed by oyster hemocytes localizing inside phagosomelike structures, where they remain viable and proliferate (Andrews, 1996; Chu, 1996; Perkins, 1996). High water temperature and salinity enhance the prevalence and intensity of the disease (Chu, 1996), and the levels of soluble iron modulate the in vitro proliferation of the parasite (Gauthier and Vasta, 1994).

Natural resistance–associated macrophage protein 1 (Nramp1), also named solute carrier family 11a1 (Slc11a1) belongs to a ubiquitous family of divalent cation transmembrane (TM) transporters characterized by a highly conserved hydrophobic core consisting of 10 TM domains, a putative conserved transport signature sequence, 1 extracytoplasmic loop that is glycosylated, and several consensus sites for phosphorylation by protein kinases C and A (Cellier et al., 1995, 2001; Vidal et al., 1996). The murine Nramp1 was identified as a critical determinant of susceptibility to intracellular pathogens including *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium* spp., and *Toxoplasma* spp. (review in Blackwell et al., 2001). After phagocytosis of a potential pathogen, Nramp1 is recruited to the maturing phagosomal membrane of the macrophage (Blackwell et al., 2001).

The mechanism(s) by which Nramp1 mediates pathogen resistance is still under debate and can be summarized into 2 lines of thought (reviewed in Wyllie et al., 2002). One proposes that Nramp1 increases intraphagosomal Fe<sup>2+</sup> and through the Haber-Weiss-Fenton reaction generates microbicidal reactive oxygen species (ROS). The second suggests that Nramp1 deprives the intraphagosomal pathogen of Fe<sup>2+</sup> and other divalent cations

critical for growth and for the pathogen's effective antioxidant defense. In one instance Nramp1 was found to function as a pH-dependent antiporter, able to flux cations bidirectionally against a proton gradient, although the resistance to intracellular parasites appears to be determined by the intracellular distribution of available iron inside the macrophage, rather the direction of flux (Mullero et al., 2002).

Other studies suggested that Nramp1 functions as a divalent metal proton cotransporter (Jabado et al., 2000; Forbes and Gros, 2003) similar to the functions proposed for Nramp homologues; Nramp2 (Slc11a2) is expressed in many tissues including macrophages but mostly in the brush border of the intestine of mammals where it functions as a proton–divalent metal cotransporter involved in iron uptake (Gunshin et al., 1997). Mutations in the Malvolio (*mv1*) gene, a *Drosophila melanogaster* Nramp homologue that affects taste behavior, are suppressed by dietary iron or manganese supplementation (Orgad et al., 1998) and by Nramp1 genetic complementation (D'Souza et al., 1999). It is thus possible that Nramp homologues exert similar transport function and that the phenotypes observed differ depending on the cell type in which the protein is expressed and on its intracellular localization.

Nucleotide sequences from members of the Nramp family in apicomplexan parasites have recently been annotated (Carlton et al., 2002; Gardner et al., 2002) or become available in public databases (<http://www.tigr.org/tdb/> and <http://www.sanger.ac.uk/>). However, although the molecular aspects of Nramp1 in mammalian hosts and their roles in resistance or susceptibility to intracellular parasites have been characterized to some extent, with the exception of some bacterial pathogens and *Plasmodium* (D. J. Sullivan, pers. comm.), little is known about the structural and functional aspects of their protozoan parasite counterparts. Aspects that may relate to the competition between parasite and host for essential metabolic substrates also remain to be fully understood.

In this study, we cloned the *P. marinus* Nramp complementary DNA (cDNA), characterized the gene structure of *PmNramp*, analyzed its phylogenetic relationships, and examined its expression in *P. marinus* exposed in vitro to cation depletion and repletion and exogenous oxidative stress. This is the first

Received 19 September 2003; revised 17 December 2003; accepted 16 February 2004.

\* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7.

† To whom correspondence should be addressed.

report of the molecular characterization and expression of an Nramp homologue in a protistan parasite and in the Alveolata overall. Furthermore, because of the basal phylogenetic position of *P. marinus* within the Alveolata (Saldarriaga et al., 2003), the structural and functional characterization of this transporter in *P. marinus* should contribute significantly to a better understanding of the evolution of competing metal-acquisition mechanisms by intracellular parasites and their hosts.

## MATERIALS AND METHODS

### *Perkinsus marinus* cultures and DNA extraction

*Perkinsus marinus* (Texas strain [TXsc]; American Tissue and Cell Collection 50983; <http://www.atcc.org>) was propagated in standard culture medium (Dulbecco modified Eagle [DME]–Ham F12 [1:2] with 5% fetal bovine serum [FBS]) as reported elsewhere (Gauthier and Vasta, 1995). Parasite cultures were centrifuged for 10 min at 490 g and the pellets used for DNA extraction with the QIAamp tissue kit (QIAGEN, Valencia, California) according to the manufacturer's instructions.

### Polymerase chain reaction amplification, cloning, and sequencing

Degenerated primers were designed using the program CODEHOP (Rose et al., 1998) (<http://blocks.fhcrc.org/btest/codehop.html>) and by eye, on the basis of sequences from *Homo sapiens* (accession number BAA07370), *Mus musculus* (AAC24496), *Oncorhynchus mykiss* (AF054808), *D. melanogaster* (S56140), *Saccharomyces cerevisiae* (CAA97558), *Mycobacterium tuberculosis* (CAB08494), and *Escherichia coli* (AF161318). Several primer sets (sense Nramp1F 5'-GGCCATCGCCTACCTGGAYCCNGGNA-3', Nramp2F 5'-GCCACCGACATGCAGGARGT'NATN-3', and Nramp3F 5'-GGAT-TYANRTRCTNTGG-3'; antisense Nramp1R 5'-GGCGGAGTGCAGGTACATGTHRTGGSGGCATNA-3' and Nramp2R 5'-AGACT'KRRCNARNGNGRTGC-3') designed on conserved regions were used to amplify Nramp homologue from *P. marinus* genomic DNA (gDNA). Amplicons were cloned into pGME-T vector (Promega, Madison, Wisconsin), and the sequence searched using BLAST at the NCBI homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### RNA extraction and rapid amplification of cDNA ends

Total RNA was extracted using the RNeasy (QIAGEN) from 1 to 4 ml culture of *P. marinus* cells grown in standard medium and in standard medium supplemented with an excess of iron (Cl<sub>2</sub>Fe, 0.1 mg/ml). On the basis of the *PmNramp* partial genomic sequence, a set of primers was designed for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (sense 5'-TCTCATTACTGCGGTGGATACC-3' and antisense 5'-TAGCCACCATAGGAATGAAGCC-3'). *Perkinsus marinus* RNA (400 ng) was used in a final volume of 25 µl using the Clontech Advantage One step RT-PCR kit (Clontech, Palo Alto, California). *PmNramp* message was expressed in *P. marinus* propagated in both standard and iron-supplemented medium. The same RNA was then used for 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE), the antisense primer for 3' RACE using a lock-docking oligo(dT) primer (Borson et al., 1992) and the sense primer for the 5' RACE using the Smart Kit (Clontech). A new primer *PmNramp*-Fu (sense 5'-CGACTCACTATAGGGCA-AGCAGTGG-3') located at the 5' ends of the gene, together with lock-docking oligo(dT) primer, was used to obtain the full cDNA *PmNramp* sequence, including the complete open reading frame (ORF) and 3' UTR (untranslated region) and most of 5' UTR.

### Screening of a *Perkinsus marinus* genomic library

Three 150-mm LB: Luria Broth plates were plated each with approximately 30,000 plaque-forming units from a *P. marinus* lambda-DASH genomic library (Schott, Robledo et al., 2003). Nylon membranes (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, New Jersey), used for plaque lift, were prepared according to lambda-DASH manufacturer's protocol (Clontech). Twenty-five nanograms of genomic *PmNramp* PCR product (180 bp) were labeled with [ $\alpha^{32}$ P] deoxycytidine triphosphate using *rediprime*® II (Amersham Biosciences Corp.). A total of 9 clones with strong signal were selected in the first screening and re-

screened up to 4 times to ensure their clonality. DNA was isolated from each of the 9 positive lambda clones for *PmNramp* by liquid lysis (Sambrook and Russell, 2001). Two clones (21111 and 62111) with different restriction patterns were digested with *Sall* and *XhoI* (New England Biolabs Inc., Beverly, Massachusetts), and the restriction fragments positive with *PmNramp* probe subcloned into either *Sall* or *XhoI* digested and dephosphorylated pBSISK+ vector (Stratagene, La Jolla, California). The ends of the insert were sequenced with primers T7 and T3, and the rest of the inserts were sequenced using TGS™ Template Generation System (Finnzymes, Espoo, Finland). A composite full-length version of *PmNramp* gene was assembled using consensus sequence from the sequenced clones and Sequencher™ 4.1 software (Gene Codes Co., Ann Arbor, Michigan).

### Southern and Northern analysis

High molecular weight *P. marinus* gDNA (8 µg/lane), extracted as reported elsewhere (Green, 1997), was digested with the restriction enzymes *Bam*HI, *Bse*RI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Pvu*II, *Sac*I, *Sac*II, *Spe*I, *Sph*I, and *Stu*I (New England Biolabs Inc.) and fractionated on 1.0% agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide (EtBr), and the DNA transferred to nitrocellulose membrane by downward flow (Sambrook and Russell, 2001). The membrane was hybridized in UltraHyb™ (Ambion Inc., Austin, Texas) with a *PmNramp* full cDNA probe labeled as above. *Perkinsus marinus* RNA (1.0–2 µg/lane) was fractionated on 1.4% formaldehyde agarose gel. Gel loadings were standardized by staining with EtBr, transferred, and hybridized with a *PmNramp* full cDNA-labeled probe as above.

### Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were performed using 118 sequences (39 eukaryotic Nramp and 79 prokaryotic proton-dependent manganese transporter MntH sequences) aligned with the program ClustalX (Thompson et al., 1997). A total of 1057 aligned sites were used to calculate the percent divergence between all pairs of sequences (divergence matrix) and to apply the Neighbor-Joining (NJ) method to the distance matrix to generate a dendrogram (Saitou and Nei, 1987). A correction for multiple substitutions was applied, and 1,000 bootstrap replicates (random sampling of the alignment sites) were performed to establish statistical confidence values for the groupings observed. A set of 193 parsimonious sites (at which there are at least 2 different kinds of amino acids [aa], each represented at least twice) was generated with the package Mega2 (Kumar et al., 2001) and used to analyze 43 sequence relationships by 3 different approaches (maximum parsimony [MP], minimal evolution [ME], and maximum likelihood [ML]), statistically tested by bootstrapping. The MP method (counting the minimum number of substitutions required to explain observed aa distribution) was used to generate a strict consensus tree (where conflicting branching patterns are resolved by making corresponding nodes multifurcating). For other approaches, the set of parsimonious sites was used to model the heterogeneity of aa replacement rate among sites following a gamma distribution (Schmidt et al., 2002). The alpha parameter values obtained with either the Jones, Taylor, and Thornton (JTT) (Jones et al., 1992) or Blosum 62 (Henikoff and Henikoff, 1993) aa substitution matrices were then used to calculate phylogenetic relationships with distance measurements. A consensus phylogram was derived using the ML tree obtained using the Blosum 62 substitution model (because the sequences compared belong to distant organisms) and reporting the bootstrap values of corresponding nodes obtained with other approaches (1,000 replicates: MP, ML: 3,000 replicates; ME).

### Effect of cation depletion and repletion on *PmNramp* expression

The effect of selected cations (iron and manganese) on *PmNramp* expression was examined in vitro by either chelating available iron with desferrioxamine (DFO) or by surcharging iron or manganese to the culture medium. For these experiments, *P. marinus* was cultured (28–30°C, 98–110 rpm) in standard medium supplemented with 5% FBS (Gauthier and Vasta, 1995), using Crystal Sea Marinemix (Marine Enterprises International, Baltimore, Maryland) as marine salt source. During log phase, cells were pelleted by centrifugation, washed with DME–HAM base medium to remove FBS, and used to inoculate several media formulations to final cell density 6–8 × 10<sup>6</sup> cells/ml (optical density at 600 nm = 0.5–0.6). The following supplements were added to a DME–

-491 -451 -401  
 AGACGAGCCCTTGACCCAGATGCTTCGGCTGAACCTTCGGTGAAGGTATAAGTGGGGATATTCAAGGTATTCAAGTCCACTCCACGGTGGGATTATT  
 -391 -351 -301  
 GGCTTCGCTGGCGTTCTGTCTCCTGGTGACGCCAGCAATGTCGGAGGCACGTGTGACGCCGAGCATTTCGAGTCGTCTTCGGTCCGCAATCGATACA  
 -291 -251 -201  
 AGCTCGGTTCCTTCGCAAATGATTCACATCTGCAAGGGCAGAATCTGCTCTCTCGAGAGGGTTGATGCCCCCGTCTTTCCTCGCAGGGGTGATAG  
 -191 -151 -101  
 TCTGAGGTATCAGGCCCTAGCCAGCGCGGAGCGGTTTTATACTGTCTATTACAGTGTAACTATGGTGTCAAGAATAGTGGTATCGCCTGTACGAGGTTG  
 -91 -51 -1  
 TTGTTGTTGGTGCCGGAAGGATAGTCTTGGCTGATGAAGTTCAGTGGACATGCCATAGGGCAGTAGGAATAGGTGTATTTCATGCTTTTCATAACTA  
 10 50 60 70 80 90 100  
 TGATTGTAGTCTAGTAGATGTCACACGTCCTCCGATCCGCTCTACGGAGGAGTCTAACTCGACGCCCTCTGGCTATCGACTCGAGTAGCATTTCGAGCGG  
 M S H V P D P S T E E S N S T P I A I D S S S I S S G  
 110 150 200  
 CAAAAGCGTAGAATTAGTGGATGGGCCCTCGGAGTTGCCTGTGAACTGGCAAGGAGAAGCAAGTCGAAATACCGATTGACCCGCCCGGTGTTAAGTTC  
 K S V E L V D G P S E L P V R T G G K E K Q V E I P I D P P G V K F  
 210 250 300  
 TCGTTTCGGACATTTTGAAGTATGCTGGTCTGGTGGCTTATGTCTTGGCTATCTCGATCCTGGTAATTTAGAAGCCGATCTACAGGCTGGAGCCT  
 S F R T F C K Y A G P G W L M S L A Y L D P G N L E A D L Q A G A  
 310 350 400  
 TCACAGGCTCCAGTTGCTATGGGTATTGCTACTTGTCTATAGTGGACTCATCTCCAAATTTATCAAGCCGTCTAGCGGCAGTAACAGGGGAAGCA  
 F T G F Q L L W V L L L A H I V G L I L Q I L S S R L A A V T G K H  
 410 450 500  
 TTTGGCTGAGCATTGCGGGCTAGATATCCTAAATGGACTGCAACAGTGTCTATGGATAATGACTGAGATCGGATTTATGGTTCGGATATTCAGGAGGTG  
 L A E H C R A R Y P K W T A T V L W I M T E I A I I G S D I Q E V  
 510 550 600  
 TTGGAACTGCTATAGCATTCAAAGTGTATTAAACATCCCTCTCTGGCGGCACTCTCATTACTCGGTTGGATACCCCTCATTTTTTGACATTACATT  
 L G T A I A F K V L L N I P L W A G T L I T A V D T L T F L T L H  
 610 650 700  
 TGCTGCAGGTAICAGAGTACTGGAAGCCTTTATATTCATACTATCTTAAGCATGATGGCGTCTCTTTATAGACATGGCGATTTCAGCGCCCCCAGC  
 L L H G I R V L E A F I F I L I L T M M A C F F I D M A I S A P P A  
 710 750 800  
 TGTGGACATCTTTAAGGGCTTCATTCCTATGGTGGCTAGTTATGCGACTATGCAAAATGGTTGGTCTTATTTGGCGCAGTTATTATGCCGCATAACCTCTAC  
 V D I F K G F I P M V A S Y A T M Q M V G L I G A V I M P H N L Y  
 810 850 900  
 CTGCACTCGGCAITGACAGGCTCTCGCAAGATAGATAGAAGCGAGGAGGAACATCCAGCAAGTAACAAGTACTTTTTTCATCGATTCAACATCATCTCT  
 L H S A L T G S R K I D R S E E R N I Q Q A N K Y F F I D S T S S  
 910 950 1000  
 TATCCGTATCTTTCCTCATCAACCTAGCCATGGTATCGGCTTTCGCCCATGGGATGTCTTCTCTCCAGTGCGCCACTCTCCCTCAAGGACCTCTCGCTG  
 L S V S F L I N L A M V S A F A H G M S S L Q C A T L P Q G P L A C  
 1010 1050 1100  
 CCTAGTTACTCCCGAAGATTGGGATCGTTCGGTGTGCAGCCCGAGTATGACAGTTCGCCAGTGCATACTCTCTGAAGGTATTGCCGGAGTATGCGCCAGC  
 L V T P E D W D R S V C S P S D A A C Q C H T P E G I A G V C A S  
 1110 1150 1200  
 ATCGGCTTGAGAACCGCGGGTGCAGTGGCTGCAGTATGATTTTCGGTGGTGAAGTACATCTTCGCTGTTGGCATATTGGCGGCTGGTCAAGCAA  
 I G L E N A A G A L A A V M Y F G A V K Y I F A V G I L A A G Q A  
 1210 1250 1300  
 GTACTCTTACCGTACTTTGGCTGGCCAATACGTGATGGAAGGATTCATGAGGTGGAAGATTCJAATGTGTTCCGTGTGCTCATCTACTAGAACGATTGC  
 S T L T G T L A G Q Y V M E G F M R W K I P M W F R V L I T R T I A  
 1310 1350 1400  
 ACTAGGACCGCCCTAGCATTCTGATCTCTGCAGGGTAAATCAGAGCCATGAATGGAGTAAACCGGTGGTGAATATTCTTCAGTTCGATTTCAGCTTCCT  
 L G P A L A F A I L Q G E I R A M N G V N A W L N I L Q S I Q L P  
 1410 1450 1500  
 TTCGCTTTGTTGCCAGTGTGCACTTCTCGATGAGCCGTGAAGTGTGGGAAGATTCTGATCTCGCCGCTTCTGGACAGCCGTAATGTGGATTCTTGGCT  
 F A L L P V L H F S M S R E V L G R F V I G R F W T A V M W I L A  
 1510 1550 1600  
 GCCTAGTAATTGTTCAACTTCTATCTGTTATTGAGACTATCATCCCTCTGAATTGGCCATGGTACGTTTGGGTAATCTCGCCATCGTGGCATGCCT  
 C L V I G V N F Y L V I E T I I P L N W P W Y V W V I L A I V A C L  
 1610 1650 1700  
 CTATCTTTGGCTCTGCATTCTTGTGTCAAGGAAGATCTGATCGGTGCCGTAGGAAGTTTTGGCTCGATCTGCTGCTTCCATAGAAGCATCTCAAGT  
 Y L W L C I S C V K E D L M G A A R K V F G R C A A S I E A S STOP

FIGURE 1. Nucleotide and deduced aa sequence of *PmNramp* cDNA including 5' and 3' UTRs (indicated in gray shadow) and 0.5-kb upstream of the transcription start. Sequence analysis upstream of the starting cDNA did reveal the presence of a putative TATA box at the -162 position (boxed sequence). The start and stop codon are underlined in the nucleotide sequence.



```

1710          1750          1800
ATCCTCCATATGCTTTTGTGACTAGATTTGCGTCTTATTAGTCAAGACTTTTCGTATCCGGTATTCAGTGTGTC AATCTACTTTTGTTTGTACATA
1810          1850          1900
CTTGGCGTACGTACATACGGATCGCAAAAACGCCTCGTCTTATGAAGTTCGGATCTTACGTCGAGCGGTGTTGGGATATGTCATCGTCGACCAC TGACTT
1910          1950          2000
GAGGTC AAGTTCAGT GAGCGT TTTATCATT CGAATAGAGT TTTCTCTACGAAGTATCGACAGTGATGCTCCGGTCTATCGCCTGGAGGATCATTAG
2010          2050
FACGTTTTGTGGCACTCGTAGTCGATCTCTATTTTTTCTGACGGTTCGCTTTTGAGGATTTTACAAGCGACAACGGTTCACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

FIGURE 1. Continued

HAM base medium: (1) fetuin (1.7 mg/ml) (control); (2) fetuin (3 mg/ml) + DFO (0.02 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri); (3) fetuin (1.7 mg/ml) + iron (Cl<sub>2</sub>Fe, 100  $\mu$ M; 15 times the concentration in the culture medium); and (4) fetuin (1.7 mg/ml) + manganese (Cl<sub>2</sub>Mn, 10  $\mu$ M; 500-fold the concentration in the culture medium) (Fisher Scientific, Newark, Delaware) (Gauthier and Vasta, 1994; Gauthier et al., 1995). In both controls and treatments, the defined culture medium includes fetuin, the major protein component of FBS that enhances parasite growth (Gauthier et al., 1995), and it was used to prevent potential effects from unknown FBS components on the expression of *PmNramp*. Cultures were harvested over time (every day for 5 days or every other day for 10 days, depending on the experiment), total RNA isolated as above, and *PmNramp* expression examined by Northern blot analysis. Band intensity was assessed using the public domain NIH ImageJ program developed at the U.S. National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ni-image/>). *Perkinsus marinus* growth was monitored as reported elsewhere (Gauthier and Vasta, 1995). Experiments were run in duplicate.

#### Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *PmNramp* expression

*Perkinsus marinus* trophozoites are phagocytosed by hemocytes and remain in a phagosomelike structure, where they are likely to be exposed to exogenous sources of oxidative stress. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been shown to have effect on *P. marinus* viability (Schott et al., 2003); *P. marinus* trophozoites prepared in DME–HAM base medium supplemented with fetuin (1.7 mg/ml) were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.0 mM) for 30 min. After the exposure time, cells were maintained at 28 C and harvested over time (t = 0, t = 45 min, t = 90 min, and t = 180 min), and *PmNramp* expression analyzed by Northern blot as above.

## RESULTS

#### cDNA sequence of *PmNramp* and protein analysis

PCR amplification of *P. marinus* cDNA with degenerate primers based on TM4 and TM6 of homologous sequences

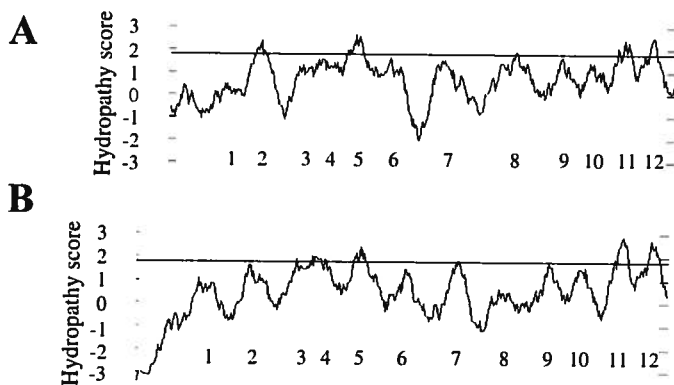


FIGURE 2. Analysis of deduced aa sequences of *Perkinsus marinus* (A) and *Plasmodium falciparum* (B) Nramp homologues. Hydropathy (y-axis) profiles (Kyte and Doolittle, 1982) were calculated using a 19-residues sliding window; the position of the 12 predicted TM segments (Table II) is indicated by numbers.

yielded several amplicons, which were cloned and sequenced; 1 of them was revealed to be a putative *Nramp* homologue in *P. marinus*. RT-PCR confirmed the presence of *PmNramp* message in *P. marinus* cells grown in both standard medium and standard medium surcharged with iron (data not shown). The *PmNramp* cDNA was 2,082-bp long, with a coding sequence of 1,674 bp encoding a putative protein of 558 aa with a predicted relative molecular mass, *M<sub>r</sub>*, of 60.7 kDa. The deduced aa sequence of PmNramp contained the canonical motifs of this family of transporters (Fig. 1). Several phosphorylation sites were predicted (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) within the first 30 aa of the protein. In addition, the N-glycosylation site predicted in the extracellular loop 7/8 of other Nramp transporters was not predicted for PmNramp.

Several complementary approaches were used to predict a consensus PmNramp TM topology (Möller et al., 2001). Implementation of a sliding window (corresponding to 19 aa residues—the approximate length of a TM helix) using the Kyte and Doolittle hydrophobicity scale (Kyte and Doolittle, 1982) (e.g., <http://www.bio.davidson.edu/courses/compbio/flc/home.html>) revealed that PmNramp is constituted of at least 11 hydrophobic segments, 5 being higher than a hydropathy threshold of 1.8 (Fig. 2A). The dynamic programming algorithm Memsat (Jones et al., 1994; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psiform.html>) predicted 2 possible topologies with similar high scores (11 helices, N-extracytoplasmic, score = 39.5 and 12 helices, N-intracytoplasmic, score = 39.4). Finally, the best score calculated with a Hidden Markov-based model that distinguishes 7 possible structural states within a TM polypeptide chain (TMHMM, [Möller et al., 2001], <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) was obtained for a topology including 11 TM helices with the N-terminus extracytoplasmic. However, manual inspection of TMHMM output data revealed, similar to the Memsat prediction, the possibility of an additional TM segment with relatively low hydrophobicity at the beginning of the protein (TM segment 1), which would place the N-terminus inside the cytoplasm and followed by 12 TM segments (Table I).

The *P. falciparum* Nramp homologue (Gardner et al., 2002) was predicted to have the amino terminus intracytoplasmic followed by 12 TM domains with Memsat algorithm, whereas the TMHMM prediction identified only 11 TM segments, placing also the N-terminus intracytoplasmic. Inspection of the Kyte and Doolittle hydrophobicity profile (Fig. 2B) revealed that similar to PmNramp, the segment with minimal hydrophobicity was not predicted to span the membrane using TMHMM; however, examination of the output revealed a putative TM segment 8 that would restore a global topology very similar to that predicted for PmNramp, placing the C-terminus intracytoplasmic (Table I).

Previous data with mouse Nramp1 protein demonstrated that

TABLE 1. Overall topology and positions of the TM domains predicted in *Perkinsus marinus* and *Plasmodium falciparum* Nramp according to TMHMM and Memsat approaches.

<i>Perkinsus marinus</i>			<i>Plasmodium falciparum</i>	
TMHMM	Memsat	Localization	TMHMM	Memsat†
62–82‡	60–84	IL 1 TM 1	229–250	231–247
94–116	97–113	EL 1–2 TM 2	274–296	275–291
136–158	143–167	IL 2–3 TM 3	321–343	321–345
173–195	175–192	EL 3–4 TM 4	345–367	353–370
200–222	203–222	IL 4–5 TM 5	382–404	380–399
242–264	246–266	EL 5–6 TM 6	424–441	422–439
285–307	291–309	IL 6–7 TM 7	469–491	468–487
369–391	369–391	EL 7–8 TM 8	516–534‡	512–529
420–437	421–437	IL 8–9 TM 9	558–575	558–575
447–469	453–470	EL 9–10 TM 10	585–607	586–606
482–504	487–505	IL 10–11 TM 11	620–642	623–645
514–536	515–536	EL 11–12 TM 12	652–674	652–676
		IL 12		

\* IL, intracellular loop; TM, transmembrane; EL, extracellular loop.

† A sequence truncated (N term-212 residues) was used for this analysis.

‡ Results edited manually on the basis of calculated probabilities values.

both the N- and C-termini are intracytoplasmic and that the protein is glycosylated, presumably in the predicted extracellular loop between TM segments 7/8 (Vidal et al., 1996); cell surface exposure of this loop 7/8 was demonstrated with the paralogous Nramp2 protein (Picard et al., 2000). Intracellular location of the N-terminus was confirmed with the human Nramp1 protein (Roig et al., 2002), and the orientation from inside toward outside the cytoplasm of the 11th TM segment was shown using the yeast homologue SMF3p (Portnoy et al., 2000). A more systematic investigation with bacterial MntH (proton-dependent manganese transporter) homologues showed that the loop between the TM domains 1/2 is extracytoplasmic using the Gram-negative *E. coli* MntH A protein and the Gram-positive *Enterococcus faecalis* MntH C $\beta$  homologue; the C-terminus of *E. coli* MntH A (end of the 11th TM segment) was also shown to be extracytoplasmic (Richer et al., 2003; P. Courville and M. F. M. Cellier, unpubl. data).

Given the remarkable sequence conservation in areas of predicted TM segments of MntH and Nramp homologues and their conserved function in divalent metal transport in both prokaryotes and eukaryotes, it appears on the basis of these analyses that the most likely topology for PmNramp and PfNramp includes 12 TM domains and both extremities located within the cytoplasm. The large loop between predicted TM segments 7/8 in animal Nramp sequences that is glycosylated in mature proteins is present (and longer) in PmNramp but not in *Plasmodium* spp. sequences.

## Gene organization

The *PmNramp* ORF was isolated from a *P. marinus* gDNA library using colony hybridization-based screening. The genomic region containing the *PmNramp* gene was covered in a contig consisting of 4 fragments (pPmNramp21111*Sal*I-10, pPmNramp21111*Sal*I-3, pPmNramp21111*Xho*I-5, and pPmNramp62111*Sal*I-3.0) originated from 2 lambda-DASH clones (Fig. 3A). The sequence reported in this study has been assigned the GenBank accession number AY324383. Alignment of the cDNA sequence with the genomic sequence identified 7 exons (4 in phase 2 and 2 in phase 1) interrupted by 6 short introns (Fig. 3A). The translational start codon was within the exon 1 and the termination codon (TGA) was located in exon 7, with no recognizable polyadenylation signal. The introns were very short in size (44–61 bp) with the canonical splicing signal GT/AG present in all of them (Table II). Sequence analysis upstream of the starting cDNA did reveal the presence of a putative TATA box at the –162 position, with a probability of 0.14 (Frith et al., 2001) (Fig. 1). After hybridization with *PmNramp* probe, most of the enzymatic restrictions of *P. marinus* gDNA, resulted in a single band, consistent with a single copy gene (Fig. 3B).

The exon–intron organization of *PmNramp* is not conserved with *Plasmodium* spp. *Nramp* genes, which are intronless. The *Nramp* gene found in another apicomplexan, *T. gondii*, shares more similarity with *PmNramp*; it encodes a polypeptide show-

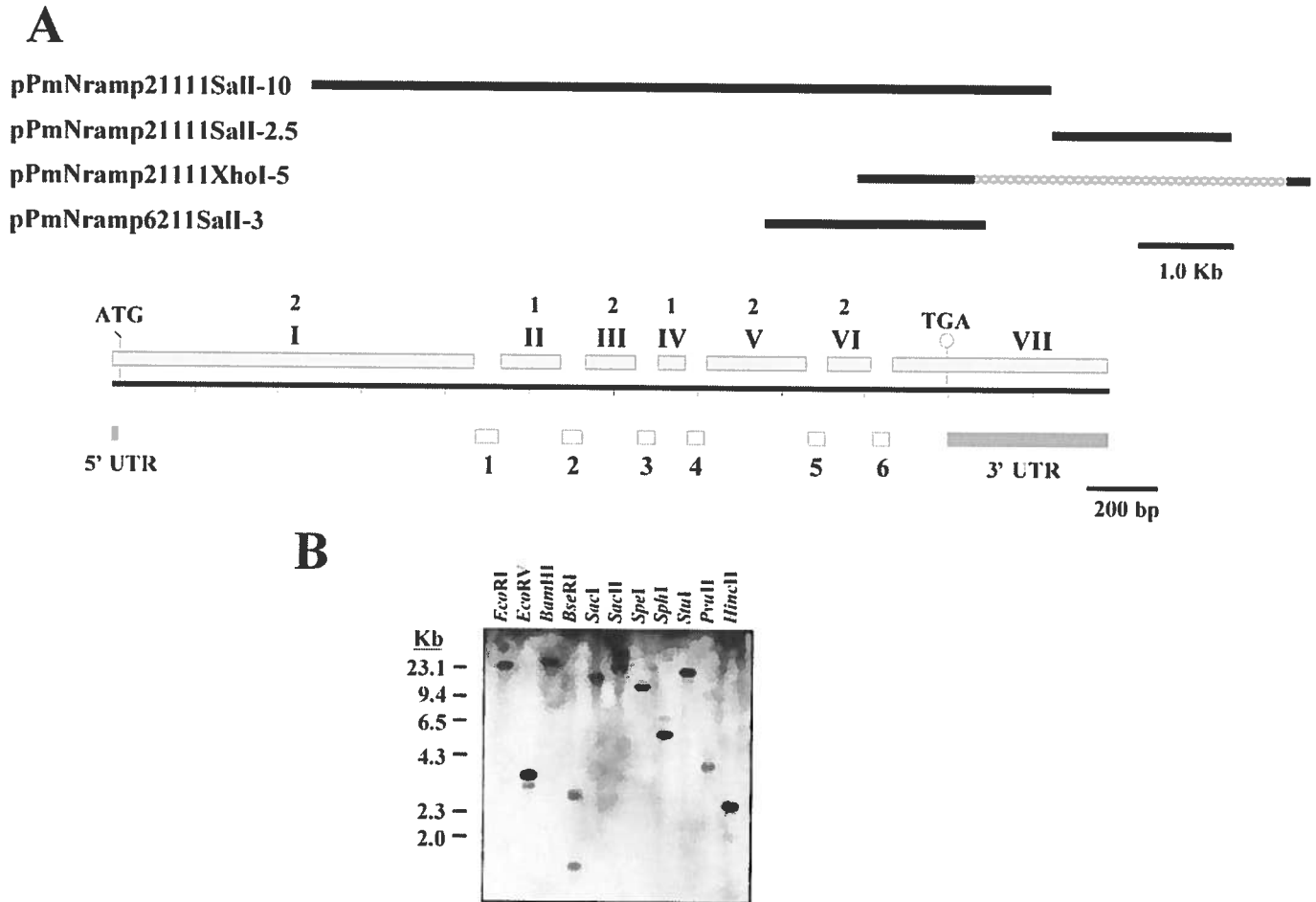


FIGURE 3. *PmNramp* gene organization and copy number. **A.** Lambda clones used for *PmNramp* gene characterization and *PmNramp* gene structure. Gray stands for unfinished sequence. **B.** Southern blot analysis of the *PmNramp* gene. *Perkinsus marinus* gDNA (8  $\mu$ g/lane) was digested with *Bam*HI, *Bse*RI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Pvu*II, *Sac*I, *Sac*II, *Spe*I, *Sph*I, and *Sst*I. Fractionated on 1.0% agarose gel, and nucleic acid hybridization was performed using the  $^{32}$ P-labeled *PmNramp* cDNA probe.

ing higher-level aa identity with PmNramp (compared with PfNramp and despite absence of the long extra-loop 7/8 in TgNramp) and it is also spliced in several exons. However, the position of the splicing sites is not conserved between *PmNramp* and *TgNramp* or the type or size of corresponding introns.

#### Phylogenetic analysis

Nramp proteins define an evolutionary ancient family of proton-dependent membrane transporters of ubiquitous metal ions.

Most species possess Nramp homologues showing sequence relationship generally congruent with the known-species phylogeny based on small subunit RNA genes and genome content. In Eukarya, an early Nramp gene duplication likely occurred before the divergence of Mycetozoa, plant, and animal kingdoms, resulting in 2 Nramp types. A type I or "prototype" Nramp that is still found in Mycetozoa, alga and plants, yeast, and Insecta and a type II or "archetype" Nramp that is present in Mycetozoa, plants, Insecta, and vertebrates; both urochordates and vertebrates appear to have conserved only the arche-

TABLE II. Exon-intron boundaries and sizes of *PmNramp* gene.

Exon number	Exon size (bp)	Splice acceptor	Intron size (bp)	Splice donor
I	871	—	—	AGGCTAACAAGtgcgcactc
II	146	tgtcctttagTACTTTTTC	61	ACTCCGAAGgtactttctt
III	124	tctcattcagATTGGGATCG	55	CTGCAGTCATgtcggaagtt
IV	74	ctctcgatagTATTTCGGT	47	ACTCTTACCGgtgagattg
V	241	ctcctttagTACTTTGGC	45	TGTTGGGAAGgtgggctct
VI	111	tacgtgctagATTCGTCATC	46	ATTGGCCATGgtgagagtct
VII	516	tcctctacagTACGTTTGG	44	—

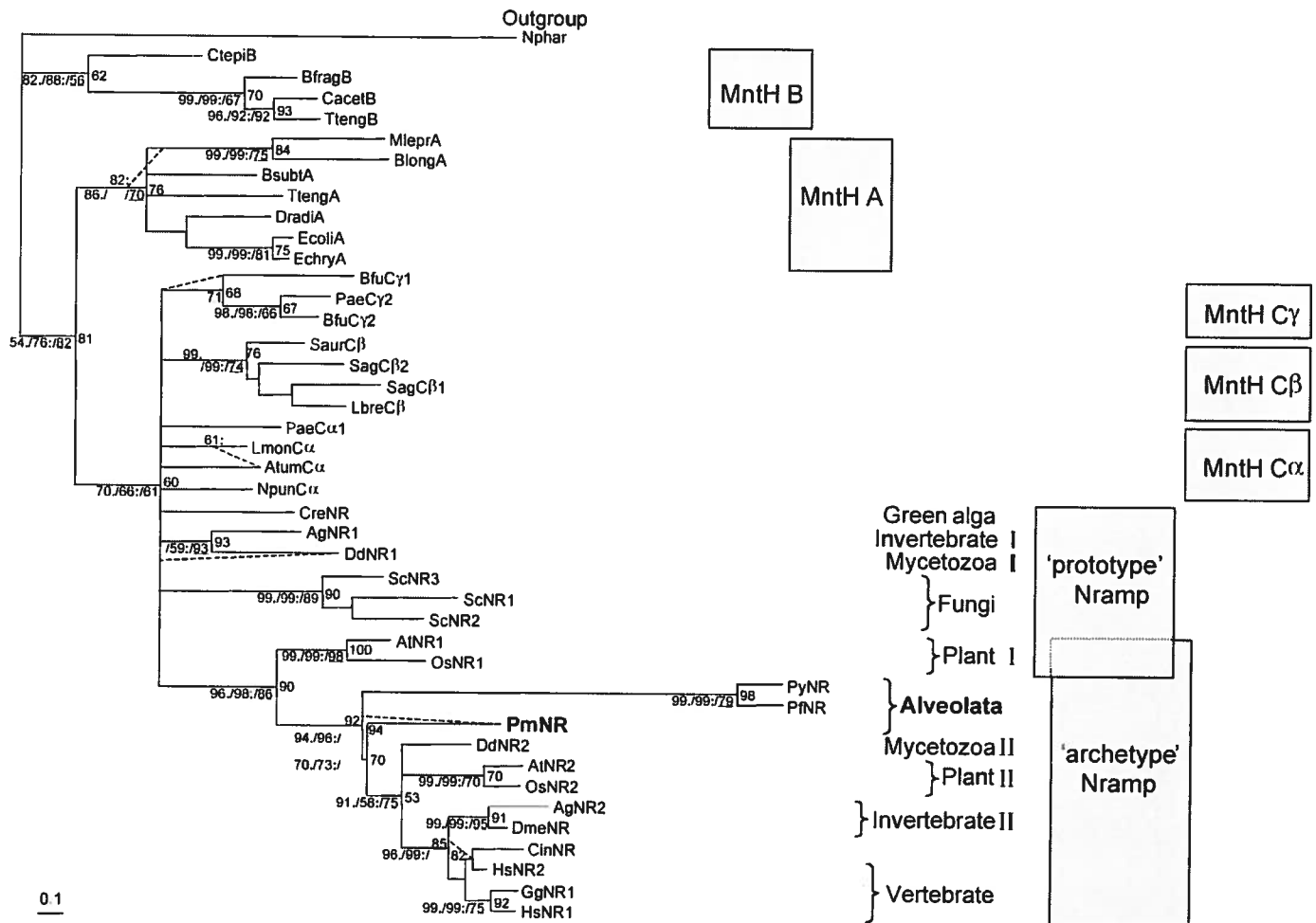


FIGURE 4. ML phylogenetic analysis of Alveolata (*Perkinsus marinus* and *Plasmodium* species) Nramp sequences. Analyses were performed as described in the experimental section. The level of statistical confidence for each node is indicated with percent numbers: at the right of the node (the bootstrap value for the ML tree using the Blossum 62 matrix) and at the left of the node, a series of 3 numbers designate bootstrap values for the ML tree using the TT matrix (underline), for the ME tree (:), and the MP tree (.). Bootstrap values for ML, ME, and MP left-to-right. Nodes without numbers indicate little congruency between these approaches; in some cases an alternative branching is shown by an additional dotted branch and the corresponding statistical support indicated. The scale of 0.1 replacement per site is indicated. *Perkinsus marinus* and Apicomplexan Nramp sequences group together at the base of eukaryotic Nramp II group with strong support (>92), and *Plasmodium* species sequences have diverged considerably more than *P. marinus* Nramp. Apicomplexan Nramps: PfNR (*P. falciparum* Nramp) and PyNR (*P. y. yoelii* Nramp); Perkinsozoa Nramp: PmNR (*P. marinus* Nramp).

type Nramp (Richer et al., 2003). The identification of a *P. marinus* sequence similar to Nramp and the existence of putative homologues in the Apicomplexa provides the opportunity to determine whether *P. marinus* Nramp sequence relationships are congruent with its known phylogeny.

Initially, 118 full-length sequences were used to produce an unrooted NJ tree. The sequence from *P. marinus* was found close to a group of 3 apicomplexan sequences (*P. falciparum*, *P. yoelii yoelii*, and a fragment from *T. gondii*), segregating with Nramp type II sequences. The apicomplexan group diverged at the base of the archetype Nramp cluster; *P. marinus* and *Dictyostelium discoideum* type II, each diverging shortly after. To increase the significance of phylogenetic analyses, a set of parsimonious, informative sites was derived from the full-length alignment and used to analyze the relationship of *P. marinus* and 2 apicomplexan sequences with 40 sequences repre-

sentative of the major MntH and Nramp groups by 3 different methods.

The ML unrooted tree obtained using the Blossum 62 substitution matrix is shown in Figure 4. As established previously, 4 major groups are observed: MntH group B, MntH A, the multifurcating cluster MntH C—prototype Nramp, and the archetype Nramp group (Richer et al., 2003). Significantly, the Alveolata sequences group together, diverging at the base of the archetype Nramp group comprising type II sequences from Mycetozoa (*D. discoideum*), plants (*Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*), Insecta (*Anopheles gambiae*, *D. melanogaster*), the urochordate *Ciona intestinalis*, and Vertebrata (*Gallus gallus*, *H. sapiens*). This indicates that *Perkinsus* and apicomplexan Nramp genes derive from a common archetype Nramp ancestor.

The divergence between *Perkinsus* and *Plasmodium* species

sequences was resolved with confidence as 3 unrelated approaches give nearly identical results and the fourth approach (ML JTT) is highly consistent with the others. In 3 instances, the apicomplexan sequences (P<sub>YNR</sub>, P<sub>FN</sub>) diverge from *Perkinsus* sp. sequence and the rest of the archetype Nramp group (excellent bootstrap scores: 94, 96, and 94). *Perkinsus* sp. sequence is shown diverging shortly after (lower support 70, 73, and 70). Alternatively, there is trifurcation of *Perkinsus* and Plasmodia and the rest of archetype sequences (high bootstrap score of 92). The grouping of *Perkinsus* and *Plasmodium* species Nramp appears consistent with these species phylogeny.

The strong divergence of *Plasmodium* spp. Nramp sequences is also reflected by sequence similarity (BLAST) analyses. Both PmNramp and TgNramp exhibit scores with plant or animal Nramp, in the range of 254–384 bits (range  $3e^{-66} \geq E \geq 1e^{-105}$ ), whereas PfNramp exhibits lower scores in the range of 157–232 bits ( $7e^{-37} \geq E \geq 2e^{-50}$ ); the BLAST comparison score between PmNramp and PfNramp (161 bits;  $E = 5e^{-38}$ ) is also inferior to that obtained with TgNramp and PfNramp (251 bits;  $E = 4e^{-65}$ ).

It is worth noting that the closest homologues of *Perkinsus* and *Plasmodium* species sequences are plant and *D. discoideum* archetype Nramp. Plants and Mycetozoa diverged early in evolution of eukaryotes, and apicomplexan species do share with the plant kingdom the possession of chloroplastlike organelles. In the case of *Perkinsus* species, it is not known whether they also possess a chloroplastlike organelle. Nevertheless, the position of the group of Alveolata sequences, including *Perkinsus* sp., could reflect their common ancestry with plants.

#### Effect of cation depletion and repletion on *PmNramp* expression

We examined the expression of *PmNramp* by Northern blot in *P. marinus* cells exposed to either the iron chelator DFO or to high concentrations of iron or manganese. Both replicates showed the same trend, with a displacement of the peaks of expression. Treatment of the cells with DFO resulted in a significant downregulation of *PmNramp* expression during the first 24 hr (approximately 20% of the control), followed by a dramatic upregulation during the next 5 days, reaching a 3-fold increase over the unexposed control values (Fig. 5A). This *PmNramp* expression pattern was accompanied of a substantial reduction of *P. marinus* growth (20%), which was in the range of the previously reported growth inhibition value for this siderophore (Gauthier and Vasta, 1994). Expression of *P. marinus* superoxide dismutase 1 (*PmSOD1*) and *P. marinus* superoxide dismutase 2 (*PmSOD2*), which were monitored for comparative purposes, showed the same trend, although with a less-marked increase (data not shown). Subsequently, we examined the effect of iron or manganese repletion on *PmNramp* expression. Addition of iron to the culture medium resulted in a gradual downregulation of *PmNramp* expression during the log phase of growth (<25% of the control value after 6 days), followed by a moderate increase as cells entered the stationary phase, and leveling up for the next 2 days (Fig. 5B). In contrast, the pattern of expression of *PmNramp* upon addition of manganese to the culture only showed moderate changes (> or <25% relative to the control values) during the log phase of growth, with a gradual increase upon entering stationary phase, to reach val-

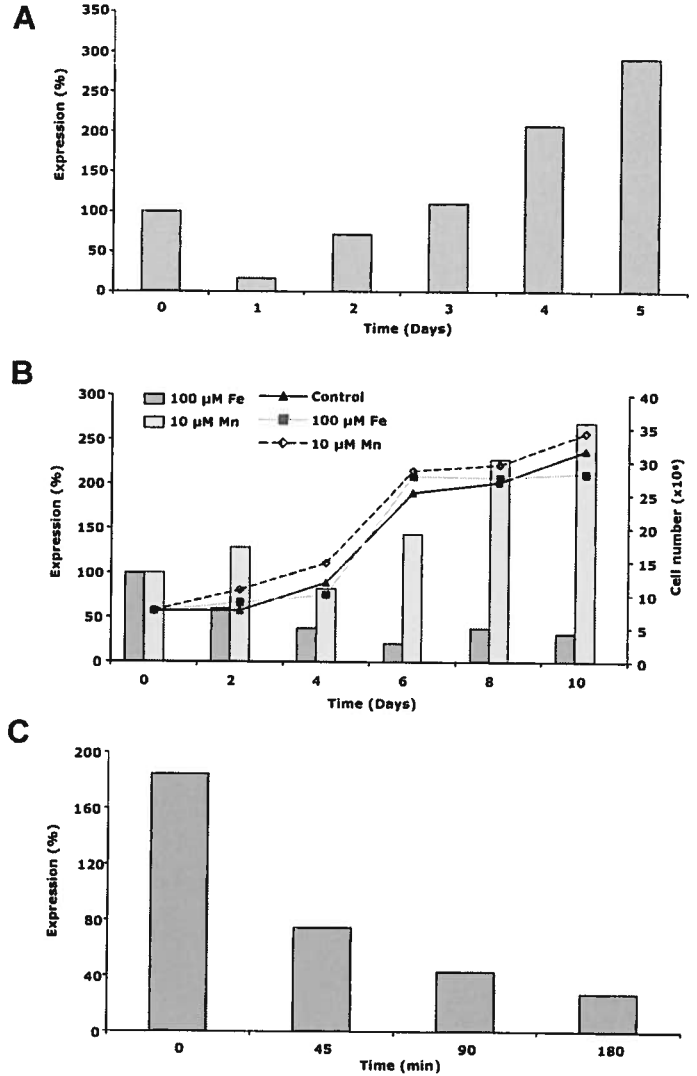


FIGURE 5. Effect of DFO, metal repletion, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure on *PmNramp* expression. *Perkinsus marinus* total RNA (1.0–2.0 μg) was fractionated on 1.4% formaldehyde agarose gel, probed with *PmNramp* <sup>32</sup>P-labeled cDNA, and band intensities analyzed using the NIH ImageJ program; expression is indicated as percentage of the control. A. Effect of DFO on *PmNramp* expression. B. Effect of iron and manganese repletion on *PmNramp* expression and growth profiles of *P. marinus* trophozoites. C. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *PmNramp* expression.

ues almost 3-fold over the control (Fig. 5B). No difference was observed on the growth-curve profiles of the iron- or manganese-replenished media as compared with the control (Fig. 5B).

#### Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *PmNramp* expression

Exposure of *P. marinus* cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the culture medium for 30 min, resulted in immediate upregulation of *PmNramp* expression, followed by a gradual decrease during the 3-hr experimental period (Fig. 5C). Similar expression profiles were observed with *PmSOD1* and *PmSOD2* (data not shown). It is noteworthy that our current studies (Schott et al., 2003) indicate that *P. marinus* is tolerant to exposure to ROSs, showing no significant change in viability upon exposure to 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 60 min.

## DISCUSSION

The redox-active metals, iron and manganese, are required for activity of enzymes involved in protection against oxidative stress and for energy metabolism. Iron-binding proteins reduce the *in vitro* *P. marinus* proliferation in a dose-dependent manner (Gauthier and Vasta, 1994), and iron also appears to be involved in the protection against oxidative stress and in energy metabolism in *P. marinus* (Wright et al., 2002; Schott and Vasta, 2003; Schott et al., 2003). This information led us to investigate the presence of cation transporters in *P. marinus* as a first step to assess their potential role(s) in the competition for critical metal cofactors between the internalized *P. marinus* trophozoites and the host's phagocytic hemocytes, and to gain insight into the linkage between iron metabolism and oxidative stress. Thus, we identified in *P. marinus* a homologue of the mammalian *Nramp* genes and described its organization and expression under cation depletion and repletion and under exogenous oxidative stress. This is the first report on functional studies of an *Nramp* homologue for any protozoan parasite.

Degenerated primers derived from *Slc11a1* homologues amplified not only a putative *Nramp* homologue in *P. marinus* but also in *C. virginica* (J. A. F. Robledo and G. R. Vasta, unpubl. data). Southern analysis with *PmNramp* probe was consistent with a single copy gene, in agreement with the sequence annotation of *P. falciparum* and *P. y. yoelii* genomes that identified single copies of the putative *Nramp* homologues (Gardner et al., 2002). However, because *D. discoideum* prototype and archetypal *Nramp* genes share less than 60% nucleotide sequence identity, compared with 85% identity between mammalian *Nramp1* orthologs or 70% identity between mammalian paralogues, the presence of a divergent prototype *Nramp* in *Perkinsus* remains possible. Similarly, BLAST analysis of *PmNramp* homologue against *T. gondii* database ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/T\\_gondii/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_gondii/)) returned several matches. The genome sequence of *T. gondii* is being generated from a haploid life stage; however, whether it has more than 1 *Nramp* homologue is pending on the parasite's genome closure.

The final 10,298-bp contig contains the complete *PmNramp* locus and 2 putative partial ORFs; BLAST analysis of the genomic region downstream of *PmNramp* resulted in a significant match with the 26S proteasome regulatory subunit 7, corresponding the highest hit to *P. falciparum* (E value  $2e^{-76}$ ). BLAST analysis upstream of *PmNramp* gene resulted in low score to the folate solute carrier family 19 (*Slc19a1*), and this finding requires further investigation. Although very preliminary, these results suggest that the signal-noise ratio in the *P. marinus* genome may be in the range of apicomplexan parasites (Gardner et al., 2002). *PmNramp* introns were very short in size with the canonical splicing signal GT/AG present in all of them. Both features, canonical splicing signals and short intron size, were also observed in previous characterized *P. marinus* genes (*PmSODs*) (Schott et al., 2003), and the latter appears to be a shared feature of genes from eukaryotic parasites (Vivares and Metenier, 2000).

*Perkinsus marinus* clusters with the Chromoalveolata, a protistan clade that is related to both the dinoflagellates and the apicomplexan, including *Plasmodium* and *Toxoplasma* spp. On the basis of sequence analyses of the genomes of chloroplasts and plastids, it was proposed that the Chromoalveolata derived

from a common ancestor resulting from the secondary endosymbiosis of a red alga, having themselves initially diverged from the primary endosymbiotic organism that gave rise to the red algae, green algae, plants, and glaucocystophytes (McFadden, 2000; Archibald and Keeling, 2002). The grouping of *P. marinus* *Nramp* sequence with *Plasmodium* and *Toxoplasma* species sequences and their relative distant relationships, both appear consistent with *P. marinus* phylogeny. The positioning of the Alveolata *Nramp* group between plants I and II *Nramp* groups is also consistent with the proposed common ancestry of plants and Alveolata.

Phylogenetic evidence implicates the evolution of *Nramp* transporters in the adaptation to oxidative stress environments, including those developing during infection of high eukaryotes (Cellier et al., 2001). So far, all species described within the Perkinsids group are parasites of either microeukaryotes (*Parvilucifera* sp. and *Cryptophagus* sp.) or mollusks (*P. marinus*) (Levine, 1978; Norén et al., 1999; Brugerolle, 2002). *Perkinsus marinus* resides, at least during part of its life cycle, inside in the oyster hemocytes. Interestingly, phagocytosis of live *P. marinus* fails to produce the typical chemiluminescent response (Anderson, 1999), suggesting that *P. marinus*-derived antioxidant factors may play an active role on parasite survival. The available evidence suggests that PmSODs may be part of this detoxification mechanism, and iron is the required cofactor for these enzymes (Wright et al., 2002; Schott et al., 2003). Iron has been shown as a critical determinant of virulence for microbial pathogens and parasites (Weinberg, 1999) and the membrane transporter *Nramp* has been implicated in "nutritional immunity," a process where sequestration of iron, and possibly other metals, takes place as a nonspecific host response to infection (Beisel, 1977). The presence of homologous iron transporters in both *P. marinus* and the oyster suggests a "tug-of-war" for iron between host and parasite. Our results indicate that expression of *PmNramp* in *P. marinus* trophozoites is upregulated immediately upon exposure to exogenous oxidative stress, suggesting that increasing uptake of iron (or manganese or both) would protect the trophozoite against ROSs, in their roles as cofactors of detoxifying enzymes (Schott and Vasta, 2003) and other metabolic activities that may require these metals.

*Nramp* homologues have the ability to transport a broad range of divalent cations including iron and manganese (reviewed in Gruenheid and Gros, 2000). Similarly, expression of *PmNramp* was modulated by both iron and manganese, suggesting that these metals may be substrates for this transporter in *P. marinus*. Similarly, whereas 2 of the functionally distinct *S. cerevisiae* *Nramp* homologues (*Smf1p* and *Smf2p*) are involved in cellular accumulation of manganese, the product of the third copy (*Smf3p*) is downregulated by iron. The effects of iron depletion and repletion experiments on *PmNramp* expression are intriguing. The depletion of iron from the culture medium by DFO dramatically enhanced the expression of *PmNramp* to a 3-fold level higher than the control. Repletion of iron in the culture medium at a relatively high final concentration had the opposite effect. These results can be interpreted in light of the hypothesis for a potential competition between the host and the intravacuolar parasite for available iron: as the iron from the vacuole is sequestered by the host, the parasite increases its capability for iron acquisition by upregulating ex-

pression of *PmNramp*, to compete effectively in the tug-of-war for iron. An abundance of vacuolar iron would result in the opposite response. It is noteworthy that supplementing the culture with manganese instead of iron appears to have the opposite effect on *PmNramp* expression. The binding constant for deferoxamine-iron(III) is in the order of 10. The effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure on expression of *PmNramp* can be interpreted in light of our recent studies on the susceptibility of *P. marinus* to oxidative stress (Schott et al., in press). The immediate 2-fold enhancement of *PmNramp* expression upon exposure to ROSs could be aimed at sequestering iron from the vacuolar environment to prevent production of hydroxyl radicals from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the host through the iron-catalyzed Fenton-Haber Weiss reaction. The subsequent gradual decline could be linked to the parasite's ability to rapidly degrade superoxide anion through iron-dependent SODs (Frith et al., 2001; Archibald and Keeling, 2002; Wright et al., 2002) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the activity of ascorbate-dependent peroxidases (Schott et al., 2003). Because H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be rapidly degraded by *P. marinus*, in the absence of iron it would represent no serious threat to the parasite, and the expression of *PmNramp* could be downregulated subsequently. Both transport spectrum and regulation of *PmNramp* will require further detailed studies.

The role of iron as a factor in modulating virulence of bacterial pathogens and parasites is well documented (Weinberg, 1999). Iron availability conditions the outcome of protozoan infections, and it has provided the basis for therapies either by direct iron chelation or by its additive or synergistic activity together with other antiprotozoan drugs or by both (Cabantchik et al., 1996; Pradines et al., 2002). The identification and preliminary characterization of *PmNramp* reported in this study is the first step in the study of transport specificity, intracellular location, and potential polymorphism(s). It has been proposed recently that a rigorous examination of character states among the morphostatic lineages within the Alveolata may provide new insight into their evolutionary relationships (Leander and Keeling, 2003). At a molecular level, a better understanding of this transporter in *Perkinsus* spp. should also provide further insight into the evolution of parasitism within the Alveolata.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Supported by ICB program from the National Science Foundation, and Grant NA90AA-D-SG063 awarded by NOAA through the Maryland Sea Grant to G.R.V. and Grant 78014 from the Canadian Institutes of Health Research (M.F.M.C.).

#### LITERATURE CITED

- ANDERSON, R. S. 1999. Lack of hemocyte chemiluminescence stimulation by *Perkinsus marinus* in eastern oysters *Crassostrea virginica* with Dermo diseases. *Journal of Aquatic Animal Health* 11: 179–182.
- ANDREWS, J. D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950–1984. *Journal of Shellfish Research* 15: 13–16.
- ARCHIBALD, J. M., AND P. J. KEELING. 2002. Recycled plastids: A “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* 18: 577–584.
- BEISEL, W. R. 1977. Magnitude of the host nutritional responses to infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 30: 1236–1247.
- BLACKWELL, J. M., T. GOSWAMI, C. A. EVANS, D. SIBTHORPE, N. PAPO, J. K. WHITE, S. SEARLE, E. N. MILLER, C. S. PEACOCK, H. MOHAMMED, AND M. IBRAHIM. 2001. Slc11a (formerly Nramp1) and disease resistance. *Cellular Microbiology* 3: 773–784.
- BORSON, N. D., W. L. SALO, AND L. R. DREWES. 1992. A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods and Applications* 2: 144–148.
- BRUGEROLLE, G. 2002. *Cryptophagus subtilis*: A new parasite of cryptophytes affiliated with the Perkinsozoa lineage. *European Journal of Protistology* 37: 379–390.
- CABANTCHIK, Z. I., H. GLICKSTEIN, J. GOLENER, M. LOVEVSKY, AND A. TSAFACK. 1996. Iron chelators: Mode of action as antimalarials. *Acta Haematologica* 95: 70–77.
- CARLTON, J. M., S. V. ANGIUOLI, B. B. SUIH, T. W. KOOU, M. PERTILA, J. C. SILVA, M. D. ERMOLAIEVA, J. E. ALLEN, J. D. SELENGUT, H. L. KOO, J. D. PETERSON, M. POP, D. S. KOSACK, M. F. SHUMWAY, S. L. BIDWELL, S. J. SHALLOM, S. E. VAN AKEN, S. B. RIEDMULLER, T. V. FELDBLYUM, J. K. CHIO, J. QUACKENBUSH, M. SEDEGAI, A. SHOABI, L. M. CUMMINGS, L. FLORENS, J. R. YATES, J. D. RAINE, R. E. SINDEN, M. A. HARRIS, D. A. CUNNINGHAM, P. R. PREISER, L. W. BERGMAN, A. B. VAIDYA, L. H. VAN LIN, C. J. JANSE, A. P. WATERS, H. O. SMITH, O. R. WHITE, S. L. SALZBERG, J. C. VENTER, C. M. FRASER, S. L. HOFFMAN, M. J. GARDNER, AND D. J. CARUCCI. 2002. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 419: 512–519.
- CELLIER, M., I. BERGEVIN, E. BOYER, AND E. RICHER. 2001. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends in Genetics* 17: 365–370.
- , G. PRIVE, A. BELOUCHI, T. KWAN, V. RODRIGUES, W. CHIA, AND P. GROS. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 10089–10093.
- CHU, F.-L. E. 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15: 57–66.
- D'SOUZA, J., P. Y. CHIEH, P. GROS, W. CHIA, AND V. RODRIGUES. 1999. Functional complementation of the malvolio mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1). *Journal of Experimental Biology* 202: 1909–1915.
- FORBES, J. R., AND P. GROS. 2003. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* 102: 1884–1892.
- FRITH, M. C., U. HANSEN, AND Z. WENG. 2001. Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* 17: 878–889.
- GARDNER, M. J., N. HALL, E. FUNG, O. WHITE, M. BERRIMAN, R. W. HYMAN, J. M. CARLTON, A. PAIN, K. E. NELSON, S. BOWMAN, I. T. PAULSEN, K. JAMES, J. A. EISEN, K. RUTHERFORD, S. L. SALZBERG, A. CRAIG, S. KYES, M. S. CHAN, V. NENE, S. J. SHALLOM, B. SUIH, J. PETERSON, S. ANGIUOLI, M. PERTEA, J. ALLEN, J. SELENGUT, D. HAFT, M. W. MATHER, A. B. VAIDYA, D. M. MARTIN, A. H. FAIRLAMB, M. J. FRAUNHOLZ, D. S. ROOS, S. A. RALPH, G. I. MCFADDEN, L. M. CUMMINGS, G. M. SUBRAMANIAN, C. MUNGALL, J. C. VENTER, D. J. CARUCCI, S. L. HOFFMAN, C. NEWBOLD, R. W. DAVIS, C. M. FRASER, AND B. BARRELL. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498–511.
- GAUTHIER, J. D., B. FEIG, AND G. R. VASTA. 1995. Effect of fetal bovine serum glycoproteins on the in vitro proliferation of the oyster parasite *Perkinsus marinus*: Development of a fully defined medium. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 307–313.
- , AND G. R. VASTA. 1994. Inhibition of in vitro replication of the oyster parasite *Perkinsus marinus* by the natural iron chelators transferrin, lactoferrin, and desferrioxamine. *Developmental and Comparative Immunology* 18: 277–286.
- , AND ———. 1995. In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: Optimization of the methodology. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 156–168.
- GREEN, E. D. 1997. *Genome analysis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 463 p.
- GRUENHEID, S., AND P. GROS. 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Current Opinions in Microbiology* 3: 43–48.
- GUNSHIN, H., B. MACKENZIE, U. V. BERGER, Y. GUNSHIN, M. F. ROMERO, W. F. BORON, S. NUSSBERGER, J. L. GOLLAN, AND M. A. HEDIGER. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482–488.

- HENIKOFF, S., AND J. G. HENIKOFF. 1993. Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* **17**: 49–61.
- JABADO, N., A. JANKOWSKI, S. DOUGAPARSAD, V. PICARD, S. GRINSTEIN, AND P. GROS. 2000. Natural resistance to intracellular infections: Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *Journal of Experimental Medicine* **192**: 1237–1248.
- JONES, D. T., W. R. TAYLOR, AND J. M. THORNTON. 1992. A new approach to protein fold recognition. *Nature* **358**: 86–89.
- , ———, AND ———. 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**: 3038–3049.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN, AND M. NEI. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244–1245.
- KYTE, J., AND R. F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**: 105–132.
- LEANDER, B. S., AND P. J. KEELING. 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 395–402.
- LEVINE, N. D. 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *Journal of Parasitology* **64**: 549.
- McFADDEN, G. I. 2000. Mergers and acquisitions: Malaria and the great chloroplast heist. *Genome Biology* **1**: reviews1026.1–1026.4.
- MÖLLER, S., M. D. CRONING, AND R. APWEILER. 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**: 646–653.
- MULERO, V., S. SEARLE, J. M. BLACKWELL, AND J. H. BROCK. 2002. Solute carrier 11a1 (Slc11a1; formerly Nramp1) regulates metabolism and release of iron acquired by phagocytic, but not transferrin-receptor-mediated, iron uptake. *Biochemistry Journal* **363**: 89–94.
- NOREN, F., Ø. MOESTRUP, AND A. S. REHNSTAM-HOLM. 1999. *Parvilicifera infectans* Norén et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): A parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology* **35**: 233–254.
- ORGAD, S., H. NELSON, D. SEGAL, AND N. NELSON. 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant malvolio. *Journal of Experimental Biology* **201**: 115–120.
- PERKINS, F. O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research* **15**: 67–87.
- PICARD, V., G. GOVONI, N. JABADO, AND P. GROS. 2000. Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool. *Journal of Biological Biochemistry* **275**: 35738–35745.
- PORTNOY, M. E., X. F. LIU, AND V. C. CULOTTA. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Molecular and Cell Biology* **20**: 7893–7902.
- PRADINES, B., F. RAMIANDRASOA, J. M. ROLAIN, C. ROGIER, J. MOSNIER, W. DARIES, T. FUSAI, G. KUNESCH, J. LE BRAS, AND D. PARZY. 2002. In vitro potentiation of antibiotic activities by a catecholate iron chelator against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 225–228.
- RICHER, E., P. COURVILLE, I. BERGEVIN, AND M. F. M. CELLIER. 2003. Horizontal gene transfer of “prototype” Nramp in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* **57**: 1–14.
- ROIG, E. A., E. RICHER, F. CANONNE-HERGAUX, P. GROS, AND M. F. CELLIER. 2002. Regulation of NRAMPI gene expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **71**: 890–904.
- ROSE, T. M., E. R. SCHULTZ, J. G. HENIKOFF, S. PIETROKOVSKI, C. M. MCCALLUM, AND S. HENIKOFF. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* **26**: 1628–1635.
- SAITOU, N., AND M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- SALDARRIAGA, J. F., M. L. MCFEWAN, N. M. FAST, F. J. R. TAYLOR, AND P. J. KEELING. 2003. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **53**: 355–365.
- SAMBROOK, J., AND D. W. RUSSELL. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. CSHL Press, New York, 18.125 p.
- SCHMIDT, H. A., K. STRIMMER, M. VINGRON, AND A. VON HAESLER. 2002. TREE-PUZZLE: Maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502–504.
- SCHÖTT, E. J., W. T. PECHER, F. OKAFOR, AND G. R. VASTA. 2003. Resistance of the protistan parasite *Perkinsus marinus* to reactive oxygen intermediates. *Experimental Parasitology* **105**: 232–240.
- , J. A. F. ROBLEDO, A. C. WRIGHT, A. M. SILVA, AND G. R. VASTA. 2003. Gene organization and homology modeling of two iron superoxide dismutases of the early branching protist *Perkinsus marinus*. *Gene* **309**: 1–9.
- , AND G. R. VASTA. 2003. The PmSOD1 gene of the protistan parasite *Perkinsus marinus* complements the *sod2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, and directs an iron superoxide dismutase to mitochondria. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**: 81–92.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, AND D. G. HIGGINS. 1997. The CLUSTALX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882.
- VIDAL, S. M., E. PINNER, P. LEPAGE, S. GAUTHIER, AND P. GROS. 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *Journal of Immunology* **157**: 3559–3568.
- VIVARES, C. P., AND G. METENIER. 2000. Towards the minimal eukaryotic parasitic genome. *Current Opinions in Microbiology* **3**: 463–467.
- WEINBERG, E. D. 1999. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 231–238.
- WRIGHT, A. C., H. AHMED, J. D. GAUTHIER, A. M. SILVA, AND G. R. VASTA. 2002. cDNA cloning and characterization of two iron superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **123**: 73–77.
- WYLLIE, S., P. SEU, AND J. A. GOSS. 2002. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. *Microbes and Infection* **4**: 351–359.



## Article 2

Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton co-transport *in vivo*, *Biochemistry* (2005) 44,726-733.

Dans cet article, j'ai créé et caractérisé l'expression fonctionnelle de 18 mutants à quatre positions qui sont spécifiques aux protéines de la famille Nramp. J'ai participé aux expériences se rapportant aux figures 1A, 2, supplemental data 2A et supplemental data 3 et j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

### Mise en contexte :

Étant donné la grande conservation de l'activité vis-à-vis des métaux et du H<sup>+</sup> par les différents homologues de la famille Nramp/MntH, nous nous sommes demandé si les résidus qui sont conservés dans la famille Nramp et dans l'outgroup mais différents entre ces deux groupes (mutations de type II) étaient impliqués dans le mécanisme d'action de la famille Nramp, en utilisant la protéine MntH d'*E. coli* (EcoliA) comme modèle d'étude. En utilisant une approche phylogénétique, nous avons identifié quatre sites correspondant à des mutations de type II entre homologues Nramp/MntH et l'outgroup. Les résidus présents chez EcoliA ont été substitués par ceux de l'outgroup D34G, N37T, H211Y et N401G. Ces résidus correspondent à une divergence fonctionnelle des homologues Nramp/MntH. Chacun des résidus identifiés est impliqué dans le co-transport du Me<sup>2+</sup> et du H<sup>+</sup>. L'analyse fonctionnelle des différentes mutations a permis de démontrer pour la première fois le co-transport de type symport chez un homologue bactérien de la famille Nramp/MntH.

# Identification of Functional Amino Acids in the Nramp Family by a Combination of Evolutionary Analysis and Biophysical Studies of Metal and Proton Cotransport *in Vivo*<sup>†</sup>

Roman Chaloupka,<sup>‡,§,||</sup> Pascal Courville,<sup>‡,§</sup> Frédéric Veyrier,<sup>‡</sup> Bjarne Knudsen,<sup>‡</sup> Thomas A. Tompkins,<sup>@</sup> and Mathieu F. M. Cellier<sup>\*‡</sup>

Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Bd des prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7, Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Florida 32611-8525, and Institut Rosell-Lallemand Inc., 8-480, boulevard Saint-Laurent, Montréal, Quebec, Canada H2P 2M5

Received September 14, 2004; Revised Manuscript Received October 14, 2004

**ABSTRACT:** The natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) family is functionally conserved in bacteria and eukarya: Nramp homologues function as proton-dependent membrane transporters of divalent metals. Sequence analyses indicate that five phylogenetic groups comprise the Nramp family, three bacterial and two eukaryotic, which are distinct from a more distantly related group of microbial sequences (Nramp outgroup). The Nramp family and outgroup share many conserved residues, suggesting they derived from a common ancestor and raising the possibility that the residues invariant in the Nramp family that correspond to residues which are different but also conserved in the outgroup represent candidate sites of functional divergence of the Nramp family. Four Nramp family-specific residues were identified within transmembrane domains 1, 6, and 11, and replaced by the corresponding invariant outgroup residues in the *Escherichia coli* Nramp ortholog (the proton-dependent manganese transporter, MntH of group A, EcoliA). The resulting mutants (Asp<sup>34</sup>Gly, Asn<sup>37</sup>Thr, His<sup>211</sup>Tyr, and Asn<sup>401</sup>Gly) were tested for both divalent metal uptake and proton transport; quasi-simultaneous analyses of uptake of metals and protons revealed for the first time protons and metals cotransport by a bacterial Nramp homologue. Additional mutations were studied for comparison (Asp<sup>34</sup>Asn, Asn<sup>37</sup>Asp and Asn<sup>37</sup>Val, Asn<sup>401</sup>Thr, His<sup>211</sup>Ala, His<sup>216</sup>Ala, and His<sup>216</sup>Arg). EcoliA activity was impaired after each of the Nramp/outgroup substitutions, as well as after more conservative replacements, showing that the tested sites are all important for metal uptake and metal-dependent H<sup>+</sup> transport. It is proposed that co-occurrence of these four Nramp-specific transmembrane residues may have contributed to the emergence of this family of metal and proton cotransporters.

The Nramp family is required to maintain divalent metal (Me<sup>2+</sup>) homeostasis in eukaryotes (1). The murine Nramp1 protein is needed for innate resistance to some intracellular parasites, including mycobacteria, which reside within a phagocytic vacuole (2). Mutation of the murine *Nramp2* gene (also known as divalent metal transporter 1) results in microcytic anemia (3). Similarly, yeast homologues are also necessary for metal uptake either directly at the plasma membrane or by mobilization of metals from endosomes or the lysosomal vacuole (4). These eukaryotic Nramp proteins are energized by the proton electrochemical gradient (5, 6)

and were reported to cotransport metal ions and protons (Me<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup>, symport).

Major goals in the study of Nramp permeases include understanding their function in health and diseases and their role during infection. Eukaryotic Nramp family members were likely derived from bacterial precursors thought to have emerged prior to the separation of Gram-positive and Gram-negative clusters (7). Bacterial Nramp homologues were characterized as proton-dependent manganese (and iron) transporters (8, 9), which are regulated by repressors using manganese and/or iron as a corepressor (10, 11). The MntH proteins characterized so far belong to one of three bacterial phylogenetic groups, MntH A (Supporting Information), including the *Escherichia coli* homologue, named herein EcoliA,<sup>1</sup> which constitutes an attractive model for structure–function studies.

Recognition of the phylogenetic diversity within a protein family allows identification of site-specific rate shifts between groups, which may improve functional predictions and provide a rational approach for identifying key residues

<sup>†</sup> This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-78014-M1). M.F.M.C. is a Scholar of the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec. B.K. was supported by The Carlsberg Foundation.

\* To whom correspondence should be addressed: INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Bd des prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. E-mail: mathieu.cellier@inrs-iaf.quebec.ca. Telephone: (450) 687-5010, ext. 4681. Fax: (450) 686-5301.

<sup>‡</sup> INRS-Institut Armand-Frappier.

<sup>§</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>||</sup> Present address: Institute of Physics, Charles University in Prague, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic.

<sup>@</sup> University of Florida.

<sup>1</sup> Institut Rosell-Lallemand Inc.

<sup>1</sup> Abbreviations: pH<sub>L</sub>, pHluorin (pH-dependent ratiometric GFP); EcoliA, *E. coli* MntH A.

(12, 13). Bacterial MntH groups (MntH A–C) differ in sequence (26–29 ± 3% identical) and in site-specific evolutionary rates, both among sites within one group and between respective sites of different groups (14). Such differences likely reflect distinct origins and modes of evolution, e.g., horizontal versus vertical gene transmission; hence, it was suggested that the precursor of eukaryotic *Nramp* genes was likely derived from a *mntH A* ancestor, whereas *mntH C* homologues could result from the horizontal transfer of a eukaryotic *Nramp* gene.

Nevertheless, structural and functional similarities among MntH A–C proteins suggest a common transmembrane topology, with 11–12 transmembrane domains (depending on the length of the C-terminus) and the N-terminus that is cytoplasmic (14, 15). In addition, heterologous expression of MntH B and C proteins in *E. coli* resulted in  $\text{Me}^{2+}$ -dependent  $\text{H}^+$  uptake and increased metal sensitivity suggestive of metal intracellular influx. Such functional conservation suggests that analyses of site-specific amino acid replacement rate shifts between groups of MntH homologues may reveal critical steps in the functional evolution of *Nramp* proteins, and contribute to a better understanding of some mechanisms that are important for metal ion homeostasis in bacteria and eukaryotes.

To establish the usefulness of this approach, we initially searched for residues corresponding to *Nramp* family-specific rate shifts. Such residues are invariant in the *Nramp* family, and thus expected to fulfill key structural or functional roles. They correspond to residues that are different but also invariant in a group of distantly related sequences [phylogenetic outgroup (Supporting Information)]. Our hypothesis is that these *Nramp* site-specific rate shifts identify residues that are essential to  $\text{H}^+$ -dependent  $\text{Me}^{2+}$  transport function.

The *Nramp* phylogenetic outgroup (Supporting Information) contains sequences that encode predicted membrane proteins that are up to 30% identical over a span of 385 residues with sequences from either the MntH A, B, or C group. Members of the *Nramp* outgroup were found in both archaea (euryarchaeota) and bacteria, including planctomycetes and Gram-negative and Gram-positive bacteria. These sequences are not highly related to each other (Supporting Information), consistent with a possible ancestral origin for the *Nramp* outgroup (14).

Approximately 30 residues are highly conserved among more than 145 *Nramp* homologues, including those from divergent eukaryotic taxa (e.g., plasmodia). It is generally accepted that the corresponding sites evolve slowly under strong purifying selection due to structural and/or functional constraints. The outgroup sequences share most of these conserved *Nramp* residues, supporting the possibility that the phylogenetic outgroup and the *Nramp* family were derived from a common ancestral transporter.

However, among eight residues that are invariant in the *Nramp* family, four are identical in the outgroup and four correspond to different residues, which are also invariant in the outgroup (Asp, Asn, His, and Asn and Gly, Thr, Tyr, and Gly, respectively). These evolutionary rate shifts may correspond to type II functional divergence, implying that the corresponding residues may play important but different roles in the *Nramp* and outgroup families (Supporting Information and ref 13). These four rate-shifted sites are located within the C-terminal half of transmembrane domains

Table 1: Sequences of the Oligonucleotide Primers (mutated codon in italics)

Primer	Sequence
WT	A I G Y I D P G N F A T 5'GCG ATT GGT TAT ATC GAT CCC GGT AAC TTT GCG
D34G	5'GCC ATT GGT TAT ATC <i>GGG</i> CCC GGT AAC TTT GCG
D34N	5'GCG ATT GGT TAT ATC <i>AAC</i> CCC GGT AAC TTT GCG ACC
WT	I D P G N F A T N 5'ATC GAT CCC GGT AAC TTT GCG ACC AAT
N37T	5'ATC GAT CCC GGT <i>ACC</i> TTT GCG ACC AAT
N37V	5'ATC GAT CCC GGT <i>GTC</i> TTT GCG ACC AAT
N37D	5'ATC GAT CCC GGT <i>GAC</i> TTT GCG ACC AAT
WT	A T I M P H V I Y L H S 5' G GCG ACG ATT ATG CCG CAT GTG ATT TAT TTG CAC TCC
H211Y	5' G GCG ACG ATT ATG CCG <i>TAC</i> GTG ATT TAT TTG CAC TCC
H211A	5'GG GCG ACG ATT ATG CCG <i>GCC</i> GTG ATT TAT TTG CAC TCC
WT	H V I Y L H S S L T 5' CAT GTG ATT TAT TTG CAC TCC TCG CTC ACT C
H216A	5' CAT GTG ATT TAT TTG <i>GCG</i> TCC TCG CTC ACT C
H216R	5' CAT GTG ATT TAT TTG <i>AGG</i> TCC TCG CTC ACT C
WT	V V A L N I W L L V G 5'G GTC GTC GCG CTG AAT ATC TGG TTG TTG GTG GGG
N401G	5'G GTC GTC GCG CTG <i>GGG</i> ATC TGG TTG TTG GTG GGG
N401T	5'G GTC GTC GCG CTG <i>ACC</i> ATC TGG TTG TTG GTG GGG

1, 6, and 11; three of them are predicted to be potentially exposed to the outward face of the plasma membrane (16).

If the four *Nramp*-specific residues identified herein contributed to the functional emergence of the *Nramp* family, they should be specifically involved in  $\text{H}^+$ -dependent  $\text{Me}^{2+}$  transport. Studies of different transporters revealed that Asp and His residues can be part of proton cotransport pathways and participate directly in proton coupling mechanisms (17–19). It was also reported that conserved transmembrane Asn residues can influence both channel conductance and cation transport (20, 21).

Therefore, to determine the functional importance of the four *Nramp*-specific residues, we substituted *E. coli* residues Asp<sup>34</sup>, Asn<sup>37</sup>, His<sup>211</sup>, and Asn<sup>401</sup> for the corresponding outgroup residues. The resulting mutant activities were compared to that of the wild type and confirmed with c-Myc-tagged proteins for which membrane expression levels were determined.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Site-Directed Mutagenesis of MntH.* Site-directed mutagenesis was carried out using the Quickchange mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and the oligonucleotide primers shown in Table 1. The full-length DNA sequence was determined for each mutant (CEQ 2000XL, Beckman Coulter, Mississauga, ON).

*Functional Assays of Metal Uptake.* The expression of MntH proteins in *E. coli* increases the sensitivity of growth

to  $\text{Me}^{2+}$ , measured by disk assay using a metallo-dependent Ts strain. Overaccumulation of metals is toxic for cells and can inhibit growth, whereas in some metal-dependent mutant strain, intracellular accumulation of iron or manganese can restore growth at restrictive temperature (9). Disk assays were performed as previously described in DH11S *mntH* or SL93 *mntH* strains (16) using two independent clones for each mutant (except N37V). Briefly, a small volume (10  $\mu\text{L}$ ) of metal solution is used to impregnate a 7 mm filter that is placed in the center of a plate of medium containing an amount of inducer for protein expression, and onto which bacteria are plated. High concentrations of metals are used to facilitate diffusion around the disk; expression of EcoliA in the presence of a concentration gradient of a metal substrate for transport affects bacterial growth, measured after incubation for 16 h, depending on the metal affinity for EcoliA, metal cytotoxicity, and EcoliA expression level. Metal uptake was assessed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) by comparing counts generated by the sample to those generated by standard solutions of a known concentration (22).

**Western Blot Analyses.** Membrane fractions were prepared with clones expressing EcoliA and each mutant as c-Myc-tagged proteins (16). The samples were solubilized in 4% (w/v) SDS, 40% (v/v) glycerol, 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol, and 40 mM Tris-HCl (pH 7.2) by incubation at either 4 or 37 °C for 30 min; 80  $\mu\text{g}$  of membrane extracts was separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide baby gels before semidry electrotransfer on polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON) at 70 mA for 1 h. Membranes were revealed as previously described (16) using a mouse anti-c-Myc mAb (1/200), a secondary Ab from rabbit (anti-IgG1-HRP, 1/1250; Perkin-Elmer, Woodbridge, ON), and the ECL Western blotting reagent (Roche, Laval, PQ). Protein concentrations were determined using the Non-Interfering protein assay (Genotech, St. Louis, MO).

**Proton Transport Assay.** The pH-dependent ratiometric GFP (pHluorin, pHL; 23, 24) was used to follow the MntH- and  $\text{Me}^{2+}$ -dependent intracellular accumulation of protons as previously described (16). Briefly, *E. coli* DH11S *mntH* cells were transformed with pGBM6-pHL and pBAD plasmids encoding different MntH mutants. Clones were subcultured at 37 °C and 220 rpm in LB broth containing ampicillin and spectinomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each) until an  $\text{OD}_{600}$  of 0.4 was reached, and 0.06% L-arabinose was added for a further 1 h incubation to allow the expression of MntH proteins. Cells were then harvested by centrifugation, washed once in 25 mM citric acid and 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  at pH 5.0 or 4.7 (25), and resuspended in the same buffer at room temperature and a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.2. Fluorescence was measured immediately on a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian, Inc.) equipped with a xenon lamp; The pHL excitation ratio  $R(410/470)$  was monitored for 1000 s (emission detected at 520 nm). The ratio was then transformed into the intracellular concentration of protons or the pH value according to the calibration curve obtained by use of carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP; 24). Manganese, cadmium, iron, or cobalt was added to the samples 25 s after the beginning of acquisition. The metal-dependent proton transport by wild-type MntH was evaluated in *E. coli mntH unc* cells lacking the  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase as well. At extracellular pH values ranging from 5.5 to 6.5, an ~30%

increase in the pHL response was observed as compared to that of *E. coli* DH11S *mntH*. However, the pHL response was not sufficient for measuring the functional differences between wild-type and mutant transporters at higher extracellular pH values, even in *unc mntH E. coli* cells. The proton transport assays were therefore performed in whole cells of *E. coli* DH11S *mntH* at an acidic extracellular pH.

**Assessment of MntH-Dependent Proton and Metal Cotransport.** The MntH-dependent accumulation of Mn or Cd and protons was observed quasi-simultaneously using spectroscopic measurement of intracellular pH changes and ICP-MS measurement of metal uptake as follows. Twenty milliliters of a cell suspension ( $\text{OD}_{600}$  of 0.2) was prepared in a citrate-phosphate buffer (pH 4.7, proton transport assay). The initial intracellular pH and metal content were measured (0 s), and 100  $\mu\text{M}$  metal was then added to the sample. The pH changes were subsequently monitored for 500 s (Cd) or 1000 s (Mn), and transport was stopped by addition of a chelator mix (50  $\mu\text{M}$  bathophenanthroline-disulfonic acid and 50  $\mu\text{M}$  dipivaloyl-L-tartaric acid) and a rapid filtration through a membrane filter (Metricel, 0.45  $\mu\text{m}$ ). Fifteen milliliters of 5 mM Tris (pH 8.0) containing 0.2 mM EDTA and 0.1 mM nitrilotriacetic acid was quickly filtered to wash out extracellular metal traces from the membrane which was then disposed to dry. The ICP-MS analysis was performed on the dried membranes wet-ashed with nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) using closed vessel microwave digestion (Covance Laboratories Inc., Madison, WI). The negative controls included in these experiments measured the bacterial metal and proton background levels prior to the addition of metal (0 s) and the levels of metal and proton uptake by cells that did not possess EcoliA (vector alone, pBAD) and by EcoliA-expressing cells that were depleted of energy using CCCP.

## RESULTS AND DISCUSSION

The metal and proton transport activity of wild-type and mutant EcoliA proteins was determined by three independent methods. Bacterial  $\text{Me}^{2+}$  sensitivity due to MntH proteins that are functionally expressed in *E. coli* was paralleled by MntH-dependent and  $\text{Me}^{2+}$ -induced  $\text{H}^+$  transport, measured with a bacterially expressed pH-dependent ratiometric GFP. However, increased bacterial  $\text{Me}^{2+}$  sensitivity to highly toxic cations ( $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ ) in the absence of detectable proton transport indicated that periplasmic binding of  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$  to truncated MntH proteins could induce bacteriotoxicity (16). Intracellular  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  was quantified by ICP-MS, which combined with the fluorescence proton transport assay revealed proton and metal cotransport by a bacterial Nramp homologue.

***E. coli MntH A (EcoliA) Asp<sup>34</sup>*.** Replacement of this Nramp-specific acidic residue with the corresponding out-group residue in the EcoliA protein (D34G mutation) diminished the MntH-dependent sensitivity of bacterial growth to  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  and abrogated the sensitivity of growth to  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  (Figure 1A); it also reduced the level of EcoliA-dependent  $\text{Me}^{2+}$ -induced  $\text{H}^+$  transport to background levels (Figure 1B, compare with vector alone). The epitope-tagged EcoliA protein D34G-L412-c-Myc was detected in membrane preparations at levels similar to that of wild-type EcoliA-L412-c-Myc (Figure 2A); it also conferred minimal bacterial sensitivity of growth to  $\text{Me}^{2+}$  and

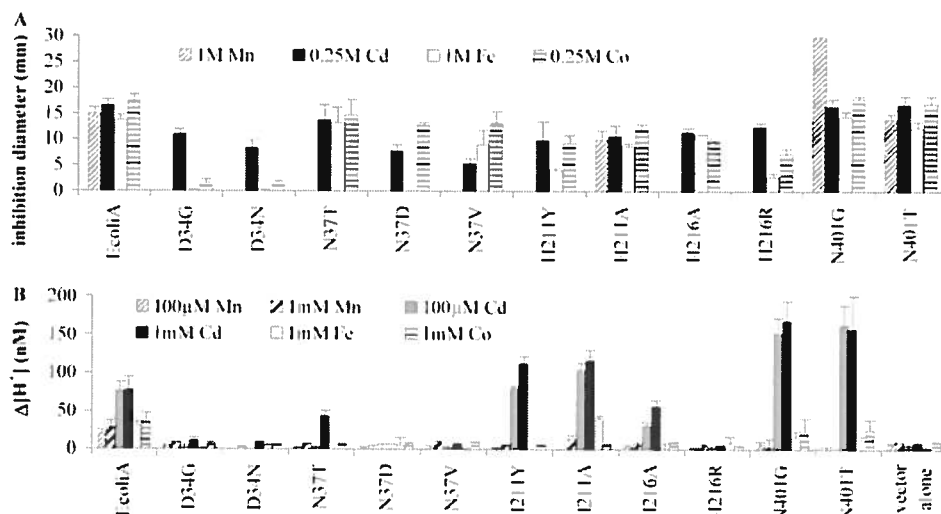


FIGURE 1: Functional characterization of EcoliA mutants. A disk assay of the MntH-dependent sensitivity of bacterial growth to divalent metals (Mn, Cd, Co, and Fe) was carried out for every mutant and wild-type EcoliA; values obtained with the vector alone were subtracted (A). Fluorescence assay of MntH-dependent  $H^+$  uptake at pH 4.7 in response to divalent metals. Values obtained with the vector alone show the proton entry in bacteria devoid of EcoliA (B).

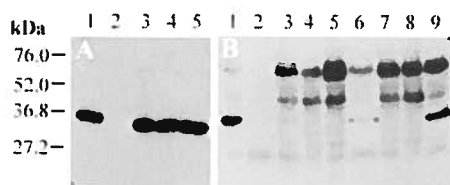


FIGURE 2: Western blot analysis of c-Myc-tagged wild-type EcoliA and mutant proteins. Membrane extracts were incubated for 30 min in solubilization buffer prior to loading on a 12% polyacrylamide gel either at 37 °C (A) [lane 1, EcoliA; lane 2, pBAD (vector alone); lane 3, D34G; lane 4, D34N; and lane 5, N401G] or at 4 °C (B) [lane 1, D34N; lane 2, pBAD (vector alone); lane 3, N37T; lane 4, N37V; lane 5, N37D; lane 6, H211A; lane 7, H211Y; lane 8, H216A; and lane 9, N401T].

was not associated with significant  $H^+$  transport under the conditions that were tested (Supporting Information). To determine whether the residual sensitivity of bacterial growth to  $Cd^{2+}$  corresponded to  $Me^{2+}$  influx in the absence of  $H^+$  transport by the mutant protein D34G, ICP-MS and fluorescence measurements were performed quasi-simultaneously; neither  $Me^{2+}$  nor  $H^+$  transport was detected compared to the experimental controls (Figure 3A,B). The results demonstrate that the EcoliA D34G mutation prevents both  $Me^{2+}$  and  $H^+$  transport.

To evaluate whether Asp<sup>34</sup> was involved in the sensitivity of growth to  $Cd^{2+}$  that was conferred by membrane expression of an EcoliA fusion construct (L324-Cat) in the absence of  $Cd^{2+}$ -dependent  $H^+$  uptake (16), the mutant EcoliA D34G L324-Cat was constructed. Expression of this construct conferred chloramphenicol resistance as expected, indicating that the D34G mutation did not alter EcoliA transmembrane topology, but also sensitivity of bacterial growth to  $Cd^{2+}$  similar to that of the wild-type fusion. The results suggest that EcoliA residue Asp<sup>34</sup> is not merely a  $Cd^{2+}$  binding site but likely participates in the  $Me^{2+}$  uptake process (and possibly proton binding).

Since the different biochemical properties of Asp and Gly residues could explain the D34G mutant phenotype, a more conservative change was performed (D34N) to determine whether it would preserve MntH function. The double mutant D34N-L412-c-Myc was expressed in a manner similar to

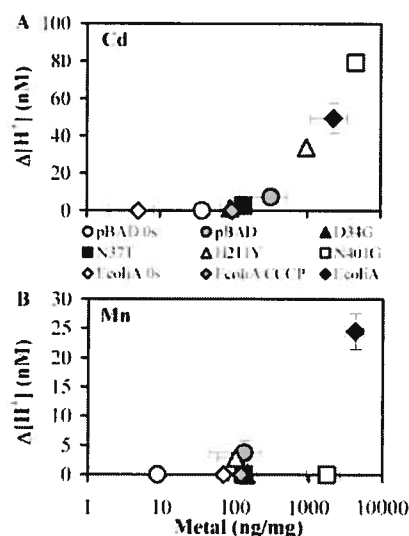


FIGURE 3: Cotransport of divalent metals and protons by EcoliA is impaired by exchanging a Nramp-specific residue with the corresponding outgroup residue. Quasi-simultaneous assessment of the intracellular accumulation of  $H^+$  and  $Cd^{2+}$  (A) or  $Mn^{2+}$  (B) by fluorescence proton transport assay and ICP-MS, respectively, as described in Experimental Procedures.

that of the wild-type protein (Figure 2A); it conferred some bacterial sensitivity to  $Cd^{2+}$  and did not facilitate any  $Me^{2+}$ -dependent  $H^+$  uptake (Supporting Information). Consistently, the simple mutant D34N exhibited transport properties most similar to those of the D34G mutant (Figure 1). Minimal bacterial metal sensitivity was also observed after expression of the mutants D34E and D34E-EcoliA-c-Myc, despite normal membrane protein expression levels (data not shown). Therefore, the effects of the D34G mutation are due to the requirement of an Asp residue at this position.

An Nramp2 mutant resembling EcoliA D34G (Nramp2 D86A) was previously shown to be well expressed at the plasma membrane of eukaryotic cells and not to mediate  $Me^{2+}$  uptake (26). Such similar effects obtained by replacing the homologous Asp residues in MntH and Nramp proteins with Gly or Ala residues imply that this Nramp-specific Asp residue is mandatory for transport activity. However, it is

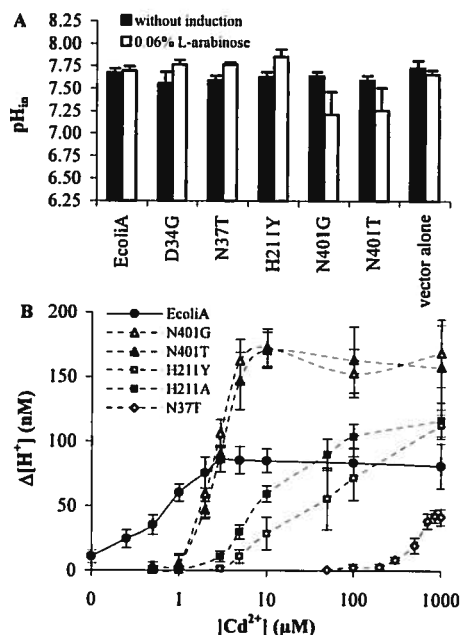


FIGURE 4: Replacement of Nramp-specific residues impairs EcoliA-dependent H<sup>+</sup> uptake. Fluorescence assay of the intracellular pH in *E. coli* cells expressing or not expressing wild-type EcoliA and different mutants (A). Cd<sup>2+</sup> dose-dependent H<sup>+</sup> uptake mediated by wild-type EcoliA and selected mutants (B). The difference in intracellular pH due to expression of the N401G and -T mutants is highly significant ( $p < 0.00001$ , in paired Student's *t* tests).

dispensable for insertion of the protein in the membrane. Abrogation of transport activity despite normal protein expression has previously been observed after replacement of conserved transmembrane Asp residues (27). These data are consistent with the hypothesis that a Gly to Asp mutation could have contributed to the functional divergence of the ancestor of the Nramp family.

*EcoliA Asn<sup>37</sup>*. The second exchange of Nramp for an outgroup residue (N37T) preserved the close to wild-type EcoliA-dependent sensitivity of bacterial growth to Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup> but not to Mn<sup>2+</sup> (Figure 1A). This mutation also strongly limited Me<sup>2+</sup>-induced H<sup>+</sup> transport, which was detected in the presence of high concentrations of Cd<sup>2+</sup> only (Figures 1B and 4B); neither H<sup>+</sup> nor Mn<sup>2+</sup> or Cd<sup>2+</sup> uptake was detected in quasi-simultaneous measurements using 100 μM metal (Figure 3A,B). Both the absence of Mn<sup>2+</sup>-induced growth inhibition (Figure 1A) and the requirement for a Cd<sup>2+</sup> concentration above 200 μM to observe H<sup>+</sup> transport via EcoliA N37T (Figure 4B) suggested this mutant protein may have a lower affinity for Cd<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>.

Alternatively, this mutant protein may not be sufficiently well-expressed in the membrane to appear to be active in cation transport assays unless a large Cd<sup>2+</sup> dose was used. The amount of N37T-L412-c-Myc protein in membrane extracts was notably reduced compared to the amount of EcoliA L412-c-Myc and corresponded to bands of altered mobility (Figure 2B); it was also sensitive to the temperature used to solubilize membrane extracts (Supporting Information). In a manner similar to that of N37T, expression of the N37T-L412-c-Myc protein conferred substantial sensitivity of growth to Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup>, but not to Mn<sup>2+</sup>, and did not induce detectable H<sup>+</sup> uptake under the conditions that were tested (Supporting Information). These data therefore suggest that the N37T mutation results in both a low level

of stable protein expression in the membrane and a reduced affinity for Cd<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>.

Interestingly, the N37T mutant lacked both Mn<sup>2+</sup> uptake and Mn<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport, while another mutant obtained serendipitously (N37V) lost in addition Cd<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport and exhibited a reduced sensitivity of growth to Cd<sup>2+</sup> compared to the N37T mutant (Figure 1). However, EcoliA N37V-L412-c-Myc protein levels were similar to that of the N37T-L412-c-Myc mutant (Figure 2) and less sensitive to the temperature used for solubilization (Supporting Information). Since N37V-L412-c-Myc abrogated the sensitivity of growth to Fe<sup>2+</sup> compared to N37T-L412-c-Myc (Supporting Information), it can be concluded that the N37V mutation affected more negatively EcoliA transport activity than its expression level. The N37V mutation seems to be less conservative than the N37T mutation since replacing a hydroxyl with a methyl group renders this site apolar. The data thus suggest that EcoliA Asn<sup>37</sup> is important for Me<sup>2+</sup>-induced H<sup>+</sup> transport.

To determine whether a more conservative mutation at position 37 would preserve EcoliA function, we also studied the N37D mutant. Sensitivity to Fe<sup>2+</sup> was lost, whereas sensitivity to Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> remained similar to that of the N37V mutant (Figure 1A). Similar levels of sensitivity to Cd<sup>2+</sup> were also detected for both N37D-L412-c-Myc and N37V-L412-c-Myc, whereas the former conferred higher sensitivity to Co<sup>2+</sup> (Supporting Information) and was detected at higher levels in membrane preparations (Figure 2). No Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake was detected after expression of N37D-L412-c-Myc (Supporting Information) or N37D (Figure 1B).

On the basis of the sensitivity of growth to Cd<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>-induced H<sup>+</sup> proton uptake, EcoliA activity was better preserved by introducing the outgroup residue in place of Asn<sup>37</sup> (N37T vs N37D and -V, Figures 1 and 4B). In addition, the conservative N37Q mutation did not restore levels of bacterial metal sensitivity better than the N37T mutation, despite improved membrane protein expression levels detected with N37T-EcoliA-c-Myc (data not shown). This Nramp-specific Asn residue is thus also required for the functional expression of MntH. A dual role in activity and structural integrity was previously reported for the strictly conserved Asn residue in the globular proteins cysteine proteases (28). It is thus reasonable to conclude that EcoliA Asn<sup>37</sup> is required for both stable membrane insertion and Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport activity.

A mutation corresponding to N37R is present in the N-terminal moiety of plant Ein2 proteins, which are weakly related to Nramp proteins and lack metal transport activity (29). The transport defects resulting from the mutagenesis of EcoliA Asn<sup>37</sup> imply that exchange for a positively charged residue should also impair transport. The presence of an Arg residue in place of the Nramp-specific Asn may be functionally significant for Ein2 proteins.

*EcoliA Asn<sup>401</sup>*. Finding an Nramp-specific residue close to the periplasmic C-terminus of EcoliA, a region otherwise not conserved in the Nramp family, suggested a possible functional role. Moreover, MntH activity is affected when this region is mutated (16). Hence, the levels of Me<sup>2+</sup>-induced H<sup>+</sup> uptake measured for L412-c-Myc-tagged EcoliA proteins differed from those of the corresponding proteins

devoid of the C-terminal tag (Figure 1B and Supporting Information).

The metal transport activity of the N401G mutant resembled that of wild-type EcoliA, including suppression of the *hflB1* Ts growth defect, but with some variations such as increased sensitivity of bacterial growth to Mn<sup>2+</sup> (Figure 1A). Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport was more affected, with a strong increase in Cd<sup>2+</sup>-dependent but a decrease in Mn<sup>2+</sup>-, Fe<sup>2+</sup>-, and Co<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake rates (Figures 1B and 3A,B). This selective inhibition in Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake was less pronounced when an external pH of 5 was used (Supporting Information). The increase in the rate of Cd<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake was paralleled by an increased rate of Cd<sup>2+</sup> uptake (Figure 3A), indicating that both cation transport capacities are enhanced in the EcoliA N401G mutant. Under identical conditions, the rate of Mn<sup>2+</sup> uptake appeared to be significantly decreased and H<sup>+</sup> uptake completely inhibited, suggesting that Mn<sup>2+</sup> accumulation might be possible in the absence of H<sup>+</sup> cotransport (Figure 3B). These results implied that the EcoliA N401G mutation alters both H<sup>+</sup> uptake and protein Me<sup>2+</sup> interactions; this was confirmed by further observations.

First, as opposed to the mutants created at other positions, expression of the EcoliA N401G mutant protein diminished the intracellular pH of bacteria growing in rich broth (Figure 4A), suggesting that either metals in the culture medium might induce MntH-dependent H<sup>+</sup> uptake or H<sup>+</sup> entry might be independent of metals. Second, the comparison of H<sup>+</sup> uptake in response to the Cd<sup>2+</sup> dose showed important differences between wild-type EcoliA and the mutant N401G, in their apparent affinity for Cd<sup>2+</sup> and the resulting H<sup>+</sup> entry (Figure 4B). Last, the double mutant N401G-L412-c-Myc was expressed at levels similar to that of EcoliA-c-Myc (Figure 2A); it conferred a slightly decreased and increased sensitivity to Mn<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>, respectively, and significantly lower levels of Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake except in the presence of 1 mM Cd<sup>2+</sup> (Supporting Information). These results thus indicate that replacing the Nramp invariant residue Asn<sup>401</sup> with the corresponding outgroup residue affects primarily EcoliA Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake.

To establish that the properties of the N401G mutant revealed some functional constraints exerted on Asn<sup>401</sup> versus differences in the properties of Asn and Gly side chains, another mutation was studied. N401T is a more conservative mutation than N401G, introducing an alcohol side chain with a polar and acid character, and of intermediate size, which should thus better preserve MntH activity, except in a case in which Asn<sup>401</sup> was required for transport.

The expression of EcoliA mutant N401T resulted in sensitivity of growth to metals that was similar to wild-type EcoliA activity (Figure 1A), including suppression of the *hflB1* Ts growth defect, and in Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake resembling that measured for the N401G mutant at pH 4.7 (Figure 1B) and pH 5 (Supporting Information). These results were confirmed by quasi-simultaneous measurements of Cd<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> uptake (data not shown) and by measuring the intracellular pH resulting from the expression of N401T in growing cells and after addition of various amounts of Cd<sup>2+</sup> (Figure 4A,B); the data obtained were very similar for N401G and N401T. However, N401T-L412-c-Myc was significantly less stable than N401G-L412-c-Myc (Figure 2B and Supporting Information); it conferred a sensitivity of

growth to metals similar to that of N401G-L412-c-Myc but significantly more variable Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake (Supporting Information).

Together, the data demonstrate that substituting EcoliA Asn<sup>401</sup> with Thr or Gly has a similar impact on cation transport, which implies that Asn<sup>401</sup>, or an amide group, is required for EcoliA function. The N401Q mutant induced bacterial metal sensitivity levels similar to that of wild-type EcoliA, but the double mutant N401Q-L412-c-Myc, which was expressed well in the membrane, did not confer Mn sensitivity anymore and suppressed the *hflB1* Ts defect less efficiently than the N401G and -T mutants (data not shown). The data suggest that Asn<sup>401</sup> is strictly required for proper EcoliA-dependent transport. The different outcome of Asn to Thr or Gln mutations at EcoliA positions 37 and 401 demonstrates unique functional constraints exerted at these sites.

One possibility for explaining the clear phenotypes observed after substituting EcoliA residues Asp<sup>34</sup>, Asn<sup>37</sup>, and Asn<sup>401</sup> is their exofacial location, suggesting possible direct contacts with the substrates, which might affect the rate of transport. Since more conservative mutations at these sites did not preserve EcoliA function, the phenotypes observed as a result of the substitutions of EcoliA residues Asp<sup>34</sup>, Asn<sup>37</sup>, and Asn<sup>401</sup> for the corresponding outgroup residues indicate that the targeted Nramp-specific residues are required for metal and proton cotransport.

*EcoliA His<sup>211</sup>*. The fourth predicted site of type II functional divergence differs from the others since it is located within the predicted C-terminal half of transmembrane domain 6, closer to the cytoplasmic face of the membrane, and its replacement with the corresponding outgroup residue seems to be rather conservative in terms of size and hydrophobicity [H211Y, LRT values of 1.40–1.76 (Supporting Information)]. However, this mutation should affect a protein active site because Tyr exposes an acidic proton and His has a basic amino group.

Compared to the EcoliA control, the H211Y mutant conferred a notably reduced sensitivity of growth to all metals that were tested, including Mn<sup>2+</sup>, while H<sup>+</sup> uptake was detected exclusively in the presence of Cd<sup>2+</sup> and was seemingly unaltered (Figure 1A,B). This was confirmed by detection of cotransport of Cd<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup>, albeit at a level reduced compared to that of wild-type EcoliA (Figure 3A), whereas no transport at all was detected with Mn<sup>2+</sup> (Figure 3B). In addition, Cd<sup>2+</sup> dose-dependent H<sup>+</sup> uptake mediated by H211Y indicated a reduction of the apparent affinity for this metal ion compared to wild-type EcoliA (Figure 4B). A general decrease in metal sensitivity could explain the weak effect of the expression of EcoliA H211Y on bacterial growth in the presence of metals (Figure 1A). However, substantial expression level and a relative protein stability similar to that observed with N37D-L412-c-Myc were detected with H211Y-L412-c-Myc (Figure 2B and the Supporting Information); this double mutant also conferred little sensitivity of bacterial growth to metals and metal-dependent H<sup>+</sup> uptake activity (Supporting Information). Thus, though it does not abrogate MntH activity, the H211Y mutation affects significantly EcoliA structure and is not functionally conservative. This suggests that the basic amino group of His<sup>211</sup> may be required for EcoliA function or that the phenotype resulting

from the mutation H211Y could be due to antagonistic acid–base properties of His and Tyr residues.

To address this issue, another nonconservative but more neutral mutation was performed (H211A). This mutation preserved bacterial sensitivity to all the metals that were tested, albeit at levels inferior to that of wild-type EcoliA (Figure 1A), and facilitated H<sup>+</sup> uptake in the presence of Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> at pH 4.7 (Figure 1B) and of Cd<sup>2+</sup> at pH 5 (Supporting Information). EcoliA transport properties were thus better preserved in the H211A mutant than in the H211Y mutant, as confirmed by measuring the rate of Cd<sup>2+</sup> dose-dependent H<sup>+</sup> uptake (Figure 4B). In addition, H211A-L412-c-Myc protein levels in membrane preparations indicated moderate alterations that resembled those observed with the N401T-L412-c-Myc mutant (Figure 2B). Nevertheless, the expression of H211A-L412-c-Myc was superior to that of H211Y-L412-c-Myc in mediating metal-dependent H<sup>+</sup> uptake (Supporting Information). In contrast, H211R-L412-c-Myc did not induce metal sensitivity above negative controls, suggesting impaired expression (data not shown). The results indicate thus that changing the outgroup Tyr residue for the Nramp-specific His likely implied some divergence in transport function.

Two other mutants were studied for comparison (H216A and H216R) since the homologous mutations in Nramp2 impaired the uptake of Fe<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>, and metal uptake was partly restored at an acidic external pH with the Ala mutant only (26). Consistently, higher levels of both intracellular metal accumulation and H<sup>+</sup> uptake were preserved with the EcoliA H216A mutant compared to H216R. Indeed, only bacteria expressing the H216R, D34G or -N, and N37V or -D mutants, and those devoid of the EcoliA protein, did not exhibit upregulation of Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake when measured at pH 4.7 versus pH 5.0 (Figure 1B and the Supporting Information), indicating that these mutations affect the H<sup>+</sup> transport pathway.

Despite possibly lower membrane protein levels, H211A-L412-c-Myc mediated higher rates of Cd<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> uptake compared to H216A-L412-c-Myc, whereas both conferred similar levels of sensitivity of bacterial growth to metals (Supporting Information). Comparison of the transport properties of the corresponding single mutants demonstrated that H211A was more active than H216A (Figure 1). Consistent differences were observed with the Nramp2 protein after replacement of the corresponding His residues with Ala (26). The relatively well-preserved activity of EcoliA H211A thus suggests that the H211Y substitution impaired MntH transport due to the different acid–base properties of His and Tyr residues. The data thus support the proposition that exchange of the outgroup residue for the corresponding Nramp-specific residue could have contributed to the functional divergence of the Nramp family.

In conclusion, the four rate-shifted sites that were predicted to have contributed to the functional divergence of the Nramp family are important for EcoliA transport activity. This functional evolutionary approach identified separate residues with key roles in metal and proton transport.

Each of the four replacements of Nramp-specific residues with the corresponding outgroup residues resulted in mutant EcoliA proteins that were expressed in the plasma membrane, albeit at different levels, some showing shifted electrophoretic mobility and/or stability and different levels of functional

activity. In one instance, H211Y, the outgroup residue impaired specifically the transport activity. The data support the notion that outgroup and MntH proteins share similar transmembrane features and can accommodate each other's residues.

Quasi-simultaneous measurements of the rates of Me<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> uptake indicate that MntH proteins cotransport these cations (symport). The relative functional impairment of the D34G and N401G mutants on one hand, and the N37I and N401T mutants on the other hand, revealed that EcoliA Asp<sup>34</sup> is strictly required for Me<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> cotransport and that Asn<sup>401</sup> is required for proper Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport. Detailed kinetic studies of the more conservative changes (D34E and N401Q) will likely reveal insight into the mechanism of transport via MntH.

This study reveals both structural and functional roles for EcoliA Asn<sup>37</sup> and His<sup>211</sup> residues, and suggests possible interactions with metal ions consistent with a direct role in cation permeation pathway. The data also demonstrate a role in proton transport for the residues located within transmembrane domains 1 and 6 (Asp<sup>34</sup> and His<sup>211</sup> and His<sup>216</sup>, respectively), which were previously shown to affect Nramp2 metal or cation transport (26, 30). EcoliA Asn<sup>401</sup> mutant data, and previously published data obtained with C-terminally truncated and tagged EcoliA proteins (16), indicate that transmembrane domain 11 is important for Me<sup>2+</sup>-dependent H<sup>+</sup> transport.

The functional significance of the four Nramp invariant residues suggests that they represent sites of type II functional divergence, which may have co-evolved in relation to the emergence of the Nramp family. This study shows the usefulness of evolutionary rate shift analyses via application of a transmembrane protein similarity matrix (31) to the study of transmembrane residues likely involved in transport function by site-directed mutagenesis. This evolutionary-based approach will be useful in evaluating the significance of sequence diversity in the Nramp family, including laterally transferred *mntH* C genes, as well as in other conserved families of membrane transporters.

## ACKNOWLEDGMENT

The expert assistance of L. Wilson is gratefully acknowledged.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

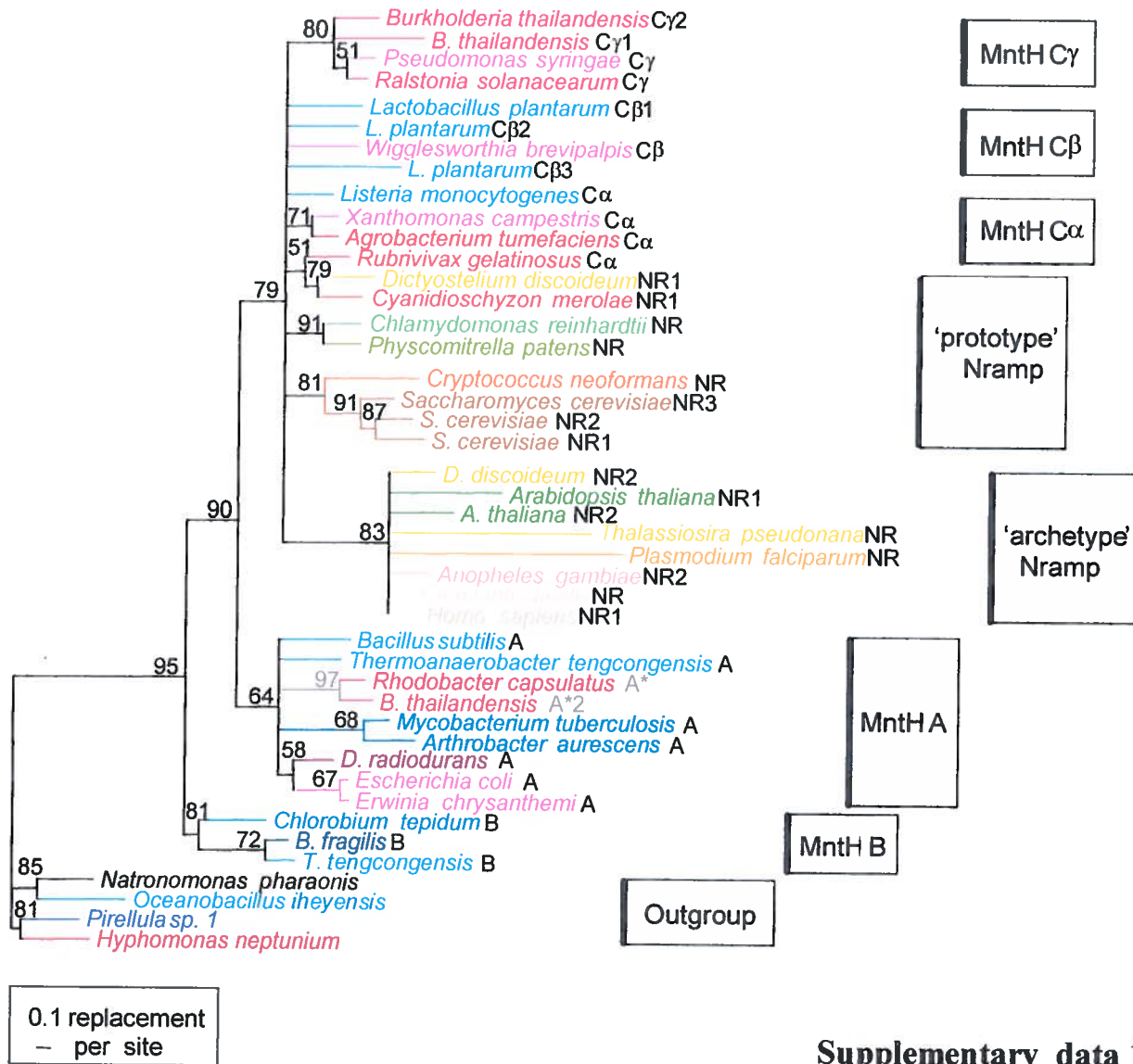
Phylogenetic groups of the Nramp family, defining Nramp function using rate shift analysis, functional characterization of C-terminally c-Myc tagged EcoliA wild-type and mutant proteins, temperature sensitivity of c-Myc-tagged EcoliA mutant proteins revealed by Western blot analysis, and fluorescence assay of MntH-dependent proton uptake at pH 5 in response to divalent metals. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

1. Mackenzie, B., and Hediger, M. A. (2004) SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1, *Pfluegers Arch.* 447, 571–579.
2. Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. (1995) The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with

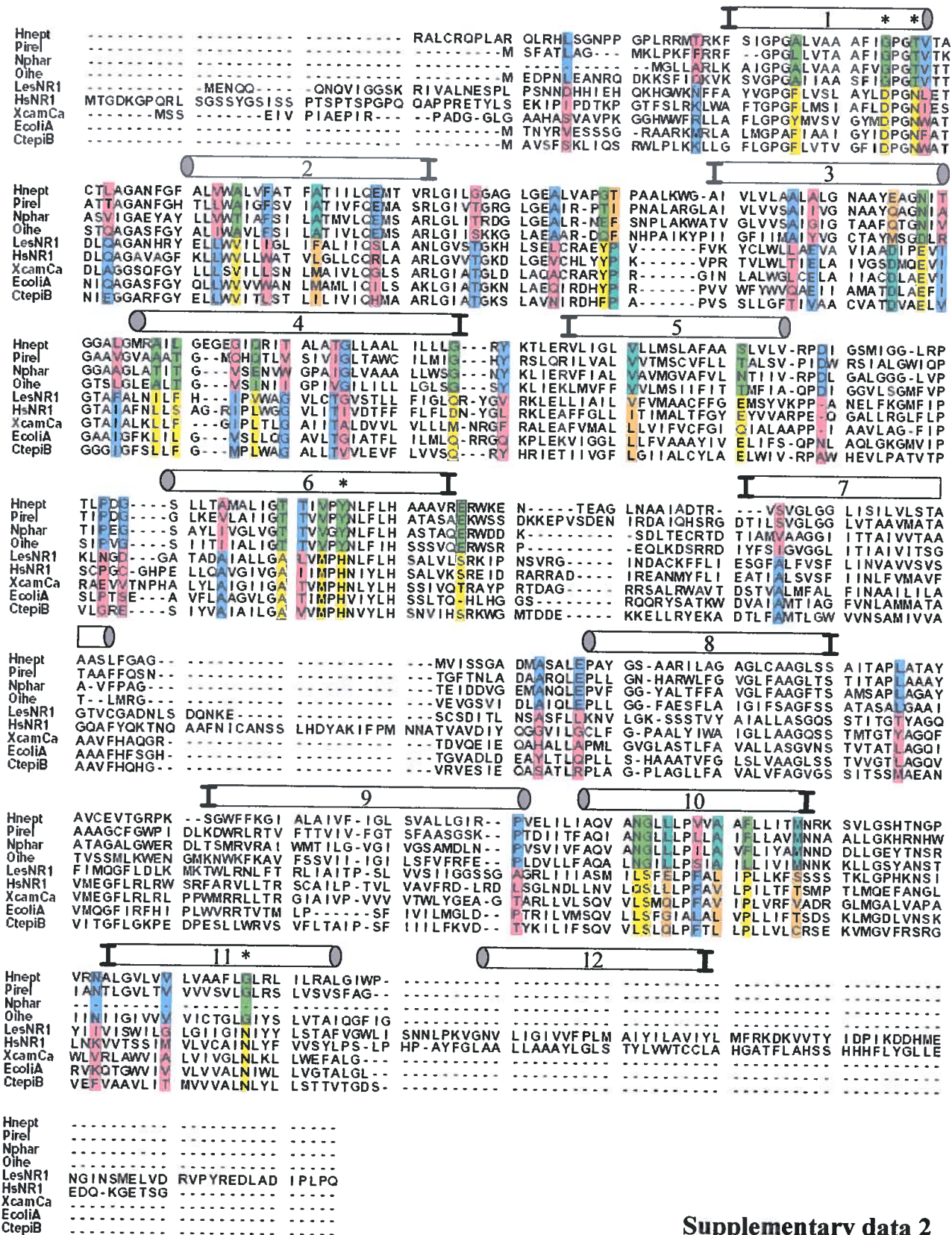


- intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene, *J. Exp. Med.* 182, 655–666.
3. Fleming, M. D., Trenor, C. C., III, Su, M. A., Foerzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., and Andrews, N. C. (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene, *Nat. Genet.* 16, 383–386.
  4. Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters, *Mol. Cell. Biol.* 20, 7893–7902.
  5. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., and Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 388, 482–488.
  6. Chen, X. Z., Peng, J. B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., and Hediger, M. A. (1999) Yeast SMF1 mediates H<sup>+</sup>-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents, *J. Biol. Chem.* 274, 35089–35094.
  7. Cellier, M. F., Bergevin, I., Boyer, E., and Richer, E. (2001) Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters, *Trends Genet.* 17, 365–370.
  8. Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D., and Krishna, S. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family, *J. Exp. Med.* 190, 717–724.
  9. Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter, *Mol. Microbiol.* 35, 1065–1078.
  10. Patzer, S. I., and Hantke, K. (2001) Dual repression by Fe<sup>3+</sup>-Fur and Mn<sup>2+</sup>-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn<sup>2+</sup> transporter in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 183, 4806–4813.
  11. Kehres, D. G., Janakiraman, A., Schlauch, J. M., and Maguire, M. E. (2002) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mntH transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>, *J. Bacteriol.* 184, 3151–3158.
  12. Gaucher, E. A., Gu, X., Miyamoto, M. M., and Benner, S. A. (2002) Predicting functional divergence in protein evolution by site-specific rate shifts, *Trends Biochem. Sci.* 27, 315–321.
  13. Knudsen, B., Miyamoto, M. M., Laipis, P. J., and Silverman, D. N. (2003) Using Evolutionary Rates to Investigate Protein Functional Divergence and Conservation. A case study of the carbonic anhydrases, *Genetics* 164, 1261–1269.
  14. Richer, E., Courville, P., Bergevin, I., and Cellier, M. F. (2003) Horizontal gene transfer of “prototype” Nramp in bacteria, *J. Mol. Evol.* 57, 363–376.
  15. Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P. (1995) Nramp defines a family of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10089–10093.
  16. Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., and Cellier, M. F. (2004) Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog, *J. Biol. Chem.* 279, 3318–3326.
  17. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*, *Science* 301, 610–615.
  18. Phelps, A., Briggs, C., Mincone, L., and Wohlrab, H. (1996) Mitochondrial phosphate transport protein. Replacements of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton transport path, *Biochemistry* 35, 10757–10762.
  19. Buch-Pedersen, M. J., and Palmgren, M. G. (2003) Conserved Asp684 in transmembrane segment M6 of the plant plasma membrane P-type proton pump AHA2 is a molecular determinant of proton translocation, *J. Biol. Chem.* 278, 17845–17851.
  20. Nakazawa, K., Inoue, K., and Ohno, Y. (1998) An asparagine residue regulating conductance through P2X2 receptor/channels, *Eur. J. Pharmacol.* 347, 141–144.
  21. Lin, F., Lester, H. A., and Mager, S. (1996) Single-channel currents produced by the serotonin transporter and analysis of a mutation affecting ion permeation, *Biophys. J.* 71, 3126–3135.
  22. AOAC INTERNATIONAL (2000) Method 993.14, *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 17th ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
  23. Miesenböck, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature* 394, 192–195.
  24. Olsen, K. N., Budde, B. B., Siegmund, H., Rechinger, K. B., Jakobsen, M., and Ingmer, H. (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4145–4147.
  25. Siegmund, H., Rechinger, K. B., and Jakobsen, M. (1999) Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures, *Microbiology* 145, 1703–1709.
  26. Lam-Yuk-Tsung, S., Govoni, G., Forbes, J., and Gros, P. (2003) Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6, *Blood* 101, 3699–3707.
  27. Merickel, A., Kaback, H. R., and Edwards, R. H. (1997) Charged residues in transmembrane domains II and XI of a vesicular monoamine transporter form a charge pair that promotes high affinity substrate recognition, *J. Biol. Chem.* 272, 5403–5408.
  28. Vernet, T., Tessier, D. C., Chatellier, J., Plouffe, C., Lec, T. S., Thomas, D. Y., Storer, A. C., and Menard, R. (1995) Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain, *J. Biol. Chem.* 270, 16645–16652.
  29. Thomine, S., and Schroeder, J. I. (2004) Plant metal transporters with homology to proteins of the Nramp family, in *The Nramp family* (Cellier, M. F. M., and Gros, P., Eds.) pp 114–124, Landes Bioscience/Kluwer Academic, Georgetown, TX.
  30. Cohen, A., Nevo, Y., and Nelson, N. (2003) The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
  31. Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1994) A mutation data matrix for transmembrane proteins, *FEBS Lett.* 339, 269–275.



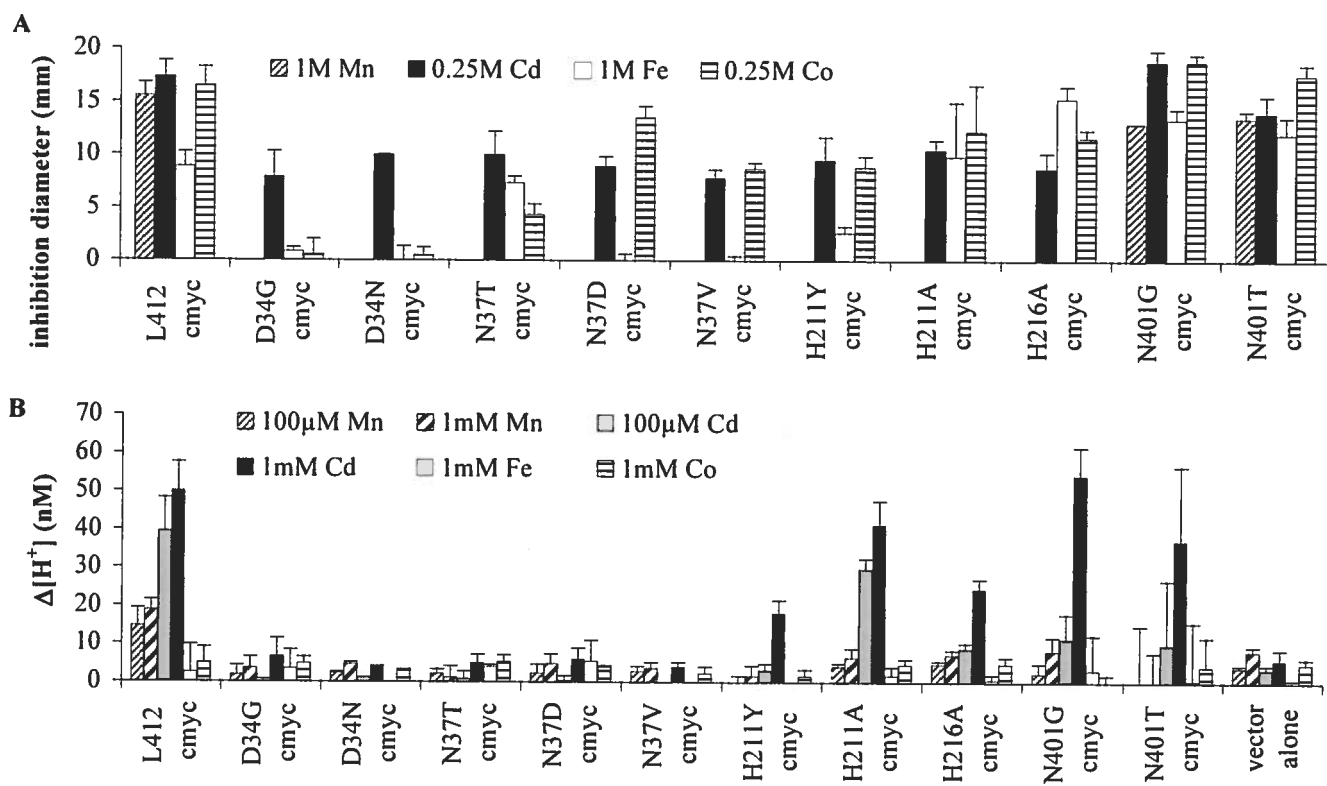
**Phylogenetic groups of the Nramp family (MntH A, MntH B, MntH C, 'prototype' and 'archetype' Nramp; Richer et al., *J Mol Evol* 57: 363-76).** This dendrogram was obtained using a set of 40 sequences representative of the Nramp family, and 4 outgroup sequences, which were aligned with the program ClustalX (Thompson et al., 1997, *NAR* 25: 4876-82). A set of 245 parsimony-informative sites (at least 2 different amino acids (aa) each represented at least twice) was generated with the package Mega2 (Kumar et al., 2001, *Bioinformatics* 17: 1244-45) and used for Maximum Likelihood analysis with the substitution matrix Blosum 62 (Henikoff and Henikoff, 1993, *Proteins* 17: 49-61) and a continuous gamma distribution to model site-specific heterogeneity of aa replacement rate among sites (12 categories, alpha parameter=1.54, S.E. 0.09, Schmidt et al., 2002, *Bioinformatics* 18: 502-04). The level of statistical confidence (determined by bootstrapping, 1000 replica) is indicated in percent at the left of each node. Similar data were obtained with different approaches (Minimum Evolution, Maximum Parsimony, not shown).

**Taxonomic distributions :** **Outgroup** [Archaea, Planctomycetes, a-Proteobacteria (a-P), low GC gram positive (IGp)]; **MntH B** [Green sulfur bacteria, Bacteroides, IGp]; **MntH A** [Deinococcus, IGp, high GC gram positive (hGp), a-P, b- and g-Proteobacteria (b-P and g-P)]; **MntH C:** MntH Ca [IGp, Cyanobacteria-not shown, a-P, b-P, g-P], MntH Cb [IGp, g-P], MntH Cg [b- and g-P]; **'prototype' Nramp** [Amoebozoa, Plantae (green alga, red alga, moss), Fungi, Animals (invertebrates-not shown)]; **'archetype' Nramp** [Amoebozoa, Plantae (green plants, and red alga-not shown), Diatoms, Alveolates, Animals].

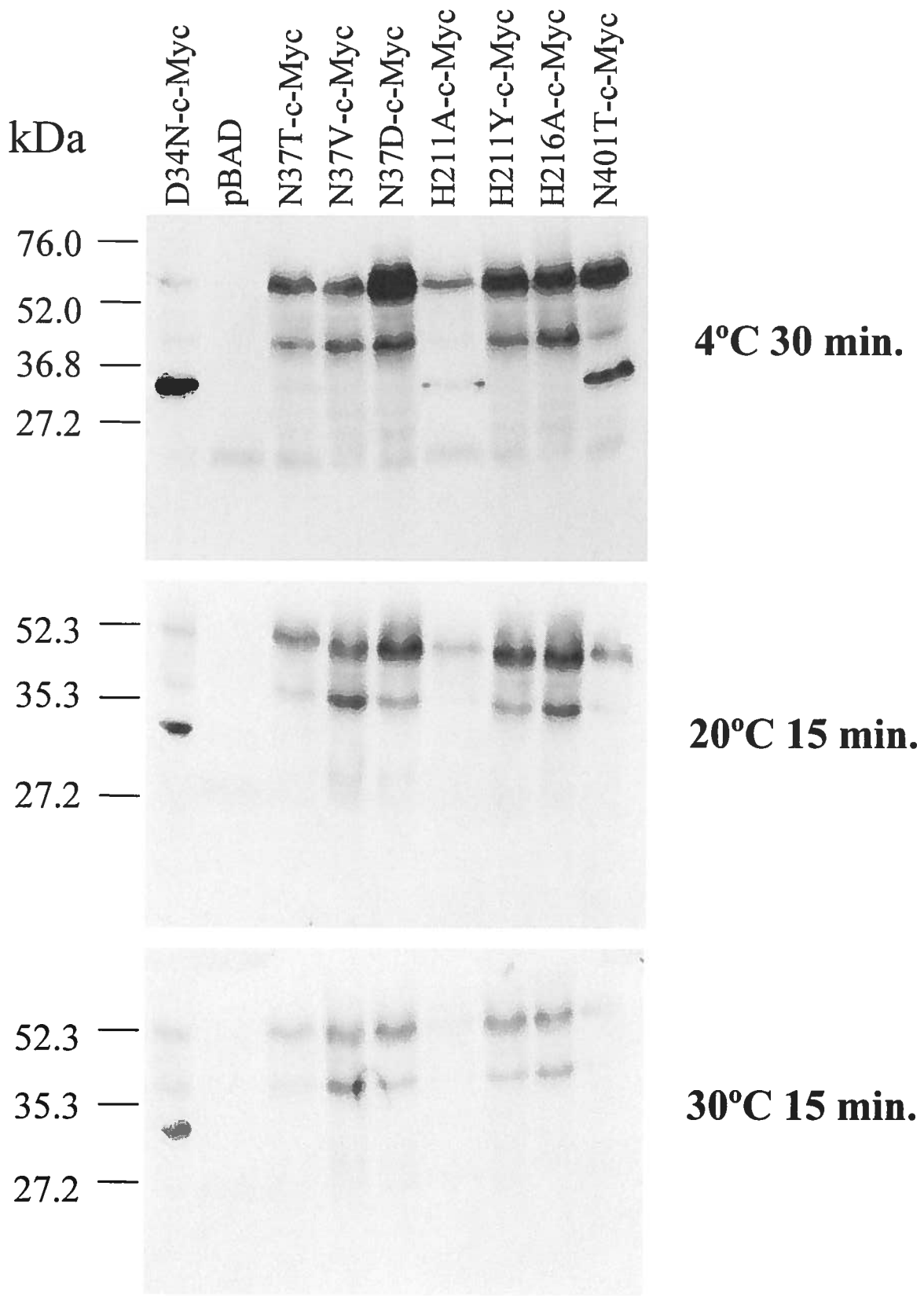


## Supplementary data 2

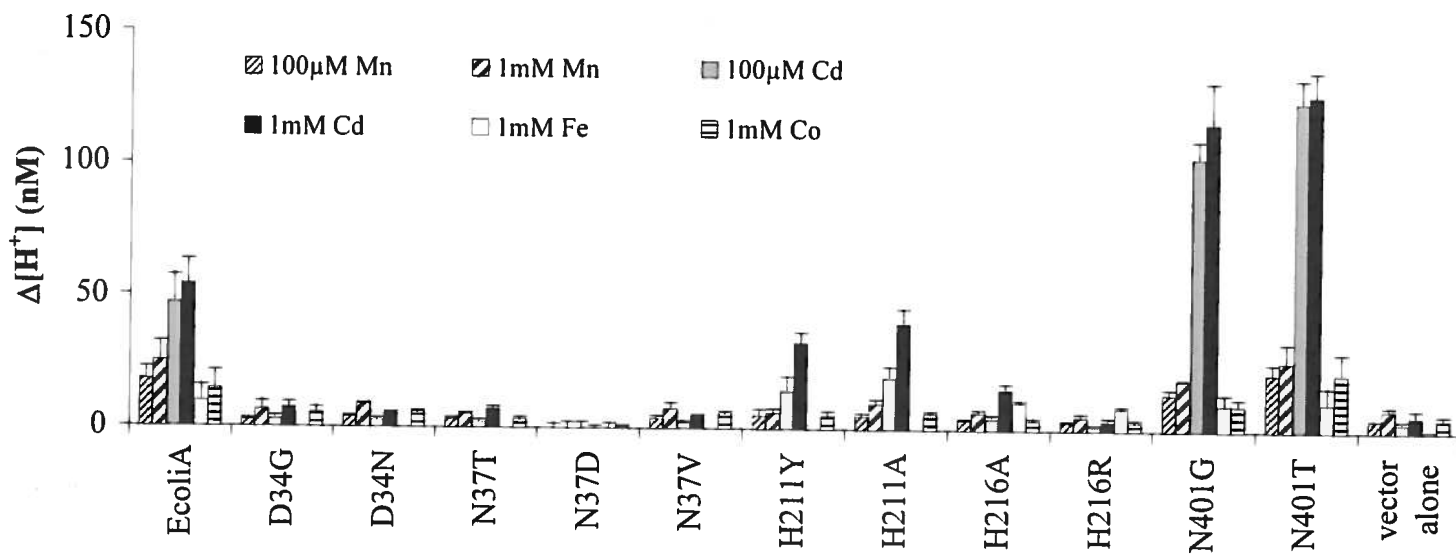
**Defining Nramp function using rate shift analysis.** Rate-shifts between the phylogenetic outgroup and a sample of the major groups in Nramp family (MntH B, A, C, "prototype" and "archetype" Nramp) were calculated using an instantaneous matrix deduced from known transmembrane (vs. globular) proteins (Jones et al., 1994, FEBS Lett. 339:269-75). The alignment was searched for positions representing possible type I, type II or type I & II functional divergence and which corresponded to Nramp invariant residues. This approach yielded 3, 8 and 5 examples of each, respectively, with likelihood-ratio tests (LRT) values ranging from 1.05 to 6.66 (these values refer to the difference in likelihood from the 5% significance cutoff to the actual value). 4 predicted type II sites corresponding to Nramp-specific transmembrane invariant residues were studied by mutagenesis (identified by asterisks). The Nramp Asp and Asn residues exhibited LRT values between 2.31 and 6.66 using the JTT mutation matrix for membrane proteins (vs. values between 2.13 and 3.45 using the classic JTT mutation matrix, Jones et al., 1992, Comput Appl Biosci. 8:275-82) whereas the His residue showed lower but still significant values (1.76 vs. 1.4, respectively,  $P \leq 0.05$  by chance alone). Hnept, *Hyphomonas neptunium*; Pirel, *Pirellula*, Oihe, *Oceanobacillus iheyensis*, Nphar, *Natronomonas pharaonis* (truncated Orf, GenBank Y10500), LesNR1, *Lycopersicon esculentum* 1, HsNR1, *Homo sapiens* 1, XcamCa, *Xanthomonas campestris* Ca, CtepiB, *Chlorobium tepidum* B



**Supplementary data 3**



**Supplementary data 4**



**Supplementary data 5**

### Article 3

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal ion transporters, *Biochemistry and Cell Biology* (2006) 84, 960-978.

doi:10.1139/O06-193

Dans cet article de type revu, j'ai participé à la rédaction du manuscrit, à la figure 1 et au tableau 1.

#### Mise en contexte:

À l'occasion de la 49<sup>e</sup> assemblée annuelle de la Société Canadienne de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (SCBBMC), il nous a été permis de présenter une synthèse des résultats concernant l'étude sur la relation structure/fonction des homologues Nramp/MntH chez les homologues bactériens et eucaryotes dans différents modèles d'études (analyse électrophysiologique dans des œufs de xénope, complémentation chez la levure mutants en *smf1-2-3p* et transport chez les cellules eucaryotes) et procaryotes (transport chez les bactéries et complémentation dans la souche métallo-dépendante, S193 *H.1BJ*). Les résultats démontrent que les résidus clés ainsi que les segments transmembranaires 1 et 6 (motif DPGN et MPH respectivement) possèdent un rôle crucial similaire autant chez les eucaryotes que chez les procaryotes vis-à-vis du mécanisme d'action. Ces résultats démontrent la grande conservation du transport de type symport  $Me^{2+}H$  entre les homologues Nramp/Mnt1-1 au cours de l'évolution.

## Article 4

Nramp phagocyte intracellular metal withdrawal defense, *Microbes and Infection* (2007) **9**, 1662-1670.

Dans cet article de type revue, j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

## Mise en contexte :

Le Dr. Cellier a été invité par le journal "Microbes and Infection" à rédiger un article de type revue dans le cadre d'un forum en Immunologie intitulé "Forum on cell-autonomous Immunity". Les bactéries pathogènes sont en constante compétition avec l'hôte pour le fer disponible à l'intérieur du phagosome. L'homologue Nramp1 est impliqué dans la résistance des hôtes vertébrés terrestres vis-à-vis de l'infection en limitant la disponibilité des cations divalents à l'intérieur du phagosome. Nramp1 agit en première ligne de défense intracellulaire contre les infections microbiennes.





INSTITUT PASTEUR

Microbes and Infection xx (2007) 1–9



www.elsevier.com/locate/micinf

Forum

# Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense

Mathieu F. Cellier\*, Pascal Courville, Carole Champion

INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Bd des prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

## Abstract

Natural resistance-associated macrophage proteins (Nramp) are multispecific symporters facilitating proton-dependent import of divalent metals. Nramp1 restricts microbial access to essential micro-nutrients such as iron and manganese within professional phagosomes. Increased understanding of Nramp1 roles in human phagocytes will be useful for future therapeutic approaches against selected infectious and immune diseases.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Q1** *Keywords:* Divalent cations; Transport proteins; Phagosomes

## 1. Nramp 1 belongs to a conserved family of chemiosmotic metal ion transporters

The mouse *Nramp1* (*Slc11A1*) gene was discovered as a quantitative trait locus determining innate resistance of mouse inbred strains to some intracellular pathogens residing within the phagocytic vacuole (phagosome) inside macrophages [1]. The mouse Nramp1 is an integral membrane phosphoprotein of 548 amino acid residues that is extensively glycosylated [2]. Double immuno-fluorescence studies showed that Nramp1 colocalizes with the marker Lysosomal-associated membrane protein 1 (Lamp1) in the late endosomes/lysosomes of resting macrophages. After phagocytosis of inert particles or live micro-organisms (bacteria, yeast, protozoa) both Nramp1 and Lamp1 proteins are recruited with similar kinetics to the phagosomal membrane that is positive for the late endosome marker Rab7 (vs Rab5). Several intracellular pathogens are unaffected by Nramp1 presence and are able to perturb the phagosome maturation (e.g., *Legionella pneumophila*) or escape to the cytoplasm (e.g., *Listeria monocytogenes*) [3].

Nramp1 belongs to a protein family conserved from bacteria to man. Homologs exhibit generally above 30% overall

sequence identity ( $p < e^{-10}$ ) and contain 11–12 predicted transmembrane segments (TMS, [4]). The N-terminus of several Nramp homologs was located in the cytoplasm while the C-termini were found extra- or intra-cytoplasmic, depending on the TMS number (11 or 12, respectively). The 10 first TMS and the “transport motif” in the cytoplasmic loop 8/9 are highly conserved. Five transmembrane residues, invariant in the Nramp family but different in the closest group of sequences (phylogenetic outgroup), are each required for proper transport activity [5]. Eukaryotic and prokaryotic Nramp homologs perform similar chemi-osmotic (secondary) transport functions important for homeostasis of both micro- and macro-organisms. Nramp proteins facilitate the intracytosolic accumulation (uptake) of divalent metals such as iron, manganese and cadmium, using the electrochemical gradient of the proton as a driving force. Nramp proteins define the transporter family of solute carrier (SLC) family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters, the Human Genome Organization Nomenclature Committee, see <http://www.gnc.ucl.ac.uk/nomenclature/>), alias the electrochemical potential-driven metal ion ( $Mn^{2+}$ - $Fe^{2+}$ ) porter family (TC 2.A.55, see <http://www.tcdb.org/tcdb/>) [6].

A recessive mutation introducing a negative charge within mouse Nramp1 TMS4 (Gly<sup>189</sup>Asp) prevents normal protein expression, as detected by immunoprecipitation [2]. This loss of function allele determines the phenotype of natural sensitivity

\* Corresponding author. Tel.: +1 450 687 5010x4681; fax: +1 450 686 5301.

E-mail address: mathieu.cellier@iaf.inrs.ca (M.F. Cellier).

to infection by bacterial and eukaryotic intracellular parasites (e.g., *Mycobacteria* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Leishmania donovani*), which was measured by increased microbial growth rates in reticulo-endothelial organs, and corrected by wild-type *Nramp1* transgenesis [1]. Pathogens in the blood are rapidly ingested by resident macrophages of the spleen and liver, and may find inside phagosomes lacking a functional *Nramp1* a permissive niche where they can better survive and replicate. In the case of *Salmonella* Typhimurium, *Nramp1*<sup>-/-</sup> mice rapidly succumb to low dose infection.

## 2. *Nramp1* phylogenetic origin and conserved role in eukaryotic host defense

*Nramp1* orthologs were identified, in mammals, birds and amphibians (Fig. 1); they represent homologs differing in sequence due to species-specific evolution and are believed to perform similar functions. Human *NRAMP1* displays an expression profile similar to the mouse ortholog, and *NRAMP1* gene polymorphisms were associated with innate resistance to mycobacterial infections, including tuberculosis and leprosy, in several ethnic backgrounds and despite potentially confounding factors (environmental, individual), implying that the role discovered in mouse innate immunity is conserved in humans [7,8]. Polymorphisms were identified in *Nramp1* orthologs of upper vertebrate species (monkey, horse, cattle, sheep, pig, dog and chicken), and some were associated with resistance/susceptibility to infectious diseases (e.g. canine leishmaniasis) [3]. Gene specific evidence obtained in several host species and different pathogens, establish an important role of *Nramp1* in upper vertebrate innate immunity to infection.

Species possessing the *Nramp1* gene also express a paralog, *Nramp2* (aka *DMT1*, *DCT1*, *SLC11A2*; Fig. 1), implying an ancestral *Nramp* gene duplication at least 350 million years ago. Contrarily to *Nramp1*, the protein *Nramp2*, is expressed ubiquitously and is critical for iron homeostasis in rodents, humans and in zebra fish [6,9,10]. Several *Nramp2* isoforms are produced by 5' and/or 3' alternative splicing and differ in tissue and subcellular distribution rather than function [11]. *Nramp2* isoform I is found at the apical membrane of epithelial cells (duodenum, kidney) while isoform II, with a different C-terminus (25 a.a. residues), is expressed at the cell surface and recycling endosomes of most cells [6,10,12]. *Nramp2* isoform I is under dual regulation by the iron status: binding of Iron Responsive Proteins (IRP) to its 3' end IR Element (IRE) stabilizes *Nramp2-I* mRNA and up-regulates the protein expression; *Nramp2-I* is also transcriptionally up-regulated in the intestine and kidney upon Fe deficiency, encoding a N-terminal 29–31 a.a. residues longer polypeptide (A) in human and rat (Fig. 2). *Nramp2-I* enables dietary iron uptake in the duodenum, and possibly iron reabsorption in kidney, while *Nramp2-II* facilitates mainly transferrin (Tf)-dependent iron uptake in most peripheral tissues, including erythrocytes; *Nramp2-II* is also up-regulated by inflammatory stimuli in macrophages and epithelial cells.

So far, only *Nramp2* homologs were found in teleost fish (Figs. 1 and 2), which nonetheless express most genes involved in iron homeostasis in upper vertebrates and display multi-lineage hematopoiesis. Fish *Nramp2* are also up-regulated in response to infection and inflammatory stimuli, implying that the role of *Nramp*-dependent transport in vertebrate host defense pre-dated the *Nramp1/2* gene duplication [13,14]. This proposition is supported by reports showing that archetype *Nramp* homologs function also in host resistance in more distant organisms. The plant *Oryzae sativa* *Nramp 1–3* mRNAs levels were regulated by bacterial and fungal infections in both resistant and susceptible interactions [15]. In the amoeba *Dictyostelium discoideum*, a professional phagocyte feeding on bacteria, *NrampB1* mRNA accumulated in growing cells, and was up- or down-regulated upon bacterial infection by *M. avium* or *Legionella pneumophila*, respectively. An *NrampB1-C-GFP* fusion was localized in the membrane of an intracellular acidic compartment labeled with lysosomal markers, suggesting a role in the maturation of the phagosome [16].

Gene duplications enable to diversify tissue-specific expression, e.g., by rapid differential loss of gene regulating DNA motifs that may be compensated by the later acquisition of novel motifs. It is hypothesised that the emergence of *Nramp1* enabled to segregate phagocyte-specific versus ubiquitous expression determinants, and to evolve to a host defense function relaxed from constraints imposed by tissue iron supply and vice-versa. *Nramp2* gene could thus exhibit remnants of its ancestral role in host defense, a suggestion compatible with observations made by double immuno-fluorescence studies of mouse phagocytes (macrophages and Sertoli cells) [3]. *Nramp2-II* was expressed at low level not only in the plasma membrane and the early endosome but also in lysosomes and latex phagosomes (lacking markers of the early endosomes, EEA1 and Tf receptor (TfR) but positive for the late endosome/lysosome markers Lamp1, rab7, and cathepsin D). *Nramp2* mRNA is also up-regulated in macrophages by a gram negative bacteria molecular pattern, LPS, and the key host defense cytokine IFN- $\gamma$ , independently of known iron-responsive genes and *Nramp1* [3,10]. A contribution of *Nramp2-II* to host defense is thus not excluded.

## 3. *NRAMP1* constitutes a first line intracellular defense against infection in humans

Granulocytes are critical to prevent animal infection and generally kill invading bacteria and fungi, while neutropenia result in life-threatening infections. Human neutrophils are the major source of *NRAMP1* protein, due to high level of *NRAMP1* expression and cell numbers. Immuno-electronic and biochemical fractionation methods localized the protein in the membrane of cytoplasmic granules containing the marker gelatinase in quiescent neutrophils [10]. These secondary and/or tertiary granules are recruited upon challenge with neutrophil agonists for fusion with the phagosomal membrane (e.g. PMA, fMLP, opsonized zymosan), where they deliver enzymes important for the destruction of ingested microbes, or

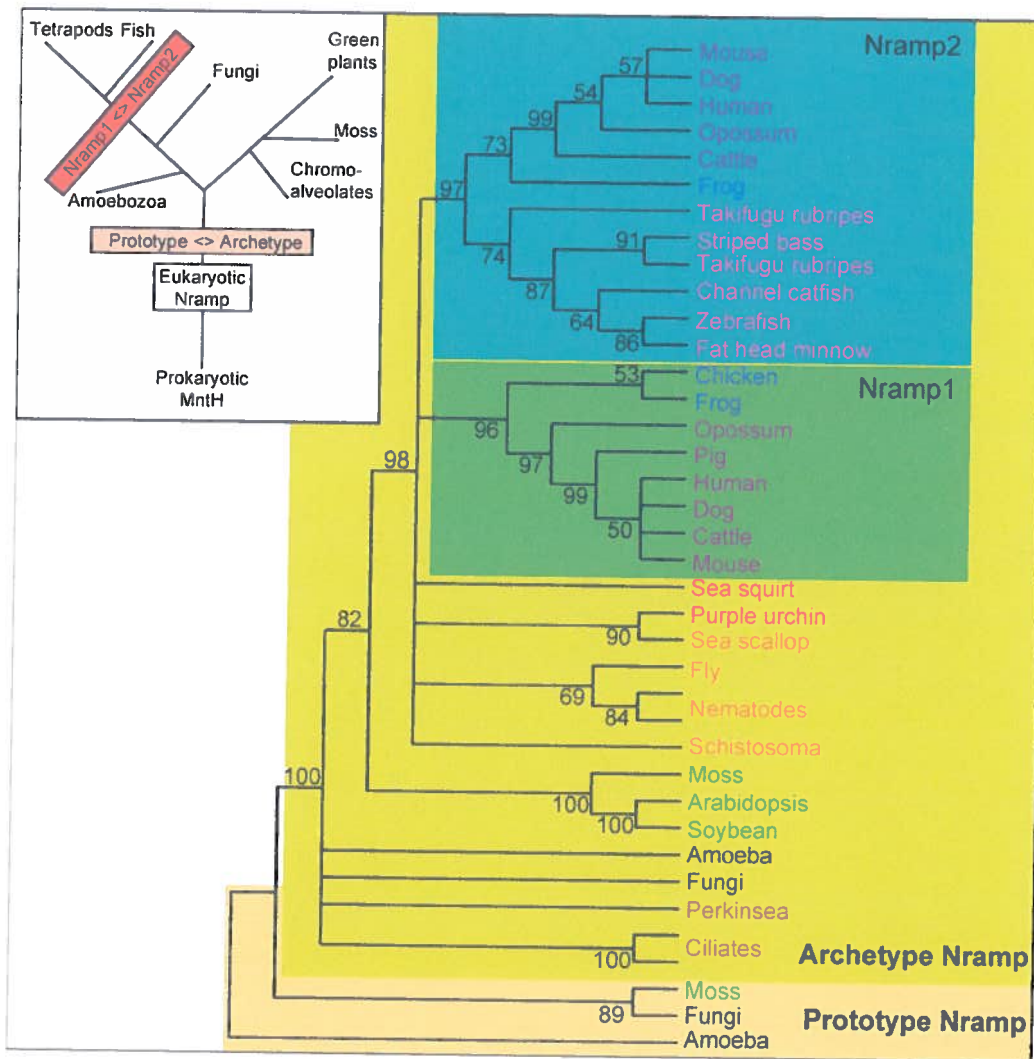


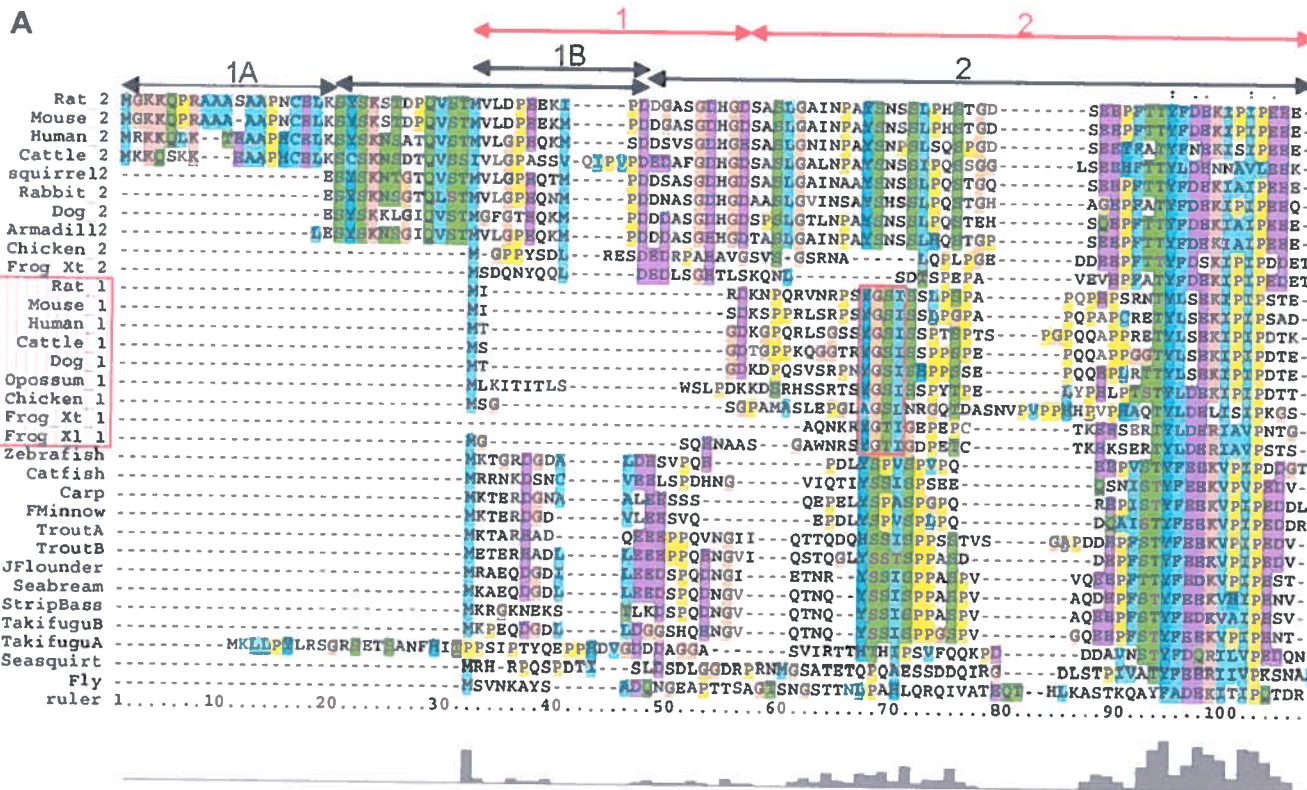
Fig. 1. An evolutionary scenario for eukaryotic Nramp1 and Nramp2 subtypes. Prototype and archetype sequences were identified in Chromoalveolata and Plantae (Bikonts), and in Amoeba, Fungi and Animals (Unikonts), and result from ancestral eukaryotic gene duplication (outparalogs, Inset and ref. [4]). Prototype Nramp sequences, used here as an outgroup (e.g., sequences from a primitive green plant (moss), the amoeba *Dictyostelium discoideum*, and a zygomycete fungus), are more closely related to bacterial MintH groups than to archetype Nramp, which were selected in organisms more recently evolved, and found in green plants (arabidopsis, soybean and moss, indicated in green), chromoalveolates (*Perkinsus*, ciliates, in brown), amoeba and fungi (in black), animal protostomes (schistosomes, nematodes, fly, sea scallop, in orange) and deuterostomes spp. (sea squirt, urchin, in red), including vertebrates (fish, pink, frog and chicken, light purple), mammals, deep purple). Phylogenetic analyses were performed as previously described using parsimonious sites of a representative set of sequences and minimal evolution, maximal parsimony and maximum likelihood approaches [4,5]. Numbers indicate nodes consistency estimated by bootstrapping.

for exocytosis at the plasma membrane. NRAMP1 protein was virtually absent from the plasma membrane fraction of stimulated granulocytes implying a function that is mainly intracellular.

NRAMP1 expression is strictly regulated during myeloid development and NRAMP1 expression parallels mRNA accumulation [10]. The kinetics of NRAMP1 mRNA accumulation resembles that of other functional markers found in specific granules of mature granulocytes. NRAMP1 gene expression is also induced during monocytic differentiation and the protein similarly found in the membrane of intracellular vesicles and of the phagosome containing heat killed yeasts [10].

Transfections of model human cells with NRAMP1 promoter constructs of different length or sequence were

performed to study transcriptional activity. U-937 monocytic cells were used to analyze NRAMP1 response to LPS and IFN- $\gamma$  and compare different length alleles of a polymorphic CA repeat. The most frequent allele 3 drove higher basal expression and in response to LPS, while the second most frequent allele 2, longer by one CA repetition, was a poor promoter further down-regulated by LPS; IFN- $\gamma$  stimulated all the constructs [10,17]. The activity of allele 3 was further shown to depend on another polymorphism ( $\bullet$  237C > T, aka 332C > T). Combination of the allele 3 and  $\bullet$  237T variant reduced NRAMP1 expression in response to LPS and ferric ammonium citrate (the strongest single stimulator of allele 3) in U-937 cells, as well as NRAMP1 basal promoter activity in 293 epithelial cells [18].



**B**

Species	Score	Expect	Identities	3' UTR IRE sequence
<i>Xenopus tropicalis</i>	32.2	30	25/28 89%	GCCATCAGAGCCTGTGTGTTTCTATGGT
<i>Anolis carolinensis</i>	40.1	0.59	26/28 92%	GCCATCAGGGCCAGTGCCTTTCTATGGT
<i>Monodelphis domestica</i>	56.0	1e-05	28/28 100%	GCCATCAGAACCAGTGCCTTTCTATGGT
<i>Loxodonta Africana</i>	40.1	0.59	26/28 92%	GCCATCAGAGCCAGTGTGTTTCTATGGT
<i>Erinaceus europaeus</i>	40.1	0.59	26/28 92%	GCCATAGAAACCAGTGTGTTTCTATGGT
<i>Mus musculus</i>	40.1	0.15	26/28 92%	GCCATCAGAGCCAGTGTGTTTCTATGGT
<i>Homo sapiens</i>	40.1	0.15	26/28 92%	GCCATCAGAGCCAGTGTGTTTCTATGGT
Consensus hairpin bulge and "CAGUGN" sequence (IUPAC ambiguous nucleotide code)				Y CWGTGY

Q2 Fig. 2. Terrestrial vertebrate Nramp1 and 2 terminal sequences show structural conservation. A. Database mining for sequence similarity to human NRAMP 5' exons (1 and 2, indicated above the multiple sequence alignment by red arrows, NRAMP1, and black arrows, NRAMP2, respectively) showed low level of protein conservation but consistent with phylogenetic relationships deduced from full-length Nramp sequence analyses (Fig. 1). Notably, the motif YGSI (boxed in red), which is required for mouse Nramp1 intracellular targeting to lysosomes [26], is specifically conserved among candidate Nramp1 homologs from terrestrial vertebrates but not from two sister-groups of fish (Otocephala including zebrafish, channel catfish, carp and fathead minnow, and Euteleostei); *Xenopus tropicalis* and *X. laevis*, respectively. B. Nucleotide sequence alignment of Nramp2 3'-UTR IRE (28 nt-long sequence folding as a hairpin with a CWGTGY apical loop motif recognized by IRP proteins and stabilizing mRNA) identified by BlastN searches using the marsupial sequence [60] as a query against NCBI databases (Nr, WGS, and dblast), shows conservation in amphibian, reptile and mammals homologs.

The cell line HL-60 was used to model NRAMP1 mRNA accumulation during days following monocytic and granulocytic differentiation [19]. VitD induced moderate NRAMP1 transcription and relative mRNA stability, compared to monocytes marker CD14. A DNA fragment extending 600 bp

upstream of NRAMP1 ATG (CA repeat allele 3 and • 237C variant) enabled transcription of a downstream luciferase gene in response to myeloid differentiation, which paralleled NRAMP1 mRNA accumulation, while the promoter fragment response to IFN-g was differentiation independent. A shorter

DNA fragment (263 bp 5' of *NRAMP1* ATG), is strongly active in non-myeloid background and not upregulated during myeloid differentiation. *NRAMP1* mRNA also contains several 3' AU-rich elements (ARE), known to bind proteins that regulate mRNA stability, such as HuR, which stabilizes *NRAMP1* mRNA in differentiated cells [20].

The up-regulation of *NRAMP1* protein expression in professional phagocytes implies a specific anti-microbial role for *NRAMP1*. Similar constitutive expression of *Nramp1* in mouse phagocytes progenitors, circulating neutrophils and macrophages was reported [3,10]. So far, relatively limited conservation was found between the mouse and human orthologs promoter organization and mRNA stabilizing motifs. Future work is required to better understand the molecular control of *NRAMP1* expression and the role of divalent metals uptake from granulocytes phagosomes.

#### 4. *Nramp1* limits pathogens survival and growth within macrophage phagosomes

Before its discovery by positional cloning the mouse *Nramp1* gene was designated the locus *Bcg/Lsh1lty*, depending on the intracellular pathogen used to reveal its role (*M. bovis* BCG/*L. donovani*/*S. typhimurium*, respectively) [1]. The phagosome initially formed by membrane enclosing the ingested microbe is poorly microbicidal and must acidify, gradually acquire and activate digestive enzymes by fusion/fission events with endomembrane compartments of the endosomal/lysosomal pathways. Such phagosome maturation is specifically blocked or disturbed in naïve macrophages by virulent pathogens that use diverse strategies.

Metals such as iron (Fe) and manganese (Mn) are elemental co-factors of numerous proteins involved in essential functions including respiration, protection against oxidative stress, and cellular replication. Depending on the microbe physiology, specific functions in survival, growth and/or virulence may be affected by the concentration of Fe or Mn ions available [21]. Export of these essential metals out of the phagosome could exert pleiotropic effects on microbial metabolism and ability to perturb the maturation of the phagosome, and the influence of *Nramp1* may vary depending on microbes. This hypothesis was demonstrated in two phylogenetically distant models of professional phagocytes expressing an intracellular, lysosomal-type *Nramp*.

Confocal analyses in *D. discoideum*, showed that *NrampB/1-C-GFP* fusion is recruited to the membrane of phagosomes containing either heat-treated yeasts, co-localizing with the vacuolar ATPase, *Escherichia coli* or *L. pneumophila* [16]. *NrampB/1* knockout conferred increased susceptibility to *M. avium* and *L. pneumophila*, which was corrected by constitutive expression of *NrampB/1-C-GFP*, restoring WT susceptibility to *M. avium* infection but increasing significantly host cell resistance to *L. pneumophila*.

The mouse strains and macrophage cell lines commonly used to study the phagosome maturation process lack a functional *Nramp1* protein (e.g., C57BL/6 and J774A.1, respectively). Functional assays designed to address how *Nramp1*

restricts pathogens growth in mouse primary macrophages and transfected macrophage cell lines used *Mycobacteria*, *Salmonella* and *Leishmania* spp. [3,22].

Slow-growing mycobacteria (*M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. bovis* BCG) block the macrophage phagosome maturation at an early stage, preventing acidification (below pH 6.5) while preserving access to endosomal TfR iron, due to specific molecular interactions between host proteins and phosphoinositides and pathogen-derived glyco-lipids and proteins. Microfluorescence excitation ratio imaging in live cells showed better acidification of *Nramp1*<sup>+</sup> phagosomes containing individual, dually-labeled, *M. bovis* BCG (pH 5.5), though not reaching the value of *Nramp1*<sup>+</sup> phagosomes containing inert particules or dead mycobacteria (pH 5; achieved in *Nramp1*<sup>+</sup> Raw 264.7 transfectants [1,3]). These data indicated that *Nramp1* antagonizes the pathogen inhibitory activity, by favoring the phagosome maturation and recruitment of the vacuolar H<sup>+</sup>/ATPase, by a yet unknown mechanism. Interestingly, several *M. bovis* BCG genes required for intraphagosomal parasitism, both preventing phagosomal acidification and sustaining bacterial growth, were identified by transposon mutagenesis and high throughput sequence analyses [23]. In addition, electron microscopic approaches revealed that, over time, virulent *M. avium* intracellular replication and integrity, and capacity to inhibit the phagosome maturation, were impaired by *Nramp1* expression, which also induced better acidification of the phagosomal lumen [3]. Hence, both mouse *Nramp1* and Dictyostelium *NrampB/1* naturally antagonize *M. avium* strategy for intracellular parasitism of phagocytes.

The *Salmonella* containing vacuole (SCV) inside macrophages interacts transiently with early endosomes but acquires only a few late endosomal and lysosomal markers, and remains negative for the transmembrane mannose-6-phosphate receptor (M6PR) that cargoes soluble acid hydrolases from the trans-Golgi network to pre-lysosomal compartments [1,3]. The presence of a functional *Nramp1* protein in the membrane of SCVs enhanced both their accessibility to endosomal vesicles containing fluid phase markers, and the delivery of the M6PR. But, contrarily to observations with *Mycobacteria*, *Nramp1* did not modulate either SCV pH, between 6.0 and 6.3, or the recruitment of the late endosome/lysosome marker *Lamp1*.

Intracellular metal depletion using membrane-permeable Fe chelators could mimic the effect of *Nramp1* on intracellular *Salmonella* by resuming the maturation of the SCV and hereby inhibiting bacterial growth [3], and *S. Typhimurium* appeared sensitive to intracellular metal depletion by overexpression of Ferroportin [24]. Transcriptome analysis also indicated that macrophage *Nramp1*<sup>-/-</sup> phagosomes do not constitute an iron-limiting environment [25], and proteome analysis revealed that host *Nramp1* regulates a novel *Salmonella* protein which promotes intracellular growth [26].

#### 5. *Nramp1* is a cell-autonomous component of host local metal withdrawal defense

Limited availability of essential metals such as Fe, Mn and zinc (Zn) is detrimental for cell survival and growth. In

response to infection, animal organisms withhold endogenous metals to prevent microbial growth, while induced iron overload generally favor microbial replication [27]. Virulent pathogens have devised many ways to manipulate host defenses for their own profit to acquire host iron [28–31]. It is also critical that the host ensures sufficient supply of metal cofactors for cellular defense, including key enzymatic redox activities such as the NADPH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and myeloperoxidase. Hence, the suggestion that Nramp1-mediated resistance to *S. typhimurium* and *L. donovani* does not depend on reactive forms of oxygen and nitrogen supports its prime role as a first line host defense [22].

Host cells must also prevent redox stress that could result from increased (redox active) cytosolic Fe pool by tightly regulating Fe acquisition and distribution [32]. In absence of infection or inflammation, most Fe taken up by tissue macrophages clearing senescent erythrocytes and apoptotic cells is rapidly recycled through the circulation after export via Ferroportin (Fpn1). Following oxidation by ceruleoplasmin (Cp), Fe<sup>3+</sup> is then loaded on Tf. The remaining Fe fraction is stored intracellularly after oxidation and inclusion into the ferritin (Ftn) mineral core, while a small amount remains soluble as a cytoplasmic pool, which regulates cellular iron homeostasis through IRP/IRE interactions and Fe containing enzymes.

In response to infection, Fe export is blocked concurrently with dietary iron uptake, which reduces plasmatic Fe and Tf levels while Ftn and macrophage stores are increased. Though high and low MW Ftns (H- and L-Ftn) are normally expressed in mature tissue macrophages, the ferroxidase active H subunit is increased in response to infection, resulting in elevated H-Ftn plasmatic levels [33]. Increased storage capacity in activated macrophages should enable safe disposal of intracellular Fe.

Measurement of Nramp1-dependent transport at the phagosomal membrane generated some controversy, discussed in [1,3,6,22,34]. Current weight of evidence supports the notion that Nramp1 functions similarly to other members of the Nramp family. Nramp1-dependent Mn<sup>2+</sup> efflux from phagosomes of live primary macrophages was monitored by in situ microfluorescence imaging, using a metal-sensitive and pH-resistant fluorescent dye (Fura-FF6) covalently coupled to porous zymosan particles, and comparing Nramp1<sup>+</sup> and Nramp1<sup>-</sup> phagosomes. Adding Mn<sup>2+</sup> extracellularly after phagocytosis or using labeled particles quenched with Mn<sup>2+</sup> before phagocytosis revealed in both case that Nramp1<sup>+</sup> phagosomes pumped more Mn<sup>2+</sup> into the cytosol, an activity abrogated with the vacuolar ATPase inhibitor bafilomycin, suggesting that Nramp1 transport is pH-dependent.

A similar interpretation was deduced from transport experiments using radiolabeled <sup>59</sup>Fe-citrate, NrampB/1<sup>+</sup> or <sup>-</sup> amoebas, and purified latex phagosome preparations shown by western blot to be enriched in endo-lysosomal markers, and NrampB/1 when present [16]. At external pH 5.5–5.0, temperature-dependent iron influx into phagosomes required the presence of NrampB/1 or NrampB/1-C-GFP; it was reduced by simultaneous addition of Mg-ATP. Iron efflux was observed by adding either Mg-ATP or a weak base after iron import

started; in both cases, a reduction in phagosome-associated <sup>59</sup>Fe suggested pH-dependent divalent metal efflux, assuming that the vacuolar ATPase was present and active, as well as a ferri-reductase. Ferri-reductases were identified in compartments containing Nramp2-I and/or -II isoforms [32] suggesting that Nramp1 and NrampB/1 also require a reducing activity to obtain Fe<sup>2+</sup>.

These studies concur with another that correlated cell surface expression of an HA-tagged Nramp1 in transfected epithelial cells with time-, temperature-, and proton-dependent divalent metal uptake (Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>), using metal-sensitive probes (Calcein and Fura-2, respectively) and radionucleides (<sup>55</sup>Fe, <sup>54</sup>Mn), using ascorbate to reduce extracellular Fe. Similar results were obtained with Nramp2 similarly HA-tagged (in the extracytoplasmic loop 7/8), implying that both Nramps facilitate pH- and proton-dependent divalent metal uptake into the cytosol [1,3]. In addition, electrophysiological measurements in *Xenopus* oocytes expressing the rat Dct1, fish isoforms Slc11 β and γ, and a yeast Nramp homolog (SMF1) revealed properties of secondary transporters that use the electrochemical gradient of a driving ion (here proton) to couple the entry of solute metals, without a strict metal-specificity or a fixed stoichiometry of cations co-transport [6,34,35]. Lastly, evidence of divalent metal and proton co-transport was obtained in bacteria expressing the *E. coli* Nramp ortholog, aka proton-dependent Mn transporter, MntH, in whole cell assays using ICP-MS and a pH-sensitive ratiometric GFP. Mutations at sites that are invariant in the Nramp family affected similarly mouse Nramp2 and *E. coli* MntH transport activities [3,5]. Thus Nramp1 is a multispecific symporter of divalent metals and protons, whose role in upper vertebrate innate immunity is to restrict access to essential micro-nutrients within the phagosome.

Fe availability at the site of infection is also restricted by host soluble proteins among which H-Ftn and two others secreted by inflamed epithelial cells and neutrophils -as components of their specific granules-, Lactoferrin (LF) and Lipocalin-2 (Lcn2 aka NGAL or siderocalin) [28,29,33]. The coordinated expression of humoral factors and phagocytes intracellular Nramp1, which are both constitutive and up-regulated in tissues upon sensing infection, probably enables to rapidly restrict Fe and Mn availability and limit microbial growth at epithelial surfaces.

## 6. Integration of host local and systemic metal withdrawal defense against infection

The immediate local metal withholding defense is generally followed by a systemic response, which affects the levels of many plasmatic proteins by regulating their production by hepatocytes (acute phase response, [36]). Acute phase proteins (APP) include iron-binding proteins among others involved in innate response to infection and wound. Both the up-regulation of the hemoglobin (Hb) binding proteins haptoglobin (Hp) and hemopexin (Hb and hemin scavenger), the iron storage ferritin (L-Ftn), Lcn2, and the copper transport protein Cp,

and the down-regulation of the Fe transport and delivery protein Tf, contribute to reduce serum Fe availability.

Interleukin-6 (IL-6) is the major regulator of APPs and it stimulates host metal withdrawal defense by acting both on mononuclear phagocytes and hepatocytes. IL-6 induces hypoferrremia and hypozincemia [36]. The most important APP for systemic iron withdrawal is the soluble mediator hepcidin, which is a Cys-rich b-defensin-like peptide that acts as a hormone limiting serum iron levels. In particular, hepcidin binds to the membrane Fe exporter Fpn1, triggering down-regulation of Fpn1 protein surface expression, de facto shutting off iron export at the baso-lateral membrane of the duodenum enterocytes, and plasma membrane of erythrocytes recycling macrophages (e.g. spleen; liver, Kupffer cells), which then act as the two primary sites of intracellular storage of excess body Fe [32,37].

In absence of inflammation, hepcidin levels are controlled by several regulators (positive, bone morphogenetic protein isoforms 2 and 4, increased Tf saturation levels, and IL6; negative, soluble hemojuvelin, hypoxia), which activate hepatocytes through the common mediator Smad4-, or hypoxia inducible factor  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )-dependent intracellular pathways that converge to regulate hepcidin gene promoter, and sustain adequately the body iron demand in different compartments [32,38–40]. In response to infection, it appears that the homeostatic mechanisms controlling hepcidin expression and body iron metabolism are short-circuited due to several inflammatory cytokines, such as IL-1, -6 and -10, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  [36,37]. Thus, chronic infection or inflammation can induce severe anemia, which is typified by impaired Fe mobilization, increased plasmatic Ftn and low serum Fe and Tf levels despite high reticulo-endothelial macrophage stores, which thwart proliferation of erythroid progenitor cells.

Microarray analyses of host and pathogen gene expression using a (air-pouch) granulomatous model of extra-cellular infection, showed that an acute phase response was induced locally, in the hours following infection with an *E. coli* extra-intestinal pathogen [41]. Differential gene expression analyses revealed that bacteria up-regulated functions involved in Fe, Mn and Zn uptake, while Fe storage and protection against Fe-dependent oxidative stress were repressed, consistent with a global response to host metal withholding defense. Host gene analyses supported the notion of local elicitation of an acute phase response and hepcidin production [41]. Hepcidin expression in professional phagocytes was induced by bacterial LPS and TLR4-dependent, but independent of IL-1 and IL-6, which are also produced by phagocytes in response to infection [42–44]. Thus, host metal withholding defense may be more complex and integrated than previously thought.

## 7. Contribution of Nramp1 to macrophage iron metabolism and activation

Contrarily to *TfR1*, *Fpn1* and *Nramp2* neither the targeted disruption of *Nramp1*, *LF* nor *Lcn2* genes did affect mice iron status, suggesting that these effectors of local metal withdrawing defense may not necessarily play a major role in Fe

homeostasis in steady state conditions. Another debated role of *Nramp1* is a contribution to erythrocyte heme iron recycling. The main endogenous soluble modulators of tissue macrophage Fe metabolism so far appear to be IL-1, -6 and -10, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , which regulate the expression of *Nramp1* and 2-II [1,3,10], *TfR1*, *H-Ftn* and *Fpn1*, as well as hepcidin, which interacts directly with *Fpn1* [32,33]. Further investigations appear warranted to study in details the regulation of macrophage functions in Fe metabolism.

Due to its redox properties, Fe is sensitive to reactive oxygen and nitrogen species (ROS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-\*</sup> and RNS: NO, GS-NO), which can produce radicals by redox cycling and damage cellular constituents. Cells use labile 4Fe-4S cluster-protein complexes such as the eukaryotic IRP1, or Fe- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (that target HIF $\alpha$  and IRP2) to sense ROS, RNS and/or hypoxia, and rapidly mount an adequate protective response by regulating coordinately Fe and energy metabolisms [32,45,46]. Both in eukaryotic and prokaryotic cells, NO negatively affects labile Fe and triggers responses to Fe deficiency. Interestingly, the *E. coli* *Nramp* ortholog *MntH* is part of the NO and Fe, Fur-dependent regulon [47], suggesting that cytosolic influx of *MntH* preferred substrate, Mn<sup>2+</sup>, which is a much more redox stable ion, could favor oxidative stress resistance, by modulating intracellular Mn/Fe ratio [21]. Mn<sup>2+</sup> uptake systems are specifically expressed during infection of both plants and animals, and some transporters were shown to be required for virulence [48].

Macrophages are probably well adapted to resist Fe-induced cellular damage since they constitute a major site for both body Fe transit and storage, and production of ROS and RNS, which regulate among others, HIF $\alpha$  activity, cell survival and cytokines secretion [44,49]. Interestingly, Co<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, which are both substrates for *Nramp* proteins [1,3,6,34] were found to stabilize and activate both IRP1 and HIF $\alpha$  [50]. *Nramp1* expression in professional phagocytes could thus modulate cytosolic Mn<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> levels and enhance resistance to Fe-based oxidative stress. But, since activated macrophages express many receptors to scavenge Fe-rich compounds, Fe influx may predominate. The issue is complicated by technical problems to measure cytoplasmic labile Fe and impact of cellular metabolic state [39,46,51,52].

Hence, the balance of Fe and Mn or Co availability could affect differentially *Nramp1*<sup>+</sup> and <sup>-/-</sup> macrophages sensitivity to oxidative stress, and because several signaling pathway are regulated by ROS and RNS, *Nramp1* transport could also affect macrophage activation levels [7,17,53–55]. The realization that professional phagocytes contribute to increasingly prevalent immune pathologies, including autoimmune disorders, fueled studies looking for correlation between efficient innate defense and increased incidence of inflammatory disorders [7,17,55]. An *NRAMP1* allele conferring higher level of gene transcription in transfected cells was associated with both better resistance to mycobacterial diseases and increased incidence of immune disorders. The underlying mechanism remains to be established.

## 8. Evolution of Nramp1 as a phagocyte intracellular defense in terrestrial vertebrates

Prokaryotic MntH proteins function in response to metal-limited environments and oxidative stress. After transfer to eukaryotic cells *Nramp* gene duplication occurred early in evolution yielding prototype and archetype *Nramp*, which both persisted in species that diverged basally to the Eukaryota tree (Fig. 1). An ancestral role of archetype *Nramp* in host defense was evoked in studies using amoeba, plants, as well as several fish species, and is supported by detailed phylogenetic analyzes [4,13,15,16].

Archetype *Nramps* in basal metazoans are not closer to *Nramp1* or 2 subtypes (Fig. 1). Though only teleost *Nramp2* were identified so far, amphibians and reptiles possess both *Nramp1* and 2 genes. It seems possible that vertebrate *Nramp* parologs resulted from genome-wide duplications that occurred before the divergence of teleosts [56] and that *Nramp1* was lost in teleosts, but maintained during the evolutionary transition from fish to amphibian. Selective pressure to maintain *Nramp1* function could have involved migration from marine to terrestrial environment, the development and diversification of limbs, including bones, muscles and the expansion of epithelial and endothelial surfaces. Such changes probably offered novel anatomical niches that could be exploited by various airborne pathogens, challenging host defenses. Alternatively, involvement of *Nramp2* dependent Fe uptake in intercellular communication, including neuron NO-signaling [57,58] might suggest that *Nramp1* and 2 parologs evolved more recently, coinciding with emergence of behavior functions in tetrapods [59].

The specific expression of *Nramp1* in professional phagocytes, which are recruited first at sites of infection thus likely represent an adaptation to defend epithelial and endothelial surfaces of terrestrial vertebrates, which enabled divergence in protein intracellular targeting and mRNA stability regulation (Fig. 2). A better understanding of *Nramp* proteins roles in phagocytes intracellular metal metabolism and resistance to pathogens will be an important step in designing improved therapeutic approaches against selected infectious and immune diseases.

## Acknowledgements

We apologize to the researchers whose studies are not cited here due to space constraints. Supported by a NSERC Discovery grant and the Fondation Armand-Frappier.

## References

- [1] J.R. Forbes, P. Gros, Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 397–403.
- [2] S.M. Vidal, E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier, P. Gros, Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1* D169) mouse strains, *J. Immunol.* 157 (1996) 3559–3568.

- [3] N. Jabado, S. Lam-Yuk-Tseung, J. Forbes, P. Gros, in: C. Mathieu, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Landes Bioscience/Kluwer Academic, New York, 2004, pp. 1–15.
- [4] E. Richer, P. Courville, M.F.M. Cellier, in: M. Cellier, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Landes Bioscience/Kluwer Academic, New York, 2004, pp. 179–193.
- [5] R. Chaloupka, P. Courville, F. Veyrier, B. Knudsen, T.A. Tompkins, M.F. Cellier, Identification of functional amino acids in the *Nramp* family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo, *Biochemistry* 44 (2005) 726–733.
- [6] B. Mackenzie, M.A. Hediger, SLC11 family of H(+)-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 571–579.
- [7] A. Poon, E. Schurr, in: M.F.M. Cellier, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Kluwer Academic/Landes, New York, 2004, pp. 29–43.
- [8] S. Malik, L. Abel, H. Tooker, A. Poon, L. Simkin, M. Girard, G.J. Adams, J.R. Starke, K.C. Smith, E.A. Graviss, J.M. Musser, E. Schurr, Alleles of the *NRAMP1* gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 12183–12188.
- [9] H. Gunshin, Y. Fujiwara, A.O. Custodio, C. Drenzo, S. Robine, N.C. Andrews, *Slc11a2* is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1258–1266.
- [10] F. Canonne-Hergaux, P. Gros, in: M.F.M. Cellier, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Kluwer Academic/Landes, New York, 2004, pp. 96–112.
- [11] B. Mackenzie, H. Takanaga, N. Hubert, A. Rolfs, M.A. Hediger, Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1), *Biochem. J.* 403 (2007) 59–69.
- [12] S. Lam-Yuk-Tseung, N. Touret, S. Grinstein, P. Gros, Carboxyl-terminus determinants of the iron transporter DMT1/SLC11A2 isoform II (-IRE/1B) mediate internalization from the plasma membrane into recycling endosomes, *Biochemistry* 44 (2005) 12149–12159.
- [13] E.J. Burge, D.T. Gauthier, C.A. Ottinger, P.A. Van Veld, Mycobacterium-inducible *Nramp* in striped bass (*Morone saxatilis*), *Infect. Immun.* 72 (2004) 1626–1636.
- [14] S.L. Chen, Y.X. Zhang, J.Y. Xu, L. Meng, Z.X. Sha, G.C. Ren, Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 147 (2007) 29–37.
- [15] X. Zhou, Y. Yang, Differential expression of rice *Nramp* genes in response to pathogen infection, defense signal molecules and metal ions, *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 65 (5) (2004) 235–243.
- [16] B. Peracino, C. Wagner, A. Balest, A. Balbo, B. Pergolizzi, A.A. Noegel, M. Steinert, S. Bozzaro, Function and mechanism of action of Dictyostelium *Nramp1* (*Slc11a1*) in bacterial infection, *Traffic* 7 (2006) 22–38.
- [17] J.M. Blackwell, H.-R. Jiang, J.K. White, in: M.F.M. Cellier, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Kluwer Academic/Landes, New York, 2004, pp. 53–64.
- [18] M.G. Zaahl, K.J. Robson, L. Warnich, M.J. Kotze, Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: opposite effect in the presence of -237C → T, *Blood Cells Mol. Dis.* 33 (2004) 45–50.
- [19] E.A. Roig, E. Richer, F. Canonne-Hergaux, P. Gros, M.F. Cellier, Regulation of NRAMP1 gene expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes, *J. Leukoc. Biol.* 71 (2002) 890–904.
- [20] Y.Z. Xu, S. Di Marco, I. Gallouzi, M. Rola-Pleszczynski, D. Radzioch, RNA-binding protein HuR is required for stabilization of SLC11A1 mRNA and SLC11A1 protein expression, *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) 8139–8149.
- [21] M.J. Daly, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M.V. Omelchenko, H.M. Kostandarites, K.S. Makarova, L.P. Wackett, J.K. Fredrickson, D. Ghosal, Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance, *Science* 306 (2004) 1025–1028.
- [22] J.K. White, P. Mastroeni, J.F. Popoff, C.A. Evans, J.M. Blackwell, *Slc11a1*-mediated resistance to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Leishmania donovani* infections does not require functional inducible



- nitric oxide synthase or phagocyte oxidase activity, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 311–320.
- [23] G.R. Stewart, J. Patel, B.D. Robertson, A. Rae, D.B. Young, Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification, *PLoS Pathog.* 1 (2005) 269–278.
- [24] B.D. Dill, J.E. Raulston, Examination of an inducible expression system for limiting iron availability during *Chlamydia trachomatis* infection, *Microbes Infect.* 9 (2007) 947–953.
- [25] S. Eriksson, S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, J.C. Hinton, Unraveling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 103–118.
- [26] L. Shi, J.N. Adkins, J.R. Coleman, A.A. Schepmoes, A. Dohnkova, H.M. Mottaz, A.D. Norbeck, S.O. Purvine, N.P. Manes, H.S. Smallwood, H. Wang, J. Forbes, P. Gros, S. Uzau, K.D. Rodland, F. Heffron, R.D. Smith, T.C. Squier, Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar *Typhimurium* inside macrophages, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29131–29140.
- [27] J.R. Boelaert, S.J. Vandecasteele, R. Appelberg, V.R. Gordeuk, The effect of the host's iron status on tuberculosis, *J. Infect. Dis.* 195 (2007) 1745–1753.
- [28] U.E. Schaible, S.H. Kaufmann, Iron and microbial infection, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 946–953.
- [29] S.T. Ong, J.Z. Ho, B. Ho, J.L. Ding, Iron-withholding strategy in innate immunity, *Immunobiology* 211 (2006) 295–314.
- [30] M.A. Fischbach, H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R.J. Abergel, D.R. Liu, K.N. Raymond, B.L. Wanner, R.K. Strong, C.T. Walsh, A. Aderem, K.D. Smith, The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 16502–16507.
- [31] M.S. Thomas, Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex, *Biometals* 20 (2007) 431–452.
- [32] M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, N.C. Andrews, Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism, *Cell* 117 (2004) 285–297.
- [33] I. Theurl, G. Fritsche, S. Ludwiczek, K. Garimorth, R. Bellmann-Weiler, G. Weiss, The macrophage: a cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections, *Biometals* 18 (2005) 359–367.
- [34] Y. Nevo, N. Nelson, The NRAMP family of metal-ion transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 609–620.
- [35] C.A. Cooper, M. Shayeghi, M.E. Techau, D.M. Capdevila, S. MacKenzie, C. Durrant, N.R. Bury, Analysis of the rainbow trout solute carrier 11 family reveals iron import < or = pH 7.4 and a functional isoform lacking transmembrane domains 11 and 12, *FEBS Lett.* 581 (2007) 2599–2604.
- [36] C. Gabay, I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 448–454.
- [37] G. Weiss, L.T. Goodnough, Anemia of chronic disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1011–1023.
- [38] I. De Domenico, D.M. Ward, J. Kaplan, Hecpudin regulation: ironing out the details, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1755–1758.
- [39] L.L. Dunn, Y.S. Rahmanto, D.R. Richardson, Iron uptake and metabolism in the new millennium, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 93–100.
- [40] C. Peyssonnaud, A.S. Zinkernagel, R.A. Schuepbach, E. Rankin, S. Vaulont, V.H. Haase, V. Nizet, R.S. Johnson, Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs), *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1926–1932.
- [41] S.T. Motley, B.J. Morrow, X. Liu, I.L. Dodge, A. Vitiello, C.K. Ward, K.J. Shaw, Simultaneous analysis of host and pathogen interactions during an in vivo infection reveals local induction of host acute phase response proteins, a novel bacterial stress response, and evidence of a host-imposed metal ion limited environment, *Cell Microbiol.* 6 (2004) 849–865.
- [42] N.B. Nguyen, K.D. Callaghan, A.J. Ghio, D.J. Haile, F. Yang, Hecpudin expression and iron transport in alveolar macrophages, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291 (2006) L417–L425.
- [43] C. Peyssonnaud, A.S. Zinkernagel, V. Datta, X. Lauth, R.S. Johnson, V. Nizet, TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens, *Blood* 107 (2006) 3727–3732.
- [44] C. Peyssonnaud, P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A.S. Zinkernagel, R.S. Johnson, V. Nizet, Cutting edge: essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis, *J. Immunol.* 178 (2007) 7516–7519.
- [45] E. Berra, A. Ginouves, J. Pouyssegur, The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling, *EMBO Rep.* 7 (2006) 41–45.
- [46] W.H. Tong, T.A. Rouault, Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis, *Biometals* 20 (2007) 549–564.
- [47] M.C. Justino, J.B. Vicente, M. Teixeira, L.M. Saraiva, New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2636–2643.
- [48] H. Rediers, P.B. Rainey, J. Vanderleyden, R. De Mot, Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (2005) 217–261.
- [49] C. Piccoli, A. D'Aprile, M. Ripoli, R. Scrima, D. Boffoli, A. Tabilio, N. Capitanio, The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions, *FEBS Lett.* 581 (2007) 3111–3119.
- [50] Q. Li, H. Chen, X. Huang, M. Costa, Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-regulated genes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213 (2006) 245–255.
- [51] A.D. Sheftel, A.S. Zhang, C. Brown, O.S. Shirihai, P. Ponka, Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion, *Blood* 110 (2007) 125–132.
- [52] A. Ali, Q. Zhang, J. Dai, X. Huang, Calcein as a fluorescent iron chemosensor for the determination of low molecular weight iron in biological fluids, *Biometals* 16 (2003) 285–293.
- [53] L.F. Barrera, M. Olivier, in: M.F.M. Cellier, P. Gros (Eds.), *The Nramp Family*, Kluwer Academic/Landes, New York, 2004, pp. 44–52.
- [54] H.J. Knowles, D.R. Mole, P.J. Ratcliffe, A.L. Harris, Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1, *Cancer Res.* 66 (2006) 2600–2607.
- [55] S. Kissler, P. Stern, K. Takahashi, K. Hunter, L.B. Peterson, L.S. Wicker, In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes, *Nat. Genet.* 38 (2006) 479–483.
- [56] D. Larhammar, L.G. Lundin, F. Hallbook, The human Hox-bearing chromosome regions did arise by block or chromosome (or even genome) duplications, *Genome Res.* 12 (2002) 1910–1920.
- [57] S. Ludwiczek, I. Theurl, M.U. Muckenthaler, M. Jakab, S.M. Mair, M. Theurl, J. Kiss, M. Paulmichl, M.W. Hentze, M. Ritter, G. Weiss, Ca<sup>2+</sup> channel blockers reverse iron overload by a new mechanism via divalent metal transporter-1, *Nat. Med.* 13 (2007) 448–454.
- [58] J.H. Cheah, S.F. Kim, L.D. Hester, K.W. Clancy, S.E. Patterson III, V. Papadopoulos, S.H. Snyder, NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1, *Neuron* 51 (2006) 431–440.
- [59] R.K. Reinscheid, Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods, *Peptides* 28 (2007) 830–837.
- [60] P. Piccinelli, T. Samuelsson, Evolution of the iron-responsive element, *RNA* 13 (2007) 952–966.

## Article 5

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Solute carrier II cation symport requires distinct residues in transmembrane helices I and 6, *Journal of Biological Chemistry* (2008) 283, 9651-9658.

doi: 10.1074/jbc.M709906200.

Pour cet article, j'ai participé aux expériences se rapportant aux figures 1 (A,B,D,E), figures 2, 3, 5, tableau 1, figure additionnelle 1, 2 (A,B,C), 3E et 4A. J'ai également participé à la rédaction de ce manuscrit.

## Mise en contexte :

Étant donné que l'approche phylogénique nous a permis d'identifier 5 résidus clés impliqués dans différents aspects du mécanisme d'action d'EcolIA, nous avons caractérisé les cinétiques de transport du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  des 5 mutations (D34G, N37T, H211Y, N250T et N401T) à des sites correspondant à des mutations de type II entre l'outgroup et la famille Nramp/MntH. L'acide aminé D34 situé dans le premier segment transmembranaire est nécessaire au couplage du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$ . Les 3 substitutions d'asparagine en thréonine indiquent que ces sites sont impliqués dans des contacts inter-hélices en affectant soit le changement de conformation du transporteur (N37T, N250T) ou bien le  $\gamma_{\text{max}}$  du transport du  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  (N401T). Tandis que l'histidine à la position H211, faisant partie du motif MPH situé dans le 6<sup>e</sup> segment transmembranaire, est requise pour la régulation par le pH du transport du  $\text{Me}^{2+}$ .

Nous avons également étudié le mécanisme d'action d'EcolIA *in vivo* et *in vitro* en utilisant des vésicules de type RSO (même configuration que la cellule entière) ou ISO (configuration inversée). EcolIA possède une asymétrie dans le transport du Cd. Le transport direct est de type électrogénique, dépendant du potentiel de membrane, du CaChet d'un donneur d'électrons. Le transport de type inverse semble correspondre à de la diffusion facilitée. En combinant le marquage des cystéines aux 5 résidus clés et un modèle structural basé sur l'homologie possible avec la famille de LeuT, nous proposons que D34 et H211 sont situés à l'intérieur d'hélices discontinues pouvant ainsi délimiter un canal aqueux.

## SUPPLEMENTARY DATA

This file contains Sup\_Fig. legends 1-5, Sup\_Methods1-2, Sup\_Table 1, and Sup\_Figs 1-5.

**Sup\_Fig. 1.** Kinetics of MntH-dependent transport. **A)** Inhibitory effect of Mn<sup>2+</sup> on MntH-dependent Cd<sup>2+</sup> transport. Transport of 2.5 μM Cd<sup>2+</sup> (<sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup>, 60 mCi/μmol) was measured using *E. coli* GR536 cells expressing MntH-WT at pH 6.5 and 37°C by a quick filtration assay as described in Methods. Initial rates of transport were determined after 10 s and corrected for unspecific Cd<sup>2+</sup> uptake as determined in the presence of 10 μM CCCP. Data were fitted to the Cheng-Prusoff equation ( $K_i = IC_{50} / [1 + (S/K_M)]$  using  $S = K_M = 2.5 \mu\text{M}$  of Cd<sup>2+</sup>). **B and C)** Determinations of  $K_{0.5}$  and  $V_{max}$  of MntH-dependent Cd<sup>2+</sup>-induced H<sup>+</sup> transport. Kinetics were deduced by fitting to the Michaelis-Menten equation of intracellular pH fluorescent measurements monitored after 1000 s (1). Cells harvested after induction of protein expression were washed and resuspended in citrate-phosphate buffer (pH 4.7-5.7) at an OD<sub>600</sub> of 0.2 before addition of Cd<sup>2+</sup>.

**Sup\_Fig. 2.** Functional expression of MntH variants at Nramp family conserved sites. **A)** Western blot of c-Myc tagged membrane proteins. **B)** Disk assay of metal sensitivity of WT and mutant MntH (with or without c-myc tag, top and bottom, respectively). **C)** Disk-assay of growth at 42°C of the metallo-dependent *E. coli* Ts strain SL93 *mntH* (2) expressing WT or mutant MntH in the absence (-, no growth; +, clear lawn; +++, dense lawn) and the presence of FeSO<sub>4</sub> (diameter (mm) of growth ring around a disk impregnated with 1M salts). MntH-specific data were obtained by subtracting values observed with *mntH* cells containing pBAD as negative control. n.a., not applicable. **D).** Intracellular acidification of *mntH E. coli* cells expressing plasmid encoded MntH-WT or -mutants, and a recombinant pH-dependent ratiometric GFP, was induced by addition of 100 μM Cd<sup>2+</sup> and measured at 520 nm using a dual excitation at 410 and 470 nm as described in Methods.

**Sup\_Fig. 3.** Sidedness of membrane vesicles. **A-D)** Effect of the proton-motive force (pmf) generated by respiration. Relative fluorescence (%) was measured using the following membrane potential probes: **A)** diSC3(5) (1 μM, *negative inside*) with RSOV, **B)** diBA (1 μM, *positive inside*) with ISOV, and the pH probe 9-AA (9-aminoacridine; 5 μM, *acid inside*) with ISOV (**C**). Arrows indicate injections of 10mM of the respiratory substrate D-lactate (Lac) as well as K<sup>+</sup> ionophores, 0.1 μM nigericin (Nig, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange) and/or 0.1 μM valinomycin (Val, K<sup>+</sup> ionophore). **D)** The extent of contamination of vesicle preparations by vesicle of opposite orientation was evaluated by measuring diS-C<sub>3</sub>(5) response to ISOV energization, and changes in diBA-C<sub>4</sub>(5) fluorescence after the energization of RSOV. Cross-contamination of ISOV (9

± 5%) was deduced from detection of D-lactate-induced *negative inside* membrane potential. **EF**) Topological orientation of MntH. **E**) Accessibility of selected residues previously located in extra membranous regions (predicted loops between TMS6/7 and TMS11/12; 3) was established by F5M labeling either after (+) or prior to (-) incubation with a charged and large competitor reagent (4-Acetomido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt (AmDis, 0.5mM), using the single Cys MntH mutants R228C (cytoplasmic) and G418C (periplasmic) and RSOV (left panel; top, protein silver staining) or ISOV (right panel; top, protein Coomassie staining) preparations. **F**) Metal-dependent H<sup>+</sup> transport by intact *E. coli* DH11S *mntH* (pGBM6-pH) cells (3) expressing MntH-WT or C-terminally 12TMS-His<sub>10</sub> tagged versions of MntH-WT, -R228C and -G418C proteins was measured by dual excitation of intracellular pH-luorin as described in Methods.

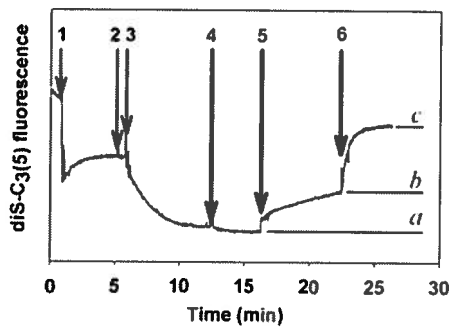
Sup Fig. 4. Metal uptake by whole cells expressing WT and mutant MntH. **A**) Influence of  $\Delta\psi$  on MntH-WT activity in intact cells. An *E. coli mntH* mutant lacking the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase, strain PAP3402 [HN594 (*malTc*  $\Delta$ *unc* *ilv::Tn10 arg his*; 4) carrying an F' *lacIq pro* ]  $\Delta$ *mntH* (pBAD-MntH) was used to measure Mn<sup>2+</sup> uptake in absence of  $\Delta$ pH (pH<sub>out</sub> ~pH<sub>in</sub> ~7.4). Uptake of 3  $\mu$ M Mn<sup>2+</sup> (<sup>54</sup>Mn<sup>2+</sup>, 41  $\mu$ Ci mmol<sup>-1</sup>) was measured for 6 min at 37°C, by a quick filtration assay. Cells were pre-incubated for 3min with metabolic inhibitors, either  $\mu$ M amount of membrane protonophore (CCCP), to collapse  $\Delta\psi$ , or mM amount of arsenate, which depletes ATP stores, measured using a Luciferase ATP Determination kit (Sigma). Data represent the mean of at least 2 independent experiments; bars represent SE. **B**) Disk-assays of bacterial growth during expression of MntH-WT and MntH variants (12TMS-His<sub>10</sub> constructs) in the presence of indicated metals. Cells in exponentially growth phase were plated on top agar and incubated at 37°C for 16h after adding disks impregnated with metal solutions. Mean diameter of cell growth inhibition ± SE are presented (control values obtained with cells harbouring pBAD vector alone were subtracted).

Sup Fig. 5. LeuT-based SLC11 structural model. Views from the periplasm (**A,C**) and the membrane plane (**B,D,E**) of a complete representative SLC11 model (**A,B**, ModBase entry Q9RPF2 [MNTH2\_PSEAE]), a selection of sites representing candidate type II evolutionary rate-shifts (**C,D**, corresponding to residues that are conserved in the SLC11 family and matched by different residues, also conserved in the outgroup), or its superimposition on the SLC6/LeuT template structure (**E**; 5). The color code used to identify the TMS (**A-D**) is indicated (Box) and their inverted symmetric disposition outlined (**A**). The SLC11-specific anti-parallel motifs [D P G] (including Asp<sup>34</sup> in red) and ['H P M'] (including His<sup>211</sup> in blue) form “extended peptide/TM helix1b” and “TM helix6a/extended peptide” boundaries. The SLC11-specific Asn residues in TMS 1, 7 and 11 (Asn<sup>37,250,401</sup>) are shown in green (**C,D**). Viewed from the periplasm the cations binding sites (Asp<sup>34</sup> and His<sup>211</sup>) appear central and close to each other, lining a water-

accessible cavity (A, C), and buried at similar depth within the hydrophobic core in views from the membrane plane (B,D).

**Sup\_Meth. 1.** MntH solubilization and purification. RSOV or ISOV containing given MntH 12TMS-His<sub>10</sub> constructs served as starting material for solubilisation and purification. Membrane vesicles were solubilized at a protein concentration of 5mg/mL in 0.1M Pipes-MES, pH 7.5/20% glycerol/1M NaCl (P buffer) with 2% (w/v) n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside (DDM) for 1 hour at 4°C or 0.8 % (w/v) cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) for 30min at 30°C. The soluble fraction was collected as the supernatant after ultracentrifugation (106,000 x g; 1hour) and incubated for 3 hr at 4°C in presence of Ni-sepharose (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc) and 20mM imidazole. Batch purification was performed with three sequential 1mL washes in P buffer containing 20, 40 and 100 mM imidazole, respectively. Elution was performed using 40 $\mu$ L of P buffer containing 250mM imidazole.

**Sup\_Meth. 2.** Electrogenicity of MntH forward transport in vitro. Fluorescent data acquisition began following addition to MntH-WT RSOV incubated in 0.1 M Pipes/Mes pH 7.5, 0.1 M KCl and 10 mM CaCl<sub>2</sub>, of (see below, 1) the  $\Delta\psi$  sensitive fluorescent probe diSC3, (2) asc, (3) PMS, and (4) nigericin, which yielded the baseline level of fluorescence intensity corresponding to  $\Delta\psi_{\max}$  (a), before adding (5) 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>, which resulted in a variation of the fluorescence level detected depending on MntH activity induced by Cd<sup>2+</sup> addition (b), and (6) valinomycin, which collapsed  $\Delta\psi$  (c). Electrogenicity of Cd<sup>2+</sup> transport was deduced from the mean of the ratio (c-a/b-a).



Supplementary Table

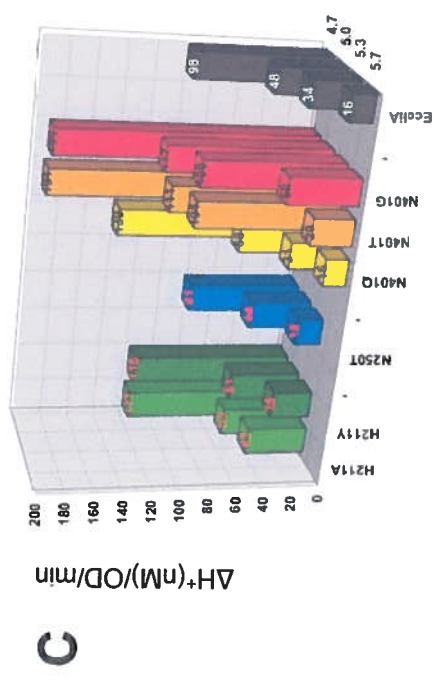
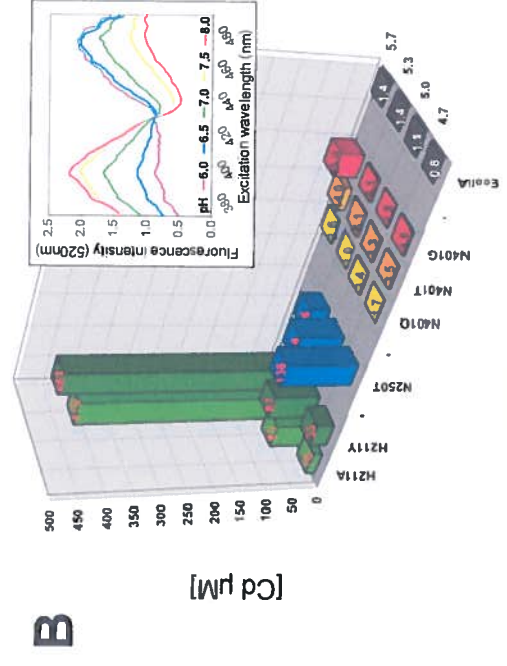
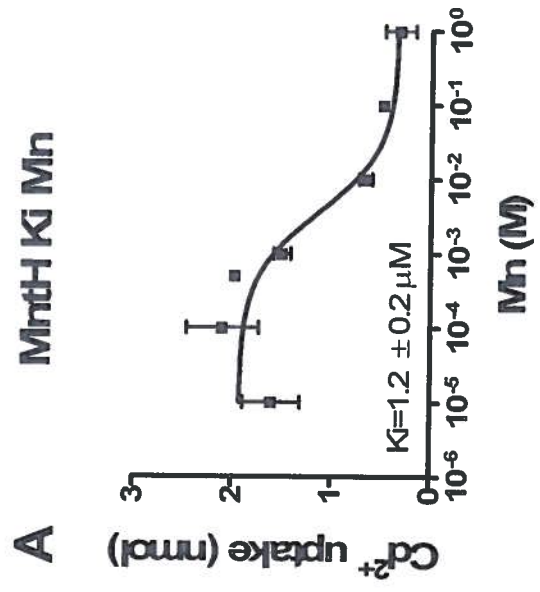
Sup\_Table I. Sequence of the oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence <sup>a</sup>
Wild type	A I G Y I D P G N F A 5' G GCG ATT GGT TAT ATC GAT CCC GGT AAC TTT GCG
D34E	5' G GCC ATT GGT TAT ATC <i>GAG</i> CCC GGT AAC TTT GC
D34C	5' G GCC ATT GGT TAT ATC <i>TGT</i> CCC GGT AAC TTT GC
Wild type	G Y I D P G N F A T N I Q 5' GGT TAT ATC GAT CCC GGT AAC TTT GCG ACC AAT ATT CAG GC
N37Q	5' C GAT CCC GGT <i>CAG</i> TTT GCG ACC A
N37C	5' GGT TAT ATC GAT CCC GGT <i>TGC</i> TTT GCG ACC AAT ATT CAG GC
Wild type	A T I M P H V I Y L H S S 5' GCG ACG ATT ATG CCG CAT GTG ATT TAT TTG CAC TCC TCG C
H211C	5' GCG ACG ATT ATG CCG <i>TGT</i> GTG ATT TAT TTG CAC TCC TCG C
Wild type	T I A G F V N L A M M A 5' G ACT ATT GCC GGT TTT GTC AAT CTG GCG ATG ATG GCT AC A
N250T	5' G ACT ATT GCC GGT TTT GTC <i>ACA</i> CTG GCG ATG ATG GCT AC
N250Q	5' CT ATT GCC GGT TTT GTC <i>CAG</i> CTG GCG ATG ATG GCT
N250C	5' ACT ATT GCC GGT TTT GTC <i>TGT</i> CTG GCG ATG ATG GCT AC A
Wild type	V L V V A L N I W L L V G 5'GTG CTG GTC GTG GCG CTG AAT ATC TGG TTG TTG GTG GGG
N401Q	5' G GTC GTG GCG CTG <i>CAG</i> ATC TGG TTG TTG GTG GGG
N401C	5'GTG CTG GTC GTG GCG CTG <i>TGT</i> ATC TGG TTG TTG GTG
Wild type	P T S I A G F F G D H 5' G CCA ACT AGT ATC GCC GGA TTC TTC GGC GAT CAT C
G418C	5' G CCA ACT AGT ATC GCC <i>TGC</i> TTC TTC GGC GAT CAT C
R228C	Appeared fortuitously, codon change CGT to <i>TGT</i>
MntH <i>Stul</i> 3'	5' AAC TAC <b>AGG CCT</b> AAC GCC GTC CCC ACC
Casei TM5'	5' CCT TAA <b>AGG CCT</b> GCC AAC TAG TAT CGC CGG ATT
Casei TM 3'	5' TCG <b>TCT AGA</b> TAG ATC TTG CTT TCG CCT CTT T
12 TMS-His <sub>10</sub>	5' GAC <b>TCT AGA</b> TGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GAG ATC <b>TTG CTT TCG CCT CTT TTT C</b>

<sup>a</sup> sequence of site directed mutated codons is indicated in bold  
 Restriction sites are underlined

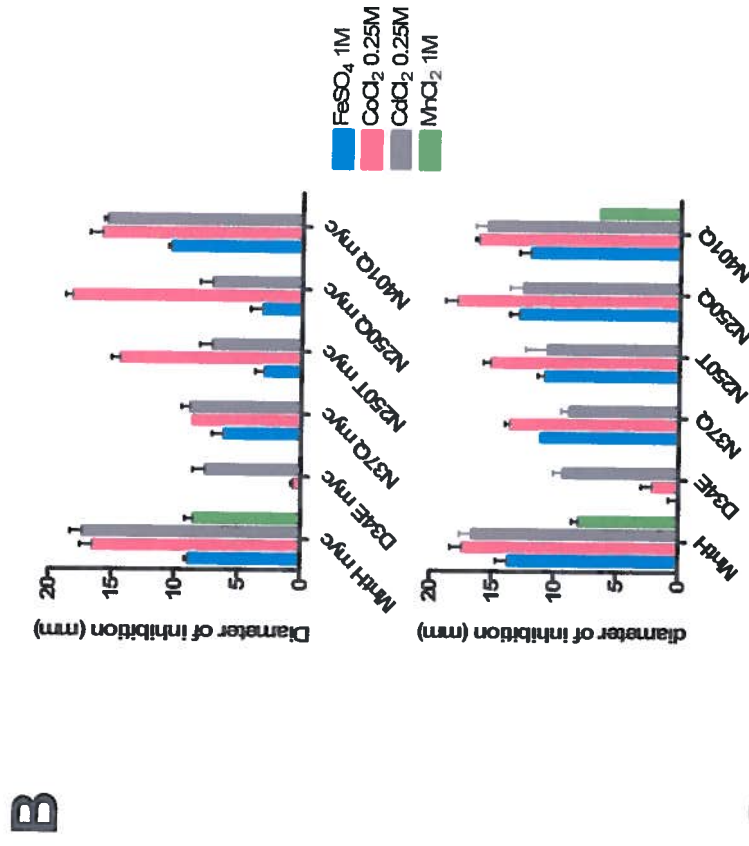
References

1. Chaloupka, R., Courville, P., Veyrier, F., Knudsen, B., Tompkins, T. A., and Cellier, M. F. (2005) *Biochemistry* **44**, 726-733
2. Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 1065-1078
3. Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., and Cellier, M. F. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3318-3326
4. Davidson, A. L., and Nikaido, H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4254-4260
5. Kawabata T. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3367-3369



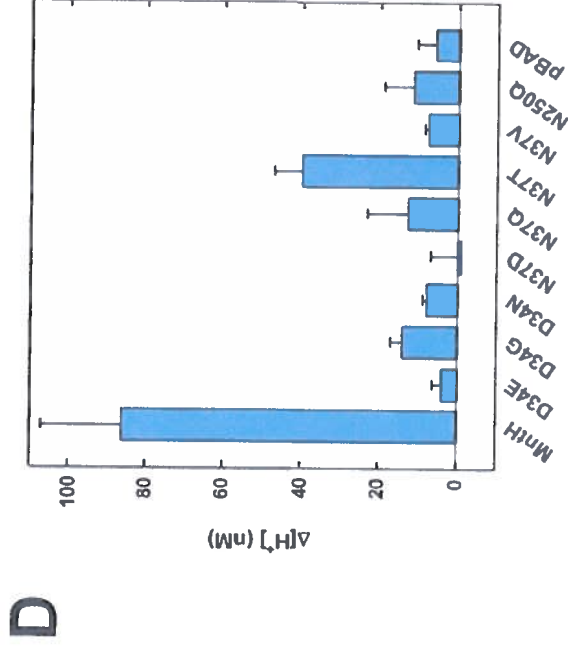
Supplementary Figure 1  
Courville et al.



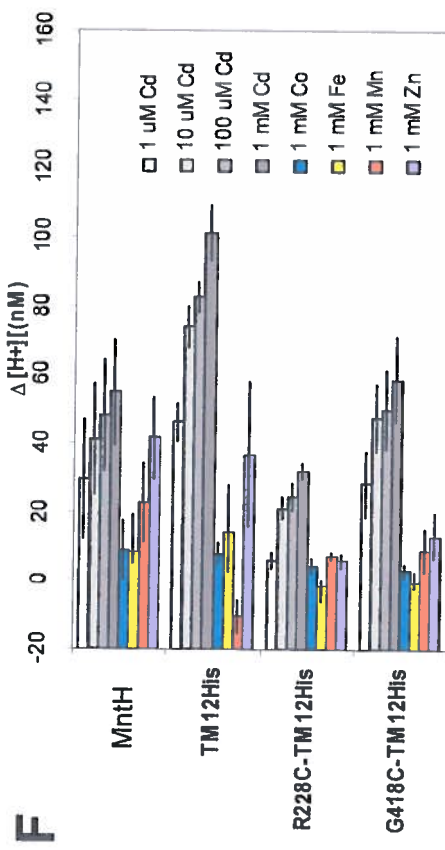
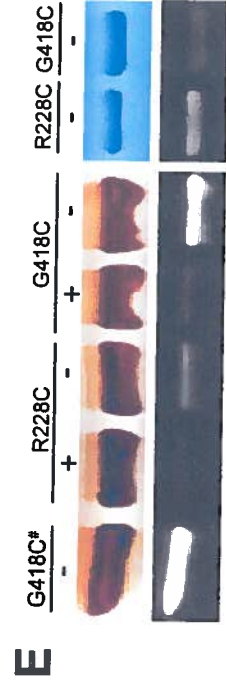
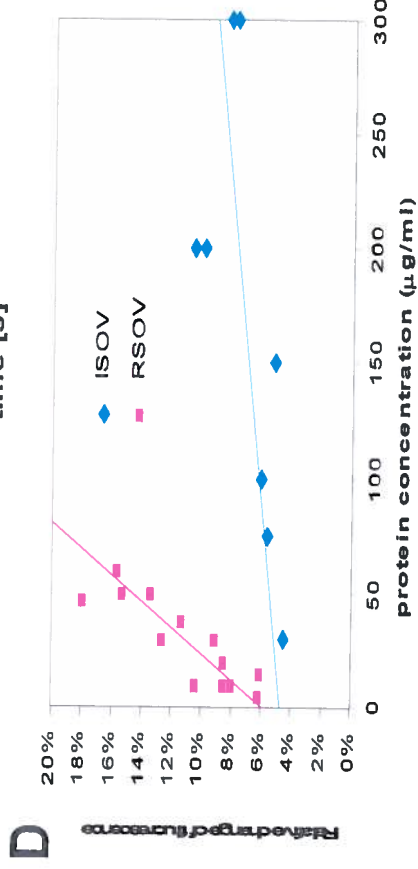
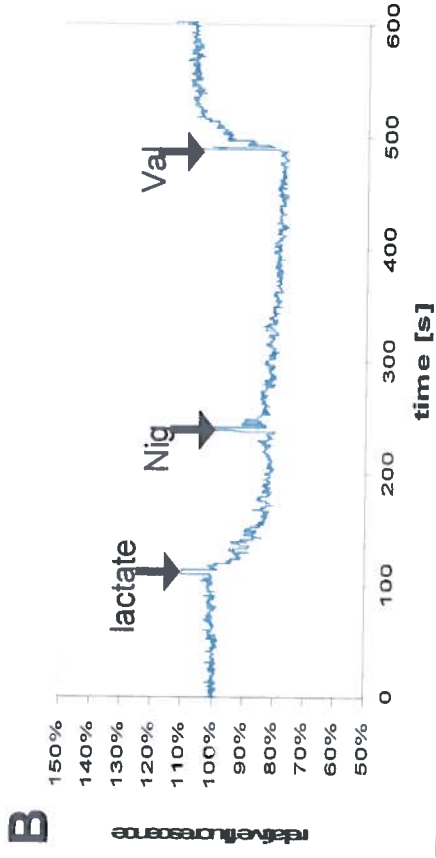
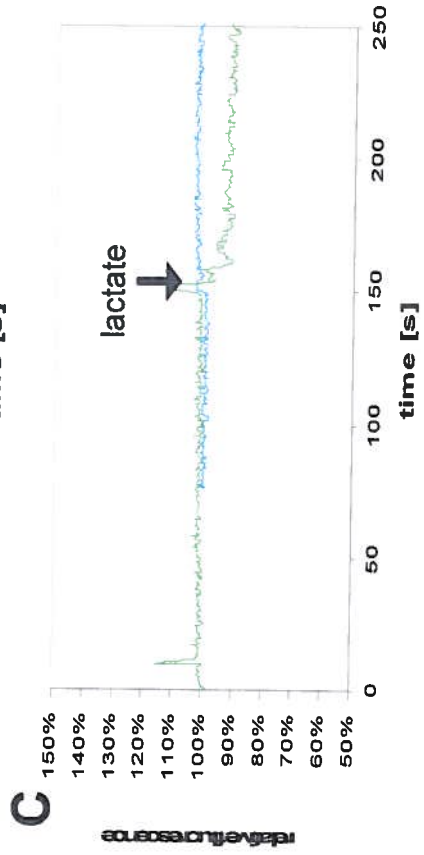
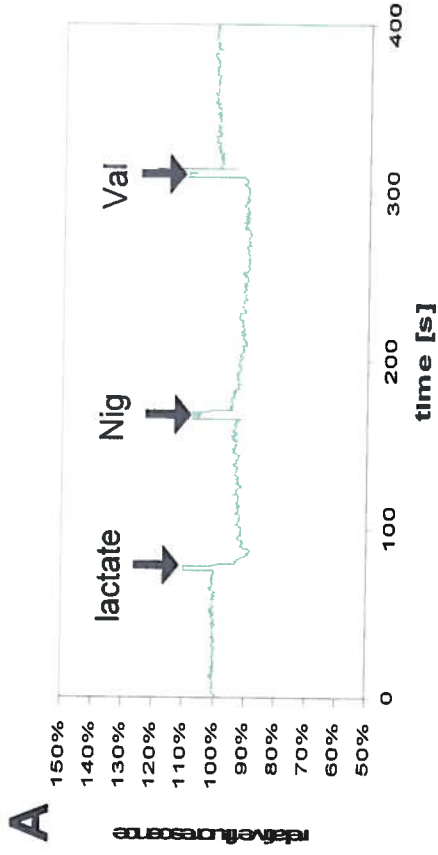


**C**

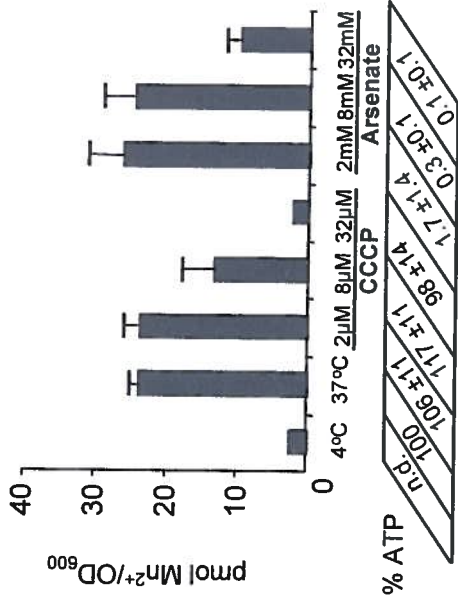
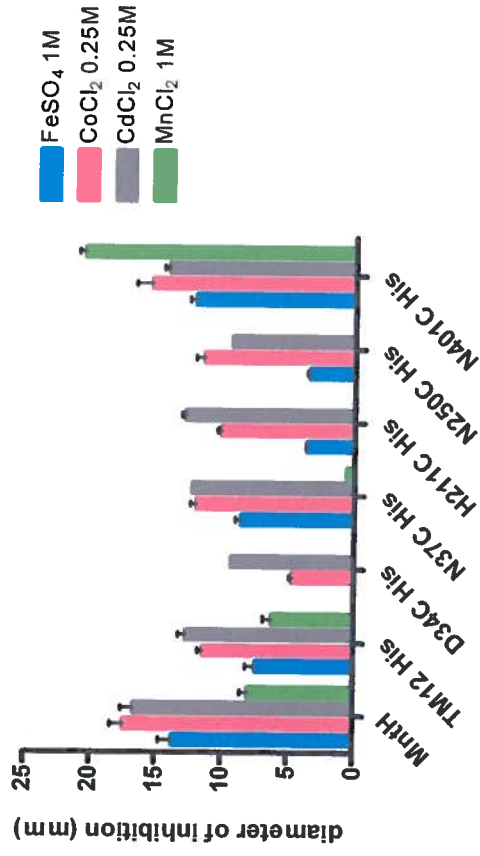
	+++	-	-	-	-	+
+ Fe <sup>2+</sup>	n.a.	0	0	9	9	n.a.



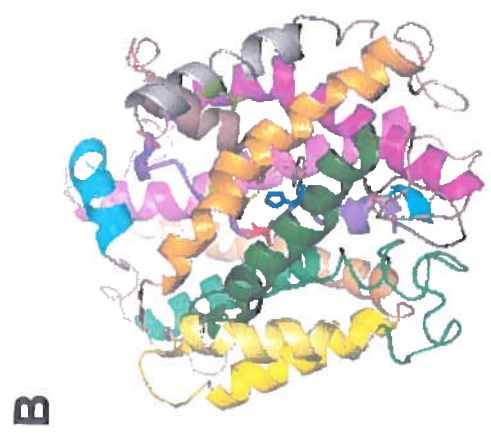
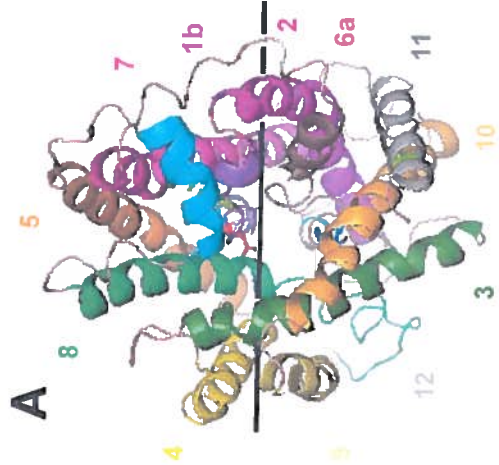
**Supplementary Figure 2**  
Courville *et al.*



Supplementary Figure 3  
Courville *et al.*

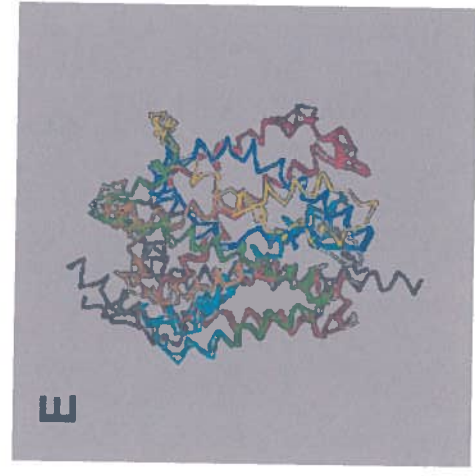
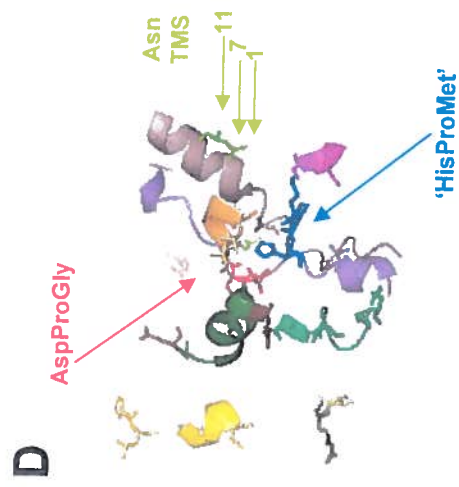
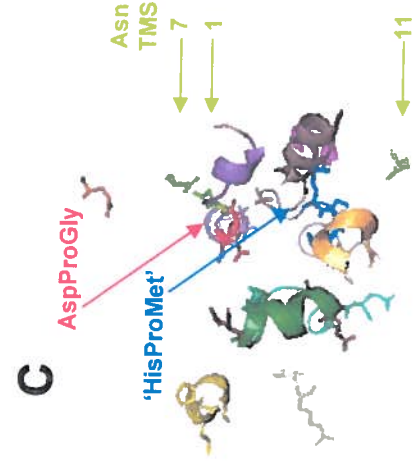
**A****B**

Supplementary Figure 4  
Courville *et al.*



**Color codes**

TMS	Residues
Purple, 1 and 6	Red, Asp,
Magenta, 2 and 7	Asp-Pro-Gly
Green, 3 and 8	Blue, His,
Yellow, 4 and 9	'His-Pro-Met'
Orange, 5 and 10	Green, Asn
Greys, 11 and 12	



**Supplementary Figure 5**  
 Courville *et al.*

## DISCUSSION ET CONCLUSION

## 1. Choix d'un épitope pour permettre la détection et la purification d'EcoliA

Avant de débiter la caractérisation *in vitro* d'EcoliA, nous avons dû optimiser la procédure pour surexprimer et purifier MntH en introduisant différents épitopes aux extrémités N-terminale (His<sub>6</sub>-Enterokinase, His<sub>10</sub>, HAT, T7 et StrepII tag) et C-terminale (c-myc, His<sub>6</sub>-myc) afin de faciliter sa détection et sa purification. La purification par chromatographie d'affinité (sur colonne de Nickel) est peu favorable lorsqu'une queue poly-histidine se retrouve dans un environnement oxydant, le périplasme (Rahman *et al.*, 2007). Nous avons donc décidé d'introduire à l'extrémité C-terminale un douzième segment transmembranaire dérivé de l'homologue MntH *Lactococcus casei*, suivi d'un épitope His<sub>10</sub>. En regardant le niveau d'activité, vis-à-vis du métal et du proton, ainsi que le niveau d'expression d'EcoliA, la présence du 12<sup>e</sup> segment transmembranaire-His<sub>10</sub>, est apparue bien tolérée et présentait un bon niveau d'activité et d'expression de la protéine à la membrane. De plus, le groupe du Dr. Baldwin a mis sur pied une procédure pour permettre la purification des protéines membranaires en se basant sur leur topologie en utilisant EcoliA comme modèle pour les protéines possédant 11 segments transmembranaires (Rahman *et al.*, 2007). Cette procédure utilise la topologie prédite pour planifier l'insertion d'épitopes aux endroits les plus susceptibles de permettre la surexpression et la purification des protéines membranaires, soit aux extrémités N- ou C-terminus situées du côté cytoplasmique. Ces résultats confortent nos résultats qui démontrent que EcoliA est peu tolérante à l'introduction de différents épitopes à ses deux extrémités.

## 2. Étude fonctionnelle des résidus correspondant à des mutations de type II entre l'outgroup et Nramp/MntH

Pour faciliter l'identification des résidus potentiellement impliqués dans le mécanisme d'action (symport  $Me^{2+}/H^+$ ) des protéines appartenant à la famille Nramp/MntH, nous avons utilisé une approche phylogénétique qui se base sur l'évolution des séquences en calculant les taux de substitution à des sites spécifiques. Par exemple, les résidus spécifiques d'un groupe à une position donnée peuvent refléter une divergence

structurale et/ou fonctionnelle. Selon cette hypothèse, les sites les plus conservés dans chacun des groupes mais correspondant à des résidus qui diffèrent entre ces groupes doivent correspondre à des contraintes structurelles ou fonctionnelles différentes. Ce type de substitution correspond à des mutations de type II. Cette approche nous a permis d'identifier 5 résidus transmembranaires qui sont invariants dans chacun des groupes de la famille Nramp/MntH et l'outgroup mais qui diffèrent entre ces groupes. Chacun de ces résidus a été substitué par celui présent dans l'outgroup (échange réciproque) soit : D34G, N37T, H211Y, N250T et N401G. Des substitutions dites plus conservatives ou d'échange pour une cystéine ont également été effectuées à chacune des positions (D34N-E-C, N37V-D-Q-C, H211A-R-C, N250Q-C et N401T-Q-C).

### 3. Transport de type symport par EcoliA

L'analyse du transport du  $H^+$  dépendant du métal, mesuré à l'aide de la pHluorin, nous a permis de démontrer pour la première fois le co-transport de type symport ( $Me^{2+}$  et du  $H^+$ ) par un homologue bactérien de la famille Nramp/MntH. De plus les résidus correspondant à des sites spécifiques de la famille Nramp ont un impact majeur sur le symport ( $Me^{2+}/H^+$ ), particulièrement les résidus aux positions D34 et H211.

### 4. Caractérisation cinétique et thermodynamique du transport via EcoliA

La majorité des études portant sur EcoliA utilisent des approches de complémentation et de toxicité reliées au métal pour mesurer l'activité vis-à-vis des cations divalents (Courville *et al*, 2004). À ce jour, aucune étude ne porte sur les cinétiques du transport du  $Me^{2+}$  et du  $H^+$ . Nous avons donc décidé d'effectuer ces caractérisations en utilisant le Cd comme substrat car il est substrat universel pour les membres de la famille Nramp et démontre une sensibilité accrue pour mesurer l'entrée du  $H^+$  dépendante du métal mesurée à l'aide de la pHluorin. Les données cinétiques à pH 6.5 et 7.5 indiquent que le  $H^+$  augmente l'affinité apparente d'EcoliA vis-à-vis du Cd ( $K_{0.5}^{Cd}$  : 2.6 $\mu$ M (pH 6.5) à 9.1 $\mu$ M (pH 7.5)). Cependant la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) augmente à pH basique (pH 7.5; tableau 1 de l'article 5). En mesurant l'entrée du  $H^+$  dépendant du

$\text{Cd}^{2+}$ , on observe l'inverse, c'est à dire qu'à pH acide il y a une plus grande acidification intracellulaire via EcoliA. Ces données montrent que le transport via EcoliA est similaire à l'homologue Nramp2, où le  $\text{H}^+$  augmente l'affinité du transporteur pour le  $\text{Me}^{2+}$ , et que le pH modifie la stœchiométrie de Nramp2 en favorisant l'entrée de  $\text{H}^+$  à pH acide (Mackenzie *et al*, 2006). Cette entrée de protons pourrait viser à limiter l'accumulation de métaux à l'intérieur de la cellule (Sacher *et al*, 2001). Comme le transport du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  semble être relativement similaire entre homologues, EcoliA constitue donc un bon modèle pour étudier le mécanisme d'action de la famille Nramp.

## 5. Effet des substitutions entre l'outgroup et EcoliA

### D34

Cet acide aminé est situé dans le 1<sup>er</sup> segment transmembranaire et fait partie du motif invariant DPGN. Toutes les substitutions effectuées à la position 34 d'EcoliA ont démontré le même effet soit de permettre une légère entrée de Cd sans variation de pH intracellulaire dépendante du  $\text{Me}^{2+}$ , même en présence de 1mM de Cd. Le mutant D34 affecte également l'affinité du transporteur vis-à-vis du Cd (tableau 1 de l'article 5). Le fait qu'on n'observe aucune modification significative du  $\Delta\psi$  en vésicules RSO confirme que cette position est impliquée dans le couplage du  $\text{H}^+$  et le transport du  $\text{Cd}^{2+}$ . La faible électrogénicité *in vitro* correspondrait donc à l'absence de transport du  $\text{H}^+$ . Les deux approches indépendantes (*in vivo* et *in vitro*) prouvent que la position D34 est impliquée dans le couplage du  $\text{H}^+$ . Cette position semble interagir directement avec le substrat. Ce mutant ne démontre aucune différence dans l'énergie d'activation ( $E_a$ ) du transport de  $\text{Cd}^{2+}$  comparé à la protéine sauvage. Une augmentation de l'énergie d'activation correspond à une mutation affectant vraisemblablement un aspect du changement de conformation. Deux autres études démontrent également que des substitutions à cette position chez EcoliA (Haemig & Brooker, 2004) et Nramp 2 (Lam-Yuk-Tseung *et al*, 2003) affectent grandement l'entrée des cations Mn, Co et Fe. L'ensemble de ces travaux indique que cet acide aminé est essentiel pour le bon fonctionnement des membres de la



famille Nramp/MntH (EcoliA et Nramp2), et nos données permettent de proposer un rôle central dans le couplage du transport  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ .

### N37

Cette position fait également partie du motif DPGN. Contrairement à D34, les substitutions à la position N37 permettent l'accumulation des cations et du  $\text{H}^+$  mais uniquement en présence de 1mM de Cd (figure 4 de l'article 2). Malgré le fait que N37T possède une affinité réduite et dépendante du pH ( $K_{0.5}^{\text{Cd}}$  15 $\mu\text{M}$ , pH 6.5) vis-à-vis du Cd (tableau 1 de l'article 5), ce mutant augmente l'énergie d'activation du transport de  $\text{Cd}^{2+}$  ce qui implique un rôle possible de N37 lors du changement de conformation (figure 1 de l'article 5). Donc le rôle sur le  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  doit se faire indirectement en limitant les liaisons à proximité de D34 et G36, deux résidus cruciaux pour le mécanisme d'action de MntH (Cohen *et al*, 2003; Haemig & Brooker, 2004). Les mutations obtenues aux positions D34 et N37 ainsi que celles obtenues chez Nramp2 indiquent clairement que le motif DPGN, situé dans le premier segment transmembranaire, est un élément clé pour le transport des  $\text{H}^+/\text{Me}^{2+}$ .

### H211

Cette histidine est située dans le segment transmembranaire 6 et fait partie du motif MPH conservé dans les homologues Nramp/MntH. Les différentes mutations démontrent un bon niveau d'activité vis-à-vis du Cd à pH acide. Ce résidu est impliqué dans la régulation du transporteur vis-à-vis du pH. La mutation H<sub>211</sub>Y démontre un  $K_{0.5}^{\text{Cd}}$  supérieur à EcoliA (4.4 vs 2.5  $\mu\text{M}$  respectivement) à pH 6.5, cependant à pH 7.5 on observe une activité similaire au contrôle négatif (vecteur seul, souche  $\Delta\text{mntH}$ , tableau 1 et figure 5 de l'article 5). La mutation correspondante pour Nramp2 (H267A) démontre un impact similaire où le transport de métaux peut être restauré à pH acide (pH 5.0-6.0) (Lam-Yuk-Tseung *et al*, 2003). Ces résultats impliquent un rôle pour ce résidu invariable chez les homologues Nramp/MntH dans le mécanisme d'action du transporteur et la régulation par le pH du transport des métaux.

**N250**

Cette position se situe à l'intérieur du 7<sup>e</sup> segment transmembranaire. Bien que ce mutant N250T démontre une cinétique vis-à-vis du Cd très similaire à H211Y à pH 6.5, son activité à pH alcalin est similaire à EcoliA à l'exception de la  $V_{\max}$  qui est largement diminuée (tableau 1 de l'article 5). Cependant ce résidu semble plutôt être impliqué dans les interactions inter-hélices lors du changement de conformation car il possède une énergie d'activation similaire à la mutation N37T et supérieure à EcoliA vis-à-vis du Cd et du  $H^+$ .

**N401**

Cette position est située dans le 11<sup>e</sup> et dernier segment transmembranaire d'EcoliA. Les différentes mutations effectuées à cette position montrent que l'échange de ce résidu interfère principalement avec les  $V_{\max}$  du co-transport  $Me^{2+}/H^+$ . Des substitutions par des petits acides aminés (G, et C) semblent favoriser le phénomène de fuite du  $H^+$ , en absence de métal (figure 4 de l'article 2). Ce type de phénomène a été mesuré électrophysiologiquement pour la protéine de type sauvage Nramp2. La cinétique de transport du Cd via EcoliA N401T supporte cette hypothèse. A pH 7.5 ce mutant démontre un  $K_{0.5}^{Cd}$  et  $V_{\max}$  similaire à EcoliA, cependant à pH acide on observe une diminution du  $V_{\max}$  (7.7 vs 13.4 nmol/min; tableau 1, article 5). En présence de Cd, l'entrée du  $H^+$  est augmentée à pH acide.

L'approche phylogénétique a permis d'identifier certains résidus impliqués dans le mécanisme d'action de la famille Nramp/MntH en affectant soit le transport du  $Me^{2+}$ , du  $H^+$  ou bien les deux. Les données obtenues supportent l'hypothèse que les résidus conservés et invariants entre l'outgroup et la famille Nramp/MntH correspondent à l'émergence fonctionnelle de cette famille.

**6. Asymétrie du transport via EcoliA**

Pour étudier l'asymétrie fonctionnelle du transport du Cd, nous avons mesuré le transport d'EcoliA à l'intérieur de vésicules de type RSO et ISO. Dans ces préparations membranaires, la protéine se retrouve soit dans sa conformation native ou dans une orientation inversée respectivement. Les résultats présentés dans l'article 5 démontrent une asymétrie du transport du Cd car le transport direct ("forward"; RSO) est stimulé par le  $\text{CaCl}_2$ , en plus d'un donneur d'électrons extérieur (PMS ascorbate étant l'optimum). Le transport du Cd dépend également du  $\Delta\psi$ ; car en présence de valinomycine, de  $\text{CaCl}_2$ , de PMS ascorbate et de  $\text{K}^+$  extravésiculaires, EcoliA est incapable d'accumuler le Cd.

Comparativement au transport "forward" via EcoliA (RSO), l'accumulation en mode inverse semble plutôt correspondre à de la diffusion facilitée car il est indépendant du  $\text{CaCl}_2$ , de donneurs d'électrons, et en éliminant totalement le gradient électrochimique du  $\text{H}^+$  en présence de CCCP (0.1mM), ou de nigéricine et valinomycine simultanément, on observe encore un niveau d'activité similaire à celui en présence de force proton motrice (figures 2 et 3 de l'article 5).

Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse d'une asymétrie lors du transport de Cd via EcoliA. Et de plus les données obtenues en présence de nigéricine mesurant l'impact de l'activité d'EcoliA sur le  $\Delta\psi$  en présence de PMS ascorbate indiquent que EcoliA est de type électrogénique (dépoliarisation du  $\Delta\psi$  en présence d'EcoliA et du Cd; diminution du  $\Delta\psi$ ; intérieur moins négatif) correspondant à un transport de charges positives ( $\text{H}^+$ ) vers l'intérieur. Un mutant empêchant le transport du  $\text{H}^+$  (D34G) ne démontre aucune dépoliarisation de la membrane en présence du Cd, ce qui suggère que l'électrogénicité de MntH résulte en majeure partie du transport du  $\text{H}^+$ .

## 7. Rôle du $\text{CaCl}_2$

Le transport du Cd en RSO est strictement dépendant du  $\text{CaCl}_2$  avec un optimum à une concentration de 6mM et une source d'énergie (donneur d'électron perméable à la membrane). Une dépendance apparemment similaire a été également observée au début

des années 70 où le transport de Mn à l'intérieur des vésicules RSO d'*E. coli* énergisées était dépendant du  $\text{CaCl}_2$  (Bhattacharyya, 1970). Le  $\text{CaCl}_2$  ne peut être remplacé ni par le  $\text{SrCl}_2$  ou le  $\text{MgCl}_2$ . Par la suite nous avons voulu vérifier si le  $\text{Ca}^{2+}$  n'avait pas un impact sur la cinétique du Cd. Nos données indiquent que l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  module l'affinité du transporteur EcolIA car, en présence de concentrations suboptimales de  $\text{Ca}^{2+}$  (0.6 et 60mM), les valeurs apparentes vis-à-vis du Cd sont diminuées.

Certains groupes proposent une relation possible entre la famille Nramp et le calcium. L'année dernière, le groupe du Dr. Snyder mentionnait que Nramp2 serait activée via la protéine Dextras1 et PAP7. Ces deux protéines sont activées par l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  provenant des récepteurs de glutamate de type NMDA (Cheah *et al*, 2006). De plus, une étude portant sur la mutation spontanée G185R de Nramp2 suggère que cette substitution augmente la perméabilité du  $\text{Ca}^{2+}$  via Nramp2 G185R, suggérant ainsi que Nramp2 G185R serait un canal à  $\text{Ca}^{2+}$  en présence d'un potentiel de membrane d'une valeur de -130 mV (Xu *et al*, 2004). Ces études semblent suggérer un certain rôle de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  sur les homologues Nramp2 et EcolIA cependant aucune donnée ne mentionne si le  $\text{Ca}^{2+}$  module directement le transporteur en interagissant avec ce dernier. Bien que ces résultats n'expliquent pas le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$ , ces différentes données incitent à approfondir d'avantages l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  sur les homologues Nramp/MntH.

## **8. Accessibilité des substitutions cystéines aux sites spécifiques entre l'outgroup et la famille Nramp**

La substitution de chacun des résidus strictement conservés mais différents entre l'outgroup et Nramp/MntH par un résidu cystéine, nous a permis de vérifier l'accessibilité de chacune des positions en utilisant le réactif fluoresceine 5 maléimide et comme agent bloquant le NEM ou l'AmDis. Le protocole que nous avons mis au point nous permet de discriminer entre les résidus exposés du côté périplasmique (accessible aux 3 réactifs), dans un environnement lipidique (non accessible au NEM in situ et seulement accessible au F5M après solubilisation en présence du détergent dénaturant CTAB; Cétyltriméthyl ammonium Bromide). Les résidus situés dans un canal aqueux

sont généralement accessibles au NEM et au F5M après solubilisation en présence du CTAB tandis que les résidus situés du côté cytoplasmique sont accessibles au NEM et F5M après solubilisation aux détergents non-dénaturants DDM (n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside). Nous avons choisi le DDM car il s'agit d'un détergent de type anionique qui est largement utilisé dans la solubilisation des protéines transmembranaires (Kashino, 2003). Tandis que le CTAB est un détergent chargé positivement et reconnu comme étant de type dénaturant pour les protéines transmembranaires.

L'accessibilité des cystéines aux positions D34, N37, H211, N250 et N401 est généralement en accord avec le modèle topologique basé sur EcolIA ainsi que sur l'implication fonctionnelle des résidus. C'est-à-dire que D34C et H211C sont accessibles au NEM et non au réactif chargé et imperméable, AmDis. Ces données indiquent que ces positions peuvent être situées dans un canal aqueux et non du côté périplasmique, ce qui renforce les données fonctionnelles montrant que ces résidus sont impliqués directement dans le symport  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ . De plus, D34C est également accessible à la fluoresceine 5 maléimide en marquant directement les vésicules, ce qui indique que cette position fait partie d'une cavité aqueuse large (article 5). Les mutations N37C et N250C ne sont pas accessibles au petit réactif NEM (article 5). Ce qui suggère que ces positions sont situées soit dans un environnement lipidique ou bien dans un endroit restreint à proximité d'autres segments transmembranaires. Ces résultats sont conformes avec l'implication des résidus N37 et N250 dans des contacts inter-hélices lors d'un changement de conformation. Un résultat inattendu fût que N401C n'est pas accessible à la fluoresceine 5 maléimide même après dénaturation à l'aide du détergent dénaturant, CTAB. Cette position pourrait être enfouie à l'intérieur du faisceau d'hélices d'EcolIA.

## 9. Modèle 3D pour la famille Nramp/MntH basé sur LeuT

La bonne adéquation entre les données fonctionnelles et structurales recueillies pour les sites étudiés nous a permis d'évaluer différents motifs structuraux obtenus par "homology modelling". Pour les modèles possibles pour la famille Nramp/MntH (CIC, GlpT, EmrD et LeuT), uniquement ce dernier présente une architecture 3D en accord avec notre modèle topologique et également avec les données obtenues sur l'accessibilité

des cystéines et les résultats d'études fonctionnelles. Le modèle suggère que les segments transmembranaires 1 et 6 correspondent à des hélices discontinues anti-parallèles pouvant délimiter le canal aqueux. Les résidus D34 et H211 situés au centre de ces segments transmembranaires 1 et 6 respectivement sont accessibles au petit réactif sulphydryl NEM indiquant que ces résidus peuvent faire partie du canal aqueux et être impliqués dans la translocation du  $\text{Me}^{2+}$  et/ou du  $\text{H}^+$ . Le modèle indique également que les résidus N37, N250 et N401 font face à des segments transmembranaires à proximité, ce qui indique que ces résidus peuvent être impliqués dans des interactions inter-hélices (figure 4 et figure additionnelle 5, de l'article 5).

## 10. Problématique et perspective

La compréhension du mécanisme d'action d'une protéine transmembranaire comme EcolIA requiert une connaissance de sa structure et des résidus impliqués dans le co-transport  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ . Après avoir obtenu un modèle topologique, la prochaine étape est d'élucider le mécanisme d'action et identifier les résidus impliqués dans ce mécanisme.

Les résultats de cette étude indiquent que le transport "forward" du  $\text{Me}^{2+}$  est dépendant du  $\Delta\psi$  et que le  $\text{H}^+$  augmente l'affinité d'EcolIA vis-à-vis du Cd. Cependant le transport en mode inverse semble plutôt correspondre à de la diffusion facilitée. Les données obtenues sur le mécanisme d'action sont en accord avec le modèle cinétique obtenu en caractérisant Nramp2 dans des œufs de xénope. Les mutations de type II entre l'outgroup et Nramp/MntH pourraient constituer une signature de l'émergence fonctionnelle des protéines Nramp. Le résidu H211 possède la même importance chez Nramp2 et EcolIA. La protéine MntH d'*E.coli* est donc un excellent modèle pour étudier le mécanisme d'action des membres de la famille Nramp/MntH. Le transport dans les vésicules indique que le transport est dépendant du  $\text{CaCl}_2$ , de donneur d'électrons et du  $\Delta\psi$ .

L'approche phylogénétique ouvre des perspectives intéressantes afin d'identifier les résidus impliqués dans le mécanisme d'action soit directement soit par des interactions inter-hélices. La prochaine étape sera de caractériser le transport d'EcolIA à

l'intérieur de protéoliposomes pour vérifier si elle agit seule ou en tant que dimère, si elle possède un niveau d'activité similaire que dans les vésicules RSO et ISO et si le  $\text{CaCl}_2$  interagit directement avec EcoliA. Comme le délai avant d'obtenir un cristal de bonne qualité pourrait être long pour un homologue Nramp/MntH, il est raisonnable d'utiliser en première approximation le modèle basé sur LeuT et la mutagenèse par introduction de cystéines pour étudier systématiquement chacune des positions dans les hélices 1 et 6 qui jouent un rôle crucial dans le symport du  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ .

À l'aide des mutants cystéines obtenus et d'un modèle pour la structure tridimensionnelle de MntH, il serait envisageable d'observer le changement de conformation lors du transport du Cd par spFRET "single molecule Fluorescent resonance energy transfer" en marquant deux cystéines à l'aide de deux sondes fluorescentes et d'observer le transfert de fluorescence d'une sonde à l'autre correspondant aux changements de conformation de MntH.

## AVANCEMENT DES CONNAISSANCES



Mes études doctorales ont permis de démontrer pour une première fois le mécanisme de type symport pour un homologue bactérien MntH/Nramp. Nous avons également appliqué une approche phylogénique pour l'étude fonctionnelle des protéines MntH. Cette approche a permis d'identifier pour la première fois le couplage du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  et d'identifier des résidus clés impliqués dans le mécanisme d'action qui pourrait correspondre à l'émergence fonctionnelle des membres de la famille Nramp/MntH. Ces résidus dans EcoliA: D34, N37, H211, N250 et N401, sont tous prédits comme étant situés à l'intérieur de segments transmembranaires. Chacun de ces résidus a été substitué par celui présent dans l'outgroup, la plus proche famille protéique sans faire partie de la famille Nramp. Nous avons caractérisé fonctionnellement, *in vivo* et *in vitro*, l'activité des différents mutants vis-à-vis du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  à ces positions. Chacune de ces cinq positions affectent différents aspects du mécanisme d'action de MntH, en altérant soit le transport du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$  pour D34; en limitant les changements de conformation, N37 et N250; l'implication dans la régulation du transport par le pH, H211 ou bien en modifiant la vitesse du transport vis-à-vis du  $\text{Me}^{2+}$  ou du  $\text{H}^+$  N401.

Nous avons également débuté l'étude du mécanisme d'action *in vitro* d'EcoliA en utilisant pour la première fois, chez un homologue Nramp, les vésicules membranaires de type RSO et ISO. L'étude du transport comparatif entre ces 2 types de vésicules nous a permis de démontrer l'asymétrie du transport du Cd via MntH. Le transport (de type "forward") est dépendant du potentiel membranaire, du calcium et de donneurs d'électrons, tandis que l'activité en mode inverse semble correspondre à de la diffusion facilitée car l'accumulation du Cd observée était indépendante de la force proton-motrice.

Nous avons, de plus, adapté une procédure pour permettre de vérifier l'accessibilité, vis-à-vis de différents réactifs sulphydryles, de sites substitués par une cystéine chez EcoliA. Cette approche indique que seuls les résidus aux positions D34 et H211 sont situés dans un canal aqueux et peuvent être impliqués dans la translocation du  $\text{Me}^{2+}$  et du  $\text{H}^+$ . Nos résultats permettent pour une première fois de supporter et d'identifier un modèle structural 3D de la protéine EcoliA basé sur la famille LeuT.

## Remerciements

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de recherche, le docteur Mathieu Cellier, pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise et mon doctorat et de m'avoir bien dirigé tout au long de mes recherches. Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire présents et passés soit, Isabelle Bergevin, Étienne Richer, Élise Boyer, Evelyn Castillo, Frédéric Veyrier ainsi que Roman Chaloupka, et Carole Campion pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette aventure.

Je voudrais remercier les correcteurs : Dr. Rolf Morosoli, Dr. Mathieu Cellier, Dr. Hervé Le Moual, et le Dr. Martine Raymond pour avoir pris le temps de corriger ma thèse et de m'avoir soumis des commentaires constructifs.

J'adresse également mes remerciements aux techniciens du laboratoire, Jacques Beaubien et Louise Wilson qui m'ont permis de me surpasser autant du point de vue académique que personnel et pour leurs précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement mon épouse Chantal et notre premier fils Elliot pour m'avoir encouragé durant mes travaux. Leur présence, ainsi que le sourire de mon premier-né apportent beaucoup de réconfort dans les moments difficiles.

Enfin je tiens à remercier très sincèrement mes parents, Luc et Nicole Courville, pour leur encouragement et leur soutien financier tout au long de mes longues études. Sans eux, ce cheminement n'aurait jamais été possible.

Merci à tous ceux qui ont pris le temps de lire cette thèse.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abramson J, Kaback HR, Iwata S (2004) Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 413-419
- Accardi A, Miller C (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature.* **427**: 803-807
- Agranoff D, Monahan IM, Mangan JA, Butcher PD, Krishna S (1999) *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J. Exp. Med.* **190**: 717-724
- Androutsellis-Theotokis A, Goldberg NR, Ueda K, Beppu T, Beckman ML, Das S, Javitch JA, Rudnick G (2003) Characterization of a functional bacterial homologue of sodium-dependent neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **278**: 12703-12709
- Archibald FS, Fridovich I (1982) Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**: 589-596
- Aridor M, Hannan LA (2002) Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic.* **3**: 781-790
- Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Mol. Biol.* **29**: 1181-1196
- Beuming T, Shi L, Javitch JA, Weinstein H (2006) A comprehensive structure-based alignment of prokaryotic and eukaryotic neurotransmitter/Na<sup>+</sup> symporters (NSS) aids in the use of the LeuT structure to probe NSS structure and function. *Mol. Pharmacol.* **70**: 1630-1642
- Bhattacharyya P (1970) Active Transport of Manganese in Isolated Membranes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **104**: 1307-1311
- Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M (2001) SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell. Microbiol.* **3**: 773-784
- Booth PJ, Templer RH, Meijberg W, Allen SJ, Curran AR, Lorch M (2001) In vitro studies of membrane protein folding. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 501-603
- Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **70**: 6032-6042

Braun V, Hantke K, Koster W, Sigel A, Sigel H (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. In *iron transport and storage in microorganisms, plants, and animals*, pp 67-131. New York: Marcel Dekker, Inc.

Braun V, Hantke K, Winkelmann G (2001) Mechanism of Bacterial Iron Transport. In *Microbial Transport Systems*, pp 289-311. Weinheim: Wiley-VCH

Braun V, Killmann H (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 104-109

Buckel W (2001) Sodium ion-translocating decarboxylases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**: 15-27

Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG (2005) Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**: 325-330

Byers BR, Arceneaux JEL, Sigel A, Sigel H (1998) Microbial Iron Transport: Iron Acquisition by Pathogenic Microorganisms. In *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, pp 37-66. New York: Marcel Dekker Inc.

Canonne-Hergaux F, Fleming MD, Levy JE, Gauthier S, Ralph T, Picard V, Andrews NC, Gros P (2000) The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia mk mice but is not properly targeted to the intestinal brush border. *Blood.* **96**: 3964-3970

Canonne-Hergaux F, Gros P (2002) Expression of the iron transporter DMT1 in kidney from normal and anemic mk mice. *Kidney Int.* **62**: 147-156

Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.* **93**: 4406-4417

Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC (2006) Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**: 143-157

Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.* **180**: 1741-1752

Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P (1995) Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10089-10093

Cellier MF, Bergevin I, Boyer E, Richer E (2001) Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet.* **17**: 365-370

Chaloupka R, Courville P, Veyrier F, Knudsen B, Tompkins TA, Cellier MF (2005) Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo. *Biochemistry* **44**: 726-733

Chasteen N (2003) Ferritin. Uptake, storage and release of iron. In *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, Sigel AaS, H. (ed). New York: Marcel Dekker Inc.

Cheah JH, Kim SF, Hester LD, Clancy KW, Patterson SE, III, Papadopoulos V, Snyder SH (2006) NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*. **51**: 431-440

Chen X, Peng J, Cohen A, Nelson H, Nelson N, Hediger MA (1999) Yeast SMF1 mediates H<sup>+</sup>-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* **274**: 35089-35094

Cohen A, Nevo Y, Nelson N (2003) The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10694-10699

Courville P, Chaloupka R, Cellier MF (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem. Cell Biol.* **84**: 960-978

Courville P, Chaloupka R, Veyrier F, Cellier MF (2004) Determination of transmembrane topology of the Escherichia coli natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J. Biol. Chem.* **279**: 3318-3326

Culotta VC, Yang M, Hall MD (2005) Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **4**: 1159-1165

Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* **347 Pt 3**: 749-755

Daley DO, Rapp M, Granseth E, Melen K, Drew D, von Heijne G (2005) Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*. **308**: 1321-1323

Debus RJ (2000) The polypeptides of photosystem II and their influence on manganotyrosyl-based oxygen evolution. *Met. Ions. Biol. Syst.* **37**: 657-711

Dintilhac A, Alloing G, Granadel C, Claverys JP (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**: 727-739

- Dodd JR, Christie DL (2007) Selective amino acid substitutions convert the creatine transporter to a gamma-aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* **282**: 15528-15533
- Domenech P, Pym AS, Cellier M, Barry CE, Cole ST (2002) Inactivation of the *Mycobacterium tuberculosis* Nramp orthologue (mntH) does not affect virulence in a mouse model of tuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**: 81-86
- Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* **9**: 1149-1162
- Dutzler R (2006) The CIC family of chloride channels and transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 439-446
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature.* **415**: 287-294
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 1148-1153
- Forbes JR, Gros P (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host- pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **9**: 397-403
- Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**: 875-880
- Frillingos S, Sahin-Toth M, Wu J, Kaback HR (1998) Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationships in polytopic membrane proteins. *The FASEB Journal.* **12**: 1281-1299
- Gadsby DC (2004) Ion transport: spot the difference. *Nature.* **427**: 795-797
- Granseth E, Seppala S, Rapp M, Daley DO, von Heijne G (2007) Membrane protein structural biology--how far can the bugs take us? *Mol. Membr. Biol.* **24**: 329-332
- Grass G, Franke S, Taudte N, Nies DH, Kucharski LM, Maguire ME, Rensing C (2005a) The Metal Permease ZupT from *Escherichia coli* Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *J. Bacteriol.* **187**: 1604-1611
- Grass G, Otto M, Fricke B, Haney CJ, Rensing C, Nies DH, Munkelt D (2005b) FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch. Microbiol.* **183**: 9-18

- Gros P, Skamene E, Forget A (1983) Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.* **131**: 1966-1972
- Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P (1995) Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics* **25**: 514-525
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* **185**: 717-730
- Gu X, Zhang J (1997) A simple method for estimating the parameter of substitution rate variation among sites. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1106-1113
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488
- Haemig HA, Brooker RJ (2004) Importance of conserved acidic residues in *mntH*, the *Nramp* homolog of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **201**: 97-107
- Hao Z, Chen S, Wilson DB (1999) Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4746-4752
- Helmann JD, Cellier MFM, Gros P (2004) Regulation of bacterial *mntH* genes. In *The Nramp family*, pp 146-153. New York: Landes Bioscience / Kluwer Academic.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* **117**: 285-297
- Herman C, Lecat S, D'Ari R, Bouloc P (1995) Regulation of the heat-shock response depends on divalent metal ions in an *hflB* mutant of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **18**: 247-255
- Horsburgh MJ, Wharton SJ, Cox AG, Ingham E, Peacock S, Foster SJ (2002) *MntR* modulates expression of the *PerR* regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Mol. Microbiol.* **44**: 1269-1286
- Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* **192**: 1237-1248
- Jensen LT, Ajua-Alemanji M, Culotta VC (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 42036-42040



- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*. **417**: 515-522
- Kaback HR (1971) Bacterial membranes. *Methods Enzymol.* **22**: 99-120
- Kaback HR (2005) Structure and mechanism of the lactose permease. *C. R. Biol.* **328**: 557-567
- Kammler M, Schon C, Hantke K (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 6212-6219
- Kashino Y (2003) Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **797**: 191-216
- Kasho VN, Smirnova IN, Kaback HR (2006) Sequence alignment and homology threading reveals prokaryotic and eukaryotic proteins similar to lactose permease. *J. Mol. Biol.* **358**: 1060-1070
- Kastaniotis AJ, Zitomer RS (2000) Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* **475**: 185-195
- Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME (2002a) Regulation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. *J. Bacteriol.* **184**: 3151-3158
- Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME (2002b) SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **184**: 3159-3166
- Kehres DG, Maguire ME (2003) Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 263-290
- Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME (2000) The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36**: 1085-1100
- Knudsen B, Miyamoto MM, Laipis PJ, Silverman DN (2003) Using Evolutionary Rates to Investigate Protein Functional Divergence and Conservation. A case study of the carbonic anhydrases. *Genetics* **164**: 1261-1269
- Konings WN, Barnes EM, Jr., Kaback HR (1971) Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. 2. The coupling of reduced phenazine methosulfate to the concentrative uptake of beta-galactosides and amino acids. *J. Biol. Chem.* **246**: 5857-5861

- Kuang Z, Mahankali U, Beck TL (2007) Proton pathways and H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> stoichiometry in bacterial chloride transporters. *Proteins*. **68**: 26-33
- Kuhn DE, Lafuse WP, Zwilling BS (2001) Iron transport into *Mycobacterium avium*-containing phagosomes from an Nramp1(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J. Leukoc. Biol.* **69**: 43-49
- Lam-Yuk-Tseung S, Govoni G, Forbes J, Gros P (2003) Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood* **101**: 3699-3707
- Li H, Li F, Kwan M, He QY, Sun H (2005) NMR structures and orientation of the fourth transmembrane domain of the rat divalent metal transporter (DMT1) with G185D mutation in SDS micelles. *Biopolymers*. **77**: 173-183
- Li H, Li F, Qian ZM, Sun H (2004) Structure and topology of the transmembrane domain 4 of the divalent metal transporter in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1938-1951
- Li H, Li F, Sun H, Qian ZM (2003) Membrane-inserted conformation of transmembrane domain 4 of divalent-metal transporter. *Biochem. J.* **372**: 757-766
- Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 11763-11769
- Luk E, Jensen L, Culotta VC, Cellier MFM, Gros P (2004) The role of yeast Nramp metal transporter in manganese and iron homeostasis. In *The Nramp family*, pp 124-134. New York, NY: Kluwer Academic / Landes.
- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA (2007) Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem. J.* **403**: 59-69
- Mackenzie B, Ujwal ML, Chang MH, Romero MF, Hediger MA (2006) Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H<sup>+</sup>-coupled Fe<sup>2+</sup> transport and uncoupled fluxes. *Pflugers Arch.* **451**: 544-558
- Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* **35**: 1065-1078
- Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. **394**: 192-195
- Miller C (2006) ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature*. **440**: 484-489

- Mitchell P (1976) Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans.* **4**: 399-430
- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**: 107
- Nelson N (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* **18**: 4361-4371
- Olsen KN, Budde BB, Siegumfeldt H, Rechinger KB, Jakobsen M, Ingmer H (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4145-4147
- Patzer SI, Hantke K (2001) Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 4806-4813
- Pedersen PL (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**: 349-355
- Perry RD, Mier I, Jr., Fetherston JD (2007) Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *Biometals.* **20**: 699-703
- Picard V, Govoni G, Jabado N, Gros P (2000) Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool. *J. Biol. Chem.* **275**: 35738-35745
- Picollo A, Pusch M (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature.* **436**: 420-423
- Pinner E, Gruenheid S, Raymond M, Gros P (1997) Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J. Biol. Chem.* **272**: 28933-28938
- Portnoy ME, Jensen LT, Culotta VC (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem. J.* **362**: 119-124
- Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7893-7902

- Posey JE, Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*. **288**: 1651-1653
- Que Q, Helmann JD (2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* **35**: 1454-1468
- Quick M, Javitch JA (2007) Monitoring the function of membrane transport proteins in detergent-solubilized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 3603-3608
- Quick M, Tomasevic J, Wright EM (2003) Functional asymmetry of the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles. *Biochemistry*. **42**: 9147-9152
- Quick M, Yano H, Goldberg NR, Duan L, Beuming T, Shi L, Weinstein H, Javitch JA (2006) State-dependent conformations of the translocation pathway in the tyrosine transporter Tyl1, a novel neurotransmitter:sodium symporter from *Fusobacterium nucleatum*. *J. Biol. Chem.* **281**: 26444-26454
- Rahman M, Ismat F, McPherson MJ, Baldwin SA (2007) Topology-informed strategies for the overexpression and purification of membrane proteins. *Mol. Membr. Biol.* **24**: 407-418
- Ravna AW, Jaronczyk M, Sylte I (2006) A homology model of SERT based on the LeuT(Aa) template. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 5594-5597
- Reenstra WW, Patel L, Rottenberg H, Kaback HR (1980) Electrochemical proton gradient in inverted membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **19**: 1-9
- Reeve I, Hummell D, Nelson N, Voss J (2002) Overexpression, purification, and site-directed spin labeling of the Nramp metal transporter from *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 8608-8613
- Richer E, Courville P, Bergevin I, Cellier MF (2003) Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria. *J. Mol. Evol.* **57**: 363-376
- Richer E, Courville P, Cellier MFM, Cellier M, Gros P (2004) Evolutionary analysis of the Nramp family. In *The Nramp family*, pp 179-193. New York: Landes Bioscience / Kluwer Academic.
- Riordan JF, Vallee BL (1972) reactions with N-ethylmaleimide and p-Mercuribenzoate. *Methods in enzymology* **25**: 449-456
- Robertson DE, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Kaback HR (1980) Active transport in membrane vesicles from *Escherichia coli*: the electrochemical proton gradient alters the

distribution of the lac carrier between two different kinetic states. *Biochemistry*. **19**: 5692-5702

Runyen-Janecky L, Dazenski E, Hawkins S, Warner L (2006) Role and regulation of the *Shigella flexneri* sit and MntH systems. *Infect. Immun.* **74**: 4666-4672

Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, Winge DR (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14322-14327

Sacher A, Cohen A, Nelson N (2001) Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Biol.* **204**: 1053-1061

Saier MH, Jr. (1999) A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J. Cell. Biochem. Suppl* **32-33**: 84-94

Saier M, Winkelmann G (2001) Families of Transporters: A Phylogenetic Overview. In *Microbial Transport Systems*, pp 1-22. Weinheim: Wiley-VCH.

Screpanti E, Hunte C (2007) Discontinuous membrane helices in transport proteins and their correlation with function. *J. Struct. Biol.* **159**: 261-267

Simoni RD, Postma PW (1975) The energetics of bacterial active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 523-554

Singer SJ (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**: 247-296

Singh SK, Yamashita A, Gouaux E (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature*. **448**: 952-956

Soborg C, Andersen AB, Madsen HO, Kok-Jensen A, Skinhoj P, Garred P (2002) Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **186**: 517-521

Sorgen PL, Hu Y, Guan L, Kaback HR, Girvin ME (2002) An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14037-14040

Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 5105-5110

Takase H, Nitanai H, Hoshino K, Otani T (2000) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect. Immun.* **68**: 4498-4504

- Tamura N, Konishi S, Iwaki S, Kimura-Someya T, Nada S, Yamaguchi A (2001) Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter. *J. Biol. Chem.* **276**: 20330-20339
- Thomine S, Schroeder JI, Cellier MFM, Gros P (2004) Plant metal transporters with homology to proteins of the Nramp family. In *The Nramp family*, pp 114-124. Georgetown: Landes Bioscience / Kluwer Academic.
- Touret N, Furuya W, Forbes J, Gros P, Grinstein S (2003) Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* **278**: 25548-25557
- Traxler B, Boyd D, Beckwith J (1993) The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. *J. Membrane Biol.* **132**: 1-11
- van der Helm D, Chakraborty R, Winkelmann G (2001) Structures of siderophore receptors. In *Microbial transport systems*, pp 261-287. Weinheim: Wiley-VCH.
- van Geest M, Lolkema JS (2000) Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 13-33
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* **73**: 469-485
- Vidal SM, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P (1996) Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol.* **157**: 3559-3568
- Wang DN, Safferling M, Lemieux MJ, Griffith H, Chen Y, Li XD (2003) Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1610**: 23-36
- West AH, Clark DJ, Martin J, Neupert W, Hartl F, Horwich AL (1992) Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 24625-24633
- Xu H, Jin J, DeFelice LJ, Andrews NC, Clapham DE (2004) A spontaneous, recurrent mutation in divalent metal transporter-1 exposes a calcium entry pathway. *PLoS. Biol.* **2**: E50
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature.* **437**: 215-223

Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, Kehres DG, Maguire ME, Fang FC, Finlay BB (2004) The *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect. Immun.* **72**: 5522-5525