Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M.
SLC11A1 (anteriormente NRAMP1) y resistencia a enfermedades.
Cellular Microbiology 2001;3(12):773-84. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00150.x.
Acceso abierto: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11736990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11736990)

**Introducción:** Slc11a1 (anteriormente Nramp1) tiene muchos efectos pleiotrópicos sobre la activación de macrófagos (m), incluida la regulación de la quimiocina CXC KC, interleucina-1β (IL-1β), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), moléculas de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) clase II , factor de necrosis tumoral α (TNFα), liberación de óxido nítrico (NO), flujo de L-arginina, explosión oxidativa y actividad tumoral y antimicrobiana (revisado por Blackwell y Searle, 1999; Blackwell et al., 2000). Una mutación natural Gly → Asp en el aminoácido 169 de Slc11a1 hace que los ratones sean tan susceptibles a Leishmania donovani, Salmonella typhimurium y Mycobacterium bovis como los ratones con genes alterados (Vidal et al., 1995). Por lo tanto, la mutación es un nulo funcional. Esta mutación también confiere susceptibilidad a una variedad de otros patógenos en ratones, incluyendo Mycobacterium lepraemurium (Brown et al., 1982; Skamene et al., 1984), Mycobacterium intracellulare (Goto et al., 1989), Toxoplasma gondii (Blackwell et al. ., 1994), Candida albicans (Puliti et al., 1995) y Leishmania infantum (Leclercq et al., 1996). En el hombre, SLC11A1 está vinculado o asociado con múltiples infecciones (Shaw et al., 1997; Abel et al., 1998; Bellamy et al., 1998; Marquet et al., 1999; Cervino et al., 2000; Gao et al. ., 2000; Greenwood et al., 2000; Ryu et al., 2000; Mohamed et al., 2001) y autoinmune (Shaw et al., 1996; Hofmeister et al., 1997; Esposito et al., 1998; Maliarik et al., 2000; Sanjeevi et al., 2000; Singal et al., 2000; Yang et al., 2000) enfermedades. Las enfermedades infecciosas incluyen patógenos virales (VIH), bacterianos (tuberculosis, lepra, meningitis meningocócica) y protozoos (leishmaniasis visceral). Las enfermedades autoinmunes incluyen artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, diabetes, sarcoidosis y enfermedad de Crohn. La mutación en el gen Slc11a2 ​​(Nramp2) estrechamente relacionado causa anemia microcítica en ratones (Fleming et al., 1997), pero no se ha informado de la asociación de enfermedades en el hombre. Slc11a1 y Slc11a2 ​​son proteínas de membrana integrales politópicas con 10–12 dominios putativos que abarcan la membrana (Vidal et al., 1993; Gunshin et al., 1997). En ambos, la mutación nula funcional natural ocurre en el dominio transmembrana 4 (Vidal et al., 1993; Fleming et al., 1997). Tanto Slc11a1 como Slc11a2 ​​tienen sitios de unión a proteína quinasa C (PKC) (Vidal et al., 1993; Barton et al., 1994; Gruenheid et al., 1995), pero solo Slc11a1 tiene un terminal N rico en Pro-Ser (Barton et al., 1994). Aquí, revisamos el conocimiento actual sobre la evolución, función y roles de Slc11a1 / SLC11A1 en la enfermedad.

**Localización y distribución de tejidos**

Slc11a1 se localiza en membranas de endosomas y lisosomas tardíos en m (Gruenheid et al., 1997; Searle et al., 1998), pero no en endosomas tempranos (Gruenheid et al., 1997). Esto es consistente con la presencia de señales de direccionamiento endocítico en los extremos 5 'y 3' de Slc11a1 (Atkinson et al., 1997) y sugiere que apunta directamente desde la red trans-Golgi (TGN) al compartimento endosómico en lugar de convertirse incorporado en la membrana del fagosoma como parte del proceso fagocítico. El mutante m expresa una proteína reconocida por los anticuerpos anti-N-terminal y anti-C-terminal anti-Slc11a1, pero la proteína se expresa a niveles más bajos en m derivada de médula ósea madura de ratones mutantes C57BL / 10ScSn en comparación con sus ratones salvajes. homólogos congénicos tipo B10.L-Lshr (Searle et al., 1998). La expresión en los niveles de ARNm y proteína (Searle et al., 1998) se regula en forma ascendente en un grado equivalente en m mutante y de tipo salvaje después del tratamiento con lipopolisacárido e interferón (IFN) -γ. Esto va acompañado de una mayor proporción de marcaje de oro Slc11a1 en lisosomas densos en electrones en comparación con el compartimento endosómico tardío con electroluminiscencia (Searle et al., 1998), pero no se ha abordado la importancia funcional de esta redistribución de la proteína. Slc11a1 se dirige a los fagosomas de Leishmania o Mycobacterium avium (Searle et al., 1998). Las vesículas reconocidas por los anticuerpos anti-Slc11a1 migran rápidamente para fusionarse con fagosomas que contienen M. avium en m de reposo derivado de la médula ósea de tipo salvaje pero no mutante (Fig. 1; Searle et al., 1998). Esto tiene implicaciones importantes para cualquier papel directo que Slc11a1 pueda tener en la determinación de la supervivencia del patógeno. Por ejemplo, estudios previos (Sturgill-Koszycki et al., 1994; 1996) que examinaron la entrada de M. avium y M. tuberculosis en m derivada de médula ósea de ratones BALB / c (mutante Slc11a1) indicaron que se detiene la maduración del fagosoma en una etapa temprana de transición. El fagosoma BALB / c adquiere una forma inmadura de catepsina D del TGN pero permanece accesible a la transferrina internalizada. La fusión con endosomas ácidos o lisosomas y la adquisición de protones-ATPasas se produce solo después de la activación con IFN-γ. Por lo tanto, se podría suponer que Slc11a1 no tendría una influencia directa en la supervivencia micobacteriana en macrófagos en reposo, ya que la bacteria no entraría en contacto directo con la proteína Slc11a1. En cambio, parece que se requiere la función normal de Slc11a1 para la maduración del fagosoma micobacteriano. Esto es consistente con una acidificación reducida de vesículas que contienen Mycobacterium (Hackam et al., 1998) y una fusión reducida de fagosoma-lisosoma (de Chastellier et al., 1993; Hackam et al., 1998) en m mutante infectado con Mycobacterium. En la m de tipo salvaje inactivada, se produce una acidificación normal y fusión de fagosoma-lisosoma (de Chastellier et al., 1993; Hackam et al., 1998; Searle et al., 1998), creando un entorno en el que Slc11a1 puede influir directamente en la actividad antimicrobiana. (vea abajo). Estos resultados sugieren que la observación anterior (Sturgill-Koszycki et al., 1996) del desarrollo de fagosomas detenidos puede ser una característica peculiar o al menos prolongada de forma antinatural en el mutante Slc11a1 m. Como Slc11a1 también se reduce en la expresión en monocitos jóvenes, esto también podría explicar por qué Slc11a1 no controla la infección por L. major visceralizante que se dirige preferentemente a monocitos inmaduros (Davies et al., 1988), y puede contribuir al fracaso de Slc11a1 para regular M infección por tuberculosis en ratones (Medina y North, 1996a, b; North et al., 1999).

Slc11a2 ​​se localiza en endosomas tempranos en m (Gruenheid et al., 1999) y otros tipos de células en todo el cuerpo, incluido el borde del cepillo intestinal (Fleming et al., 1998; Canonne-Hergaux et al., 1999), es decir, parece ser expresado ubicuamente. Se pensó que Slc11a1 estaba restringido al linaje mieloide (Vidal et al., 1993), pero recientemente lo hemos localizado en vesículas en neuronas (Evans et al., 2001). Esto puede relacionarse directamente con las diferencias en la respuesta conductual al estrés (Evans et al., 2001), la activación del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA) y la línea de base (Blackwell et al., 1994) y el post-estrés (Evans et al. ., 2001) mortalidad después de la infección por T. gondii en ratones congénicos mutantes versus salvajes. También se relaciona con las observaciones anteriores de Zwilling y compañeros de trabajo (Brown et al., 1993) de que la activación del eje HPA por el estrés de restricción aumentó la gravedad de la infección por M. avium en ratones mutantes Slc11a1, pero no afectó la capacidad de Slc11a1 congénicos salvajes -tipo ratones para controlar la infección por micobacterias. Esto se atribuyó a las diferencias en la sensibilidad de m de ratones congénicos Slc11a1 a corticosterona porque la activación del eje HPA también causó un mayor crecimiento intracelular de M. avium en m de ratones mutantes Slc11a1 pero no de tipo salvaje (Brown y Zwilling, 1995; Brown et al. ., 1995). Estas diferencias in vivo e in vitro fueron simuladas por administración de corticosterona y anuladas por adrenalectomía quirúrgica o farmacológica. En nuestros estudios (Evans et al., 2001), observamos niveles mejorados de ARNm para la hormona liberadora de corticotropina en el cerebro dentro de los 30 minutos del estrés de restricción. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que, aunque las diferencias en la activación de HPA se traducen en diferencias en el aumento suprarrenal y los niveles basales de corticosterona circulante, la influencia principal de Slc11a1 está en el nivel de la respuesta neuronal al estrés. Estos resultados destacan la importancia de la activación de HPA en la regulación neuroinmune de las enfermedades infecciosas y proporcionan una nueva visión de los posibles roles de los transportadores de cationes divalentes de la familia de genes Slc11a en la regulación de la homeostasis de iones metálicos en el cerebro y sus implicaciones patológicas más amplias. Por ejemplo, la acumulación de iones metálicos en las neuronas es una característica del Parkinson (Jellinger et al., 1993; Gerlach et al., 1994; Hirsch y Faucheux, 1998) y otros (Gerlach et al., 1996; Multhaup, 1997) neurodegenerativos enfermedades Curiosamente, el malvolio del ortólogo de Drosophila también se localiza en fagocitos y neuronas y desempeña un papel en el comportamiento del gusto (Rodrigues et al., 1995), lo que sugiere que esta localización celular dual puede ser una característica primitiva de la expresión de Slc11a1.

Encontrar Slc11a1 en células no mieloides nos llevó a reevaluar su perfil de expresión. Con los anticuerpos Slc11a1 anti-N y anti-C-terminales, confirmamos la expresión de Slc11a1 en las neuronas piramidales corticales (principalmente las capas III y V), un subconjunto de neuronas estriatales, cuerpos celulares de Purkinje cerebelosos y la hipófisis anterior (N. Papo, JM Blackwell y JK White, inédito). También observamos Slc11a1 en islotes pancreáticos y en la médula suprarrenal. La expresión en islotes pancreáticos es interesante porque Slc11a1 es un gen candidato para la diabetes (Esposito et al., 1998; Hill et al., 2000).

## Slc11a1 es un antiportador de catión protón / divalente

Usando los ovocitos Xenopus, demostramos que, al igual que Slc11a2 ​​(Gunshin et al., 1997), Slc11a1 es un transportador de cationes divalentes (Fe2 +, Zn2 + y Mn2 +) (Goswami et al., 2001). Sorprendentemente, sin embargo, donde Slc11a2 ​​es un simportador de H + e iones metálicos, Slc11a1 es un antiportador que puede transportar cationes divalentes en cualquier dirección contra un gradiente de protones. Esto proporciona un nuevo modelo para la homeostasis de iones metálicos en m (Fig. 2). Slc11a2 ​​en endosomas tempranos entrega cationes divalentes extracelularmente adquiridos en el citosol. Slc11a1 en los endosomas / lisosomas tardíos suministra cationes divalentes desde el citosol a este compartimento ácido. Aquí, la reacción de Fenton puede usar hierro ferroso para generar radicales tóxicos de hidroxilo (OH •) (Zwilling et al., 1999). Las células de mamíferos, incluido m, contienen hierro redoxactivo en los lisosomas (Garner et al., 1998), cuya exocitosis es importante para la oxidación y la absorción de lipoproteínas de baja densidad (Yuan et al., 1995). Los derivados de monocitos expuestos a eritrocitos envejecidos artificialmente muestran una oxidación mejorada de las lipoproteínas de baja densidad como resultado del hierro exocitado (Yuan et al., 1996).

El hecho de que los metales pesados ​​se acumulan en los lisosomas de los lisosomas y se exocitan en ellos fue de interés en relación con la hipótesis (Atkinson y Barton, 1998; Fleming et al., 1998) de que Slc11a1 está involucrado en el reciclaje de hierro de los glóbulos rojos afectados por m. Con Jeremy Brock (Universidad de Glasgow), demostramos que el hierro fagocitado a través de FcR como complejos inmunes insolubles de transferrina-antitransferrina marcada con 59Fe se acumula en m transfectada por mutantes, pero se recicla eficientemente al medio en m de tipo salvaje (Mulero et al., presentado). Esto no ocurrió con la 59Fe-transferrina, que se absorbe a través de los receptores de transferrina de reciclaje, de acuerdo con el suministro a endosomas / lisosomas tardíos según sea necesario para el reciclaje de hierro por Slc11a1, posiblemente a través de la exocitosis de hierro lisosomal. Curiosamente, la generación de NO fue esencial para desencadenar la liberación de hierro. El subproducto del hierro citoplasmático alto en el mutante m es la inestabilidad del ARNm para un rango de marcadores de activación (Zwilling et al., 1999; Lafuse et al., 2000), lo que contribuye a la pleiotropía asociada con la función Slc11a1. El papel de Slc11a1 en el reciclaje de hierro de los glóbulos rojos efectos también implica un posible papel en la regulación de la homeostasis del hierro que sería interesante examinar en relación con las anemias de infección crónica.

## Controversia relacionada con la actividad de transporte de Slc11a1 en m

Nuestros resultados usando ovocitos de rana sugieren que, dependiendo de la topología de la membrana (ver más abajo), la actividad antipuerto de Slc11a1 en m normalmente entregará cationes divalentes del citosol a los endosomas / lisosomas tardíos ácidos. Sin embargo, los intentos previos para definir la función Slc11a1 en m utilizando radioisótopos y sondas fluorescentes sensibles a cationes divalentes unidas a partículas o en fase fluida proporcionan resultados contradictorios. Zwilling y sus colegas demostraron que la tasa de importación de 55Fe por perlas de látex (Kuhn et al., 1999) o fagosomas de M. avium (Zwilling et al., 1999) aislados de m transfectados de tipo salvaje fue más del doble de la tasa observada en los fagosomas. del mutante m. Los fagosomas aislados de m de tipo salvaje premarcados con 55Fe-citrato antes de la fagocitosis también contenían hasta 4 × Fe en comparación con el mutante m (Kuhn et al., 1999). Utilizando una sonda fluorescente sensible a cationes divalente unida covalentemente a partículas de zimosán, otros investigadores (Jabado et al., 2000) encontraron que los fagosomas de la m de tipo salvaje extruyen Mn2 + más rápido que la m mutante, una diferencia eliminada al evitar la acidificación fagosómica. Esto se demostró midiendo la velocidad de enfriamiento de la fluorescencia unida a partículas después de la adición de Mn2 + exógeno de 500 μM. Curiosamente, la capacidad (Zwilling et al., 1999) de inhibir el crecimiento de micobacterias en m de tipo salvaje mediante la adición de hierro exógeno fue dependiente de la dosis, alcanzando un máximo de hierro de 0.05 μM, disminuyendo y eventualmente se perdió en concentraciones más altas de hasta 0.5 μM , lo que sugiere algún cambio en la función Slc11a1 a una mayor concentración de hierro exógeno. Nuestros datos demuestran que Slc11a1 puede fluir cationes divalentes en cualquier dirección, dependiendo del pH a cada lado de la membrana. El flujo neto estará determinado por los gradientes electroquímicos combinados del metal y H +, lo que puede explicar las discrepancias en los resultados de diferentes laboratorios que utilizan diferentes técnicas y condiciones experimentales para evaluar la dirección del transporte a través de las membranas fagosomales. Se requieren estudios más refinados en m para determinar las condiciones bajo las cuales se produce la afluencia versus la salida de cationes divalentes de vesículas positivas para Slc11a1. Es posible que, como en la levadura, los endosomas / lisosomas tardíos de m actúen como "vacuolas de almacenamiento" para los cationes divalentes que pueden fluir hacia adentro o hacia afuera de acuerdo con diversas condiciones de estrés o agotamiento de iones metálicos en el citosol.

## Slc11a1 pleiotropía y susceptibilidad a enfermedades infecciosas

Un efecto de Slc11a1 es la expresión mejorada de iNOS (codificada por Nos2A) y la generación de NO tóxico en m de tipo salvaje frente a mutante (Roach et al., 1991; Arias et al., 1997). Se supuso que esto es crucial para la resistencia mediada por Slc11a1 in vivo, quizás combinándose con OH • para producir el peroxinitrito más tóxico. Mediante inmunofluorescencia, examinamos (C. Evans y J. M. Blackwell, inédito) la expresión y localización de Slc11a1 e iNOS en el hígado temprano en la infección por L. donovani en ratones congénicos Slc11a1. Slc11a1 se expresa en células Kupffer residentes negativas para iNOS pero no en positivos para iNOS: - monocitos frescos positivos para Mac1 que ingresan al hígado. En ratones de tipo salvaje, los monocitos (ahora m) dentro de los granulomas en desarrollo se vuelven positivos para Slc11a1 a los 10 días de infección. En ratones mutantes, no lo hacen. Esto sugiere que iNOS no es importante en la regulación de la infección por Kupffer mediada por Slc11a1 (Crocker et al., 1984), pero puede desempeñar un papel más adelante en el control del parásito dependiente del granuloma (Stern et al., 1988). Para evaluar aún más el papel de iNOS, hemos retrocruzado el knock-out Nos2A (KO) (Wei et al., 1995) en ratones congénicos mutantes y de tipo salvaje Slc11a1 en C57BL / 10ScSn (= B10), C57BL / 6 (= = B6) y fondos BALB. Esto nos permitirá determinar la importancia de iNOS en las infecciones por L. donovani, S. typhimurium y M. avium reguladas por Slc11a1. También estamos entrecruzando el B6 gp91phox KO (Shiloh et al., 1999) con nuestros congénicos B6 Slc11a1 / Nos2A KO. Los análisis fenotípicos nos permitirán determinar si el NO y el O2 contribuyen por separado o sinérgicamente en fenotipos de enfermedades infecciosas y autoinmunes reguladas por Slc11a1. El posible papel de gp91phox en la generación de radicales se vuelve más interesante dada su contribución de O2− como sustrato para H2O2 generado por la superóxido dismutasa (SOD), que a su vez actúa como sustrato para la reducción de la reacción de Fenton de Fe2 +, este último contribuyendo con su electrón a OH • (Figura 2). La reductasa gp91phox es crucial para la generación de O2- a partir de O2, pero también puede actuar directamente como ferrireductasa (C. M. Proctor y N. Robinson, comunicación personal). Gp91phox se administra a los fagosomas infectados por fusión vesicular (Vazquez-Torres et al., 2000), y estamos evaluando esto usando anticuerpos anti-gp91phox y microscopía confocal. Se desconoce si su función es únicamente generar O2− antimicrobiano y / o actuar como ferrireductasa para proporcionar hierro ferroso para la entrada o salida de Slc11a1 Fe2 +. Entrecruces adicionales, p. cruzando en un SOD KO, desentrañará el papel de gp91phox. Otros entrecruces, p. los knock-outs para TNFα, IL-1β, quimiocinas o sus receptores determinarán el papel de otras moléculas proinflamatorias en los fenotipos regulados por Slc11a1.

En otros estudios, demostramos que Slc11a1 de tipo salvaje m ha mejorado el procesamiento de antígenos dependientes de lipopolisacáridos para su presentación a las células T (Lang et al., 1997), lo que puede reflejar el requisito de iones metálicos para la actividad metaloproteasa y / o eventos de fusión endosomal. Este efecto sobre el procesamiento de antígenos se ve agravado por la influencia de Slc11a1 en las moléculas que regulan (TNFα, IL1β) o que participan directamente en la presentación del antígeno (MHC clase II). Por lo tanto, en ratones vacunados con S. typhimurium atenuado diseñado para expresar el fragmento de toxoide tetánico C, encontramos respuestas polarizadas de T helper 1 (Th1) versus T helper 2 (Th2) en ratones congénitos de tipo salvaje versus mutantes (Soo et al., 1998 ) Este sesgo Th1: Th2 también fue visto por nosotros en la infección por L. donovani (Kaye y Blackwell, 1989) y por otros en la infección por micobacterias (Kramnik et al., 1994).

Una de las perplejidades en la investigación de SLC11A1 es la clara asociación entre los haplotipos 5 'y 3' y la susceptibilidad global a la tuberculosis pulmonar en el hombre (Shaw et al., 1997; Bellamy et al., 1998; Cervino et al., 2000; Gao et al., 2000; Greenwood et al., 2000; Ryu et al., 2000), pero la falta de cualquier efecto de Slc11a1 sobre la infección primaria con M. tuberculosis (Medina y North, 1996a, b; North et al., 1999) en ratones. Una clara diferencia es que los humanos, especialmente en África, están expuestos repetidamente a micobacterias ambientales antes de la infección por M. tuberculosis. En Malawi, mostramos (JM Blackwell, S. Floyd, G. Black, H. Dockrell y PEM Fine, inédito) asociaciones de haplotipos SLC11A1 significativas con respuestas de IFN-γ a antígenos de M. tuberculosis y Mycobacterium fortuitum, compatibles con Th1 murino: Sesgo Th2. Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo en SLC11A1 influye en la respuesta inmune a las exposiciones de "cebado / vacunación" a micobacterias. Esta hipótesis es interesante, ya que la efectividad de BCG en la protección contra la lepra en la misma población de Malawi también se asocia con el polimorfismo en SLC11A1 (A. V. Hill y P. E. M. Fine, comunicación personal). No se observa asociación de SLC11A1 con lepra en sujetos no vacunados con BCG. El polimorfismo en SLC11A1 también está asociado con la reactividad de la prueba cutánea de tipo Mitsuda a los antígenos de lepra (Alcais et al., 2000). Estos resultados también son interesantes en relación con estudios recientes que sugieren que la adopción de un estilo de vida occidental libre de enfermedades infecciosas se asocia con un aumento en la prevalencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes, que también pueden ser moduladas por la respuesta inmune a los antígenos micobacterianos después de la vacunación con BCG (Shirakawa et al., 1997). Recientemente, se demostró que la estratificación mediante la vacuna BCG desenmascara un factor de riesgo genético para la atopia en la región del locus SLC11A1 (Alm et al., 2001), señalando la importancia del genotipo por las interacciones ambientales en la determinación de la susceptibilidad a la enfermedad.

## Polimorfismo funcional en SLC11A1 humana

Usando la transfección transitoria y un gen indicador de luciferasa, hemos demostrado (Searle y Blackwell, 1999) que un polimorfismo repetido, designado (GT) n, identificado por nosotros (Blackwell et al., 1995) en el promotor del SLC11A1 humano regula la expresión. La secuencia contiene una repetición de Z-DNA con cuatro alelos: (i) t (gt) 5ac (gt) 5ac (gt) 11g; (ii) t (gt) 5ac (gt) 5ac (gt) 10 g; (iii) t (gt) 5ac (gt) 5ac (gt) 9 g; (iv) t (gt) 5ac (gt) 9 g. Los alelos (i) y (iv) son raros (frecuencias de genes ≈0.001); los alelos (ii) y (iii) ocurren a frecuencias de genes de ≈0.25 y ≈0.75 respectivamente. En ausencia de estímulos exógenos, el alelo (iii) impulsa una expresión del gen indicador cinco a ocho veces mayor que los alelos (i), (ii) y (iv). Todos los alelos muestran un porcentaje similar de mejora de la expresión con IFN-γ, consistente con múltiples elementos de respuesta de IFN-γ 5 'y 3' de la repetición. La adición de lipopolisacárido no tiene efecto sobre los alelos (i) y (iv), pero causa una reducción significativa en la expresión dirigida por el alelo (ii) y mejora la expresión dirigida por el alelo (iii). La yuxtaposición de elementos de respuesta relacionados con lipopolisacáridos (NFκB, AP-1, NF-IL6) puede verse afectada de manera diferencial por los dos alelos comunes.

## Asociaciones de enfermedades con SLC11A1

Los múltiples efectos pleiotrópicos en la activación de m nos llevaron a buscar la asociación de SLC11A1 en humanos con enfermedades autoinmunes e infecciosas (Shaw et al., 1996). Desde entonces, esto se ha replicado en múltiples estudios (Hofmeister et al., 1997; Esposito et al., 1998; Maliarik et al., 2000; Sanjeevi et al., 2000; Singal et al., 2000; Yang et al., 2000 ) También propusimos que el alelo de alta expresión (iii) del polimorfismo (GT) n estaría asociado con la enfermedad autoinmune, y el alelo de baja expresión (ii) con la infección. Esto también se ha mantenido en múltiples autoinmunes (Shaw et al., 1996; Esposito et al., 1998; Sanjeevi et al., 2000) e infeccioso (Shaw et al., 1997; Bellamy et al., 1998; Gao et al. ., 2000) estudios de enfermedades (específicamente tuberculosis), lo que sugiere que puede haber algunas fuerzas selectivas de equilibrio que mantienen ambos alelos en la población. A este respecto, es interesante que las frecuencias alélicas para el alelo SLC11A1 (ii) estén en el rango de 0.14–0.20 en África occidental y meridional (0.16 colores del Cabo sudafricano; 0.20 Malawi; 0.14 Gambia) en comparación con 0.25–0.29 en el norte de Europa (0.25 Reino Unido; 0.27 Suecia; 0.29 Letonia) poblaciones y 0.36 en Brasil. Recientemente, demostramos (M. Hibbard, M. Levin y J. M. Blackwell, inédito) que los individuos homocigotos 3/3 producen niveles más altos de TNFα y tienen un riesgo significativamente mayor de enfermedad clínica meningocócica grave. Esto es de nuevo consistente con la alta expresión de SLC11A1 que genera respuestas proinflamatorias durante la bacteriemia aguda. Curiosamente, el alelo (iii) también está en un haplotipo 5 'significativamente asociado con la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis dérmica post-kala-azar en Sudán (Mohamed et al., Presentado), consistente con las respuestas proinflamatorias reguladas por SLC11A1 (por ejemplo, TNFα alto; Barral -Netto et al., 1991) asociados con esta enfermedad y con el alelo (ii) en una frecuencia más alta (0.27) en esta población. Por lo tanto, la capacidad de un organismo patógeno o no de provocar una respuesta proinflamatoria aguda también puede contribuir a las fuerzas selectivas que influyen en el mantenimiento de los alelos SLC11A1 en la población. En muchos estudios, también se ha encontrado evidencia de polimorfismos en los haplotipos 3 'que contribuyen por separado a la susceptibilidad a la enfermedad, lo que sugiere que todavía hay otras mutaciones funcionales por identificar en el hombre. Claramente, serán necesarios análisis genéticos de población más detallados para comprender la relación entre los haplotipos más complejos y la incidencia de enfermedades en diferentes regiones geográficas. Actualmente estamos secuenciando a través del SLC11A1 para identificar nuevos polimorfismos de codificación funcional y / o reguladores que contribuyen a la susceptibilidad a la enfermedad en diferentes poblaciones.

## Evolución de la familia de genes Nramp

Tras nuestra demostración de que Slc11a1 y Slc11a2 ​​tienen diferentes modos de acción, nos interesó la evolución de los genes Nramp. En levadura, los homólogos de Nramp incluyen SMF1 / 2/3. Smf1p / 2p se localizan en la membrana externa y participan en el transporte de Cu2 +, Mn2 + de alta afinidad y, posiblemente, Fe2 + hacia la célula (Supeck et al., 1996; Cohen et al., 2000). Smf1p y Smf2p se localizan en distintos compartimentos celulares bajo el hambre de metal (Portnoy et al., 2000): Smf1p se acumula en la superficie celular; Smf2p está restringido a vesículas intracelulares. Smf3p es bastante distintivo. Está regulado negativamente por hierro y se localiza en membranas vacuolares independientemente del tratamiento con metal. La levadura que carece de Smf3p muestra síntomas de inanición por hierro, lo que sugiere que Smf3p ayuda a movilizar (es decir, el flujo de salida) de hierro de las reservas vacuolares. Murine Slc11a2 ​​pero no Slc11a1 complementa el transporte Mn2 + y el fenotipo sensible al pH en smf1 / 2 doble KO Saccharomyces cerevisiae (Pinner et al., 1997). Esto podría explicarse por la localización diferencial (p. Ej., Membrana versus vacuola) en levaduras, o las funciones de symport versus antiport. De manera similar, el SLC11A2 humano, pero no el SLC11A1, complementa el fenotipo sensible al EGTA y al pH de la cepa pdt1Delta deficiente de transportador de metal divalente de Schizosaccharomyces pombe (Tabuchi et al., 1999). Aquí, el reemplazo del extremo N de SLC11A2 con el de SLC11A1 da como resultado una quimera inactiva, lo que indica que el extremo N de Nramps de mamíferos regula la función de manera diferencial.

Para tratar de determinar cuándo los Nramps de mamíferos divergieron en localización y función, se secuenciaron dos ortólogos (fSlc11α / fSlc11β) (Sibthorpe et al., Presentado) del pez globo Fugu rubripes. El análisis filogenético muestra que ambos son similares a los mamíferos Slc11a2, lo que sugiere que Slc11a2 ​​es ancestral. El entorno genético para ambos es sinténico con el cromosoma 15 del ratón, de acuerdo con la duplicación de genes en la ubicación ancestral de Slc11a2. Solo fSlc11α tiene una señal de direccionamiento endosomal supuesta basada en tirosina N-terminal y rudimentos de una secuencia N-terminal rica en Pro-Ser similar a Slc11a1. La transfección transitoria de construcciones etiquetadas con proteínas fluorescentes verdes en células renales epiteliales humanas confirma una localización endosómica / lisosómica tardía para fSlc11α, consistente con la divergencia hacia una función similar a Slc11a1. Se requiere trabajo adicional para ver si fSlc11α es un antiportador. Curiosamente, el SLC11A1 humano complementa a Drosophila malvolio, lo que sugiere que la actividad antportport tipo Slc11a1 surgió antes en la evolución de Nramp. También se producen dos clases funcionales de proteínas NRAMP en plantas: Arabidopsis thaliana (At) SLC11A1 y Oriza sativa (Os) SLC11A1 y 3 representan una clase; AtSLC11A2–5 y OsSLC11A2 el otro (Curie et al., 2000). AtSlc11a1 y OsSlc11a1 complementan la levadura fet3fet4 mutante defectuosa en los transportes de hierro de baja y alta afinidad, mientras que AtSlc11a2 ​​y OsSlc11a2 ​​no lo hacen.

## Nramps en la interfaz host-patógeno

La familia de genes Nramp está altamente conservada en procariotas y eucariotas, con ortólogos ahora identificados en bacterias patógenas que están bajo el control de Slc11a1 en m (Agranoff et al., 1999; Kehres et al., 2000). Esto significa que los requisitos propios del patógeno para los iones de metales de transición y la variación genética en sus propias proteínas relacionadas con Nramp pueden estar influenciados por el polimorfismo y la función de los mamíferos Nramp, proporcionando una interfaz dinámica sobre la cual las fuerzas de la evolución han estado actuando.

## Papel de otros transportadores de cationes divalentes en la enfermedad.

Muchas moléculas median en la homeostasis de los iones metálicos, incluidas las metalochaperonas, ferritinas, metalotioninas y proteínas reguladoras que ajustan la expresión o función de los transportadores de tráfico de metales. Una disfunción en cualquier parte de la vía de detección de metales puede causar enfermedad. Sin embargo, los dos transportadores de cobre asociados con las enfermedades de Menkes y Wilson (revisado por Harris, 2000) proporcionan paralelos biológicos moleculares y celulares particularmente intrigantes con las funciones Slc11a. Para ambos, la complementación de levadura se ha utilizado con éxito para detectar defectos en el transporte de cobre y ensayos de células de mamíferos para identificar defectos en el tráfico intracelular. La proteína Menkes (ATP7A) es una ATPasa de tipo P defectuosa en la deficiencia de cobre recesiva ligada al cromosoma X, que conduce a una disminución del cobre en el cerebro, neurodegeneración y muerte prematura. Más de 150 mutaciones ocurren en el hombre. ATP7A normalmente se localiza en la red trans-Golgi (TGN) y realiza ciclos constitutivos a través de la membrana plasmática en condiciones basales de cobre (Petris y Mercer, 1999). Bajo tensión de cobre, ATP7A se recluta preferentemente a la membrana plasmática donde emite cobre. La endocitosis de ATP7A tanto bajo cobre basal como elevado está mediada por un motivo de dileucina C-terminal (Francis et al., 1999; Petris y Mercer, 1999), pero otras señales, incluidas las ubicadas en el dominio transmembrana, están involucradas en la retención y recuperación de TGN desde endosomas hasta el TGN (Ambrosini y Mercer, 1999). ATP7A tiene ocho dominios transmembrana y un terminal N largo con seis sitios de unión a cobre (GMxCxxC). Estos están involucrados en la detección de cobre, proporcionan señales para la reubicación del TGN a la membrana plasmática (Strausak et al., 1999) y el cobre de chaperona al centro del canal, aunque se puede entregar algo de cobre directamente al canal (Voskoboinik et al. ., 1999). El cobre también se une a los residuos Cys, Met y His en dominios transmembrana, formando un complejo transitorio durante el transporte. Las mutaciones en los pacientes influyen en las funciones de unión, localización, tráfico o transporte de cobre. En la enfermedad de Wilson autosómica, más de 200 mutaciones en ATP7B influyen en la función de localización y transporte y están asociadas con altos niveles de cobre en los tejidos, particularmente en el hígado, el cerebro y los riñones. ATP7B se localiza en el TGN y en los endosomas tardíos (Harada et al., 2000) en condiciones basales, con una alta redistribución de cobre que influye en las vesículas y en las vacuolas / membranas apicales en las células polarizadas. En este caso, la unión de cobre al dominio N-terminal se asocia con un cambio conformacional que conduce al debilitamiento de la interacción entre el dominio / bucle de unión a ATP y el dominio N-terminal (Vanderwerf et al., 2001). La alteración en las interacciones dominio-dominio se combina con cambios en las propiedades de unión a nucleótidos del dominio de unión a ATP, lo que sugiere que la unión de cobre al extremo N modula la actividad de transporte. El aumento de cobre conduce a la hiperfosforilación de ATP7B, y el nivel de fosforilación se correlaciona con la localización intracelular. La regulación por fosforilación requiere la presencia en la proteína del dominio N-terminal debidamente plegado.

## Uso del conocimiento de ATP7A y ATP7B para relacionar la estructura Slc11a1 con la función

En la actualidad, sabemos muy poco acerca de cómo la secuencia y estructura de la proteína Slc11a1 / SLC11A1 se relaciona con la función. La Figura 3 proporciona una representación esquemática de cómo Slc11a1 podría estar en la membrana endosómica / lisosómica tardía, destacando las características clave de la molécula que pueden ser importantes para funcionar. Quedan por responder varias preguntas clave.

La pregunta 1 es determinar la topología de Slc11a1 y Slc11a2 ​​en endosomas tempranos versus endosomas tardíos / membranas vesiculares de lisosomas. La lógica dicta que ambos tendrán los extremos N y C y el circuito de transporte intertransmembrana con motivo de transporte conservado 8 en la cara citoplasmática, con los circuitos intertransmembrana 1, 3, 5, 7, 9 y 11 mirando hacia la vesícula. La actividad Symport versus antiport determina entonces que el catión divalente fluye de la vesícula al citosol para los endosomas tempranos positivos para Slc11a2 ​​y del citosol a la vesícula cuando los endosomas / lisosomas tardíos positivos para Slc11a1 son ácidos. Sin embargo, Kuhn et al. (2001) informaron que el anticuerpo contra el bucle intertransmembrana 7 inhibió la captación de cationes divalentes en fagosomas m aislados, mientras que un anticuerpo anti-terminal C no lo hizo. Aunque esto último puede deberse a que el anticuerpo no proporcionó el impedimento estérico correcto, el primero solo podría explicarse por el anticuerpo que accede al compartimento intravesicular bajo el modelo "lógico". Paradójicamente, Kuhn et al. (2001) también informan que los inhibidores de PKC disminuyeron la importación de hierro a los fagosomas. Esto sería coherente con el acceso PKC a los sitios de unión en Slc11a1, todos los cuales se encuentran en la misma cara que los terminales N y C. A menos que PKC pueda, en este caso, obtener acceso intravesicular, existe una inconsistencia interna en los datos. Para determinar la topología, actualmente estamos analizando la fluorescencia en células permeabilizadas selectivamente después de la transfección transitoria de construcciones Slc11a1 etiquetadas con bucle intertransmembrana.

La pregunta 2 es determinar cuándo la actividad de symport versus antiport divergió en la familia de genes Nramp. En nuestro laboratorio, nos acercamos a esto de dos maneras: (i) permitiendo que la evolución nos informe de la divergencia en la función mediante la prueba de fSlc11α / β en pantallas funcionales de ovocitos; y (ii) probar construcciones quiméricas Slc11a1 / Slc11a2 ​​para identificar regiones que determinan la función antiport frente a symport. Entonces podemos identificar secuencias conservadas en estas regiones que podrían informarnos más sobre la evolución molecular de las funciones divergentes.

La pregunta 3 es determinar el aminoácido clave y los motivos que determinan el rango y la especificidad del transporte de cationes divalentes Slc11a1. Por analogía con otras proteínas de unión y transporte de iones metálicos, es probable que los residuos conservados de Cys, His y Met sean importantes. La Figura 3 demuestra la posible yuxtaposición de residuos conservados alrededor de un supuesto poro formado por los 12 dominios transmembrana en la membrana vesicular. Los residuos conservados, y un motivo CxxC conservado, también se producen en bucles intertransmembrana en ambas caras de la molécula. Cinco residuos Cys, His y Met específicos de Slc11a1 se conservan en mamíferos y pollos Slc11a1. Actualmente estamos probando la función de transporte y la especificidad de cationes divalentes utilizando construcciones con mutación dirigida en residuos conservados específicos de Slc11a1 / Slc11a2 ​​y Slc11a1.

La pregunta 4 se relaciona con los cambios en la función Slc11a1 con activación m y la importancia potencial de los sitios de unión de PKC y el dominio rico en Pro-Ser N-terminal. La actividad de PKC se ha implicado en la regulación de la absorción de hierro por los fagosomas (Kuhn et al., 2001). Usando construcciones mutadas, estamos observando los efectos sobre la fosforilación de proteínas, determinando qué sitios PKC afectan la función de transporte, y usando ensayos desplegables de glutatión-S-transferasa para buscar interacciones entre los dominios N y / o C-terminales y los supuestos citosólicos bucles de Slc11a1.

## Fomentar nuestra comprensión del papel de SLC11A1 en la enfermedad

Los iones metálicos de transición son esenciales para la vida y participan en muchas funciones celulares. Estos incluyen la regulación de la transcripción a través de proteínas de unión al ADN y elementos de respuesta de metales, las funciones de cientos de enzimas, incluidas las metaloproteasas, SOD e iNOS, y funciones celulares como la fusión endosómica (Aballay et al., 1995). El hecho de que Slc11a1 transporte Fe2 +, Zn2 + y Mn2 + y posiblemente otros cationes divalentes proporciona la clave crucial para la pleiotropía. Esto refleja no solo la regulación directa del contenido de cationes divalentes vesiculares, sino también los efectos secundarios sobre las concentraciones en el citosol y el medio celular circundante. El desafío para el futuro es determinar con precisión cuáles de los efectos pleiotrópicos directos o indirectos de SLC11A1 son más importantes para determinar cada una de las múltiples asociaciones de enfermedades que ahora se observan en el hombre.