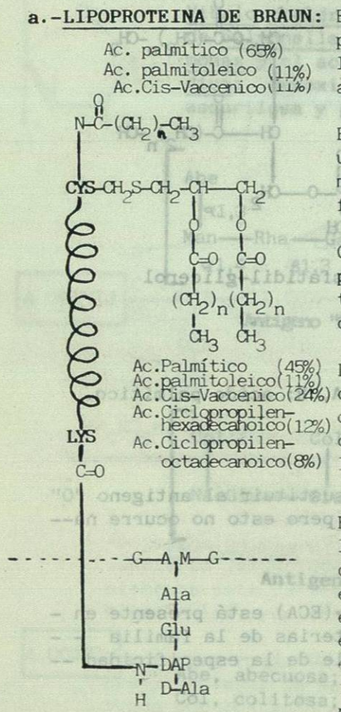
3) **PROTEINAS:** El patrón de proteínas de la membrana externa es dominado por -- unas cuantas proteínas que en condiciones constitutivas se encuentran presentes en gran número, por lo que han sido designadas co- **PROTEINAS MAYORES**, estas incluyen a la **Lipoproteina de Braun,** - **La Proteina OmpA** y las **Porinas.** En menor cantidad se encuentran- un grupo de 10 - 12 proteinas conocidas como **PROTEINAS MENORES,** - éstas incluyen a **las proteinas LamB, Tsx, TonA, Fep A, BtuB** y la - **fosfolipasa.** Este patrón es flexible y en consecuencia, las -- proteínas menores pueden producirse en grandes cantidades cuando la célula se hace crecer en diversas condiciones como son en presencia de maltosa, limitación de fosfato ú otros nutrientes ó - en presencia de información genética adicional. Estas proteínas - intervienen en la difusión transmembranal de solutos de alto peso molecular , actuan como receptores de fagos y colicinas, se les - relaciona con la replicación del DNA y en la división celular.

## PROTEINAS MAYORES

a.-**LIPOPROTEINA DE BRAUN:** Es un polipéptido pequeño de 58 aminoacidos, con un - peso molecular de 7,200 daltones; de un 80 - 88% de - la cadena polipeptídica posee un configuración de -- alfa hélice.




En una célula hay aproximadamente 700,000 moléculas , un tercio de las cuales se hayan asociadas covalentemente con la peptidoglicana y 2/3 se encuentran en -- forma libre.

Cada molécula de lipoproteina lleva sustituyentes lipídicos en el extremo N-terminal, y se asocia covalentemente con la peptidoglicana a través del extremo -- carboxilo terminal.

Las cadenas polipeptídicas tienen a asociarse unas -- con otras formando **trímeros.** Solo una molécula del - oligómero se asocia covalentemente con la peptidoglicana, se denomina **"forma unida"**, las otras dos se -- llaman **forma no unida" ó "forma libre".**

Esta proteína no está expuesta en la superficie celular sino que se encuentra anclada en la cara interna- de la membrana externa. Su función es estructural, - estabilizando la arquitectura del complejo membrana - externa-peptidoglicana dado su unión covalente con -- esa macromolécula. Sin embargo, no es escencial para- el crecimiento; las mutantes que carecen de ella muestran una estructura inestable de la pared con multi-- ples evaginaciones de la membrana externa y liberación de enzimas periplásmicas, pero no se observan defectos notables en el crecimiento o en la morfología celular.



b) **PROTEINA Omp A:** Es un polipéptido con un peso molecular de 35,159 daltones rico en B-tira plegada. En la membrana externa muestra- dos grandes dominios, el N-terminal insertado en la bicapa y - el C-terminal expuesto en su cara interna.

Es una proteína transmembranal que se encuentra expuesta tanto en la superficie celular como en el espacio periplásmico, pero no es capaz de formar oligómeros, aunque si se asocia con la - lipoproteina. No es una porina, y dado que su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida disminuye cuando la temperatura de solubilización se incrementa a 100°C, ha motivado- que los investigadores le llaman **"Proteina modificable por el- calor".**

Esta proteína se asocia con la capa de peptidoglicana subyacente pero de una manera no covalente.

Se le ha relacionado con la conjugación bacteriana, puesto que estabiliza la pareja conjugativa. las mutantes que carecen de proteína OmpA son deficientes en conjugación mediada por el - pili F; asimismo se ha observado que la conjugación bacteriana es inhibida por la proteína OmpA purificada.

la proteina OmpA juega tambien un papel significativo en el -- mantenimiento de la morfología celular y en la integridad de - la membrana externa debido a su intercción con la mureína.

Esta proteína sirve también como receptor de fagos como el -- Tuli* y K3 de Escherichia coli. Se ha demostrado que juegan un- papel importante como sitios receptores de colicinas.

d) P O R I N A S

Son proteinas que producen "poros" transmembranales de difusión pasiva que permiten el influjo de nutrientes y el eflujo de productos de desecho. Estas proteínas forman canales llenos de agua cuyo diámetro determina el límite de exclusión, es decir, el tamaño de las moléculas hidrofílicas que pueden atravezarlos.

La pared interna del canal posee aminoácidos cargados cuyo número y- posición determinan la selectividad iónica del poro, por lo que estas --- aberturas pueden ser selectivas para cationes o aniones, pero generalmente es débil para iones pequeños como el $K^+$ o $Cl^-$.

Las subunidades que constituyen las porinas examinadas hasta ahora - poseen pesos moleculares que oscilan entre 28,000 y 48,000 daltones, y -- tienen la capacidad de asociarse usualmente en grupos de tres; estos - oligomeros mantienen una asociación no covalente fuerte con la peptidoglicana y las moléculas de lipopolisacárido.

Hasta la primera mitad de 1987 han sido identificadas y caracterizadas 44 porinas de 32 especies pertenecientes al 25% de las familias de -- bacterias gramnegativas, para algunas de las cuales proporcionaremos in-- formación enseguida.

Estas proteínas han sido agrupadas en dos categorías según la selectividad de sustrato que muestren:

A) PORINAS ESPECIFICAS O "POROS ESPECIFICOS"

B) PORINAS INESPECIFICAS O "POROS GENERALES"

A) **PORINAS INESPECIFICAS o POROS GENRALES**

Son proteínas que constituyen poros relativamente inespecíficos o canales que permiten el paso indiscriminado de moléculas hidrofílicas pequeñas con un peso molecular inferior a los 600 daltones a través de la membrana externa. Estas porinas no interactúan con el soluto con una gran afinidad la selectividad es determinada sólo por el diámetro de la partícula con respecto al diámetro del poro.

Hay varios tipos de porinas inespecíficas con características comunes; su peso molecular es de 35,000 - 40,000 daltones, y son las proteínas más ácidas de la membrana externa. Se asocian fuertemente con la peptidoglicana.

En condiciones de cultivo normales, Escherichia coli K12 produce dos porinas inespecíficas o poros generales, la proteina **Omp F** y la proteína **OmpC**. Salmonella typhimurium sintetiza tres porinas generales, la **proteina OmpF, OmpC** y **Omp D.**

Originalmente debido al gran número de moléculas ( $\sim 10^5$) de este tipo que se encuentran en la membrana externa se les llamó **PROTEINAS MATRICES** ya que se creía que eran responsables de darle la forma a la célula.

Estas moléculas son ricas en B-tira plegada mostrando muchos fragmentos de 11 a 15 aminácidos formando la tira, pero contienen un bajo contenido de nido de aminoacidos cargados. Los segmentos plegados atraviezan varias veces el grosor de la membrana.

Estas proteínas existen como **trimeros** que forman una estructura hexagonal. Cada unidad contiene un triplete de agujeros que se fusionan en el centro de la membrana y sales como un solo canal en la cara interna de la membrana externa desembocando en el espacio periplásmico.

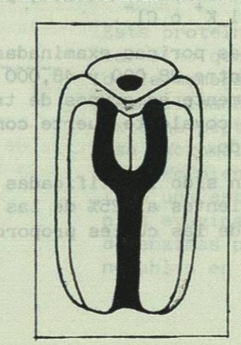


Fig. 1. Diagrama que representa la estructura de las porinas generales OmpC y OmpF.



Los monómeros individuales son inactivos para formar canales.

En las proteinas OmpF el diámetro del poro es de 1.2 nm y en las OmpF es de 1.1 nm, ambas prefieren solutos cargados positivamente sobre los cargados negativamente cuya difusión es más lenta. Los solutos hidrofóbicos como los antibioticos B-lactámicos son excluidos. Estas porinas muestran una fuerte afinidad por el LPS.

Adicionalmente a su papel como poros de difusión, las porinas inespecíficas actúan tambien como receptores para fagos . La proteina **OmpF** es el receptor para los fagos K20, TuIa, T2 y P1 ; en tanto que la proteina **Omp C** funciona como receptor de los fagos TuIb, Me1, T4 y 434 de E. coli.

**B) PORINAS ESPECIFICAS o POROS ESPECIFICOS.**

Estas proteínas forman canales que muestran una gran especificidad de sustrato, constitutivamente son sintetizadas pequeñas cantidades de estas moléculas, por lo que han sido consideradas tambien como **PROTEINAS MENORES,** pero su síntesis se incrementa bajo condiciones específicas de cultivo llegando a equiparar en número a las PROTEINAS MAYORES, es decir las proteinas Omp F y OmpC.

Entre las proteínas de este tipo encontradas en Escherichia coli **se** pueden citar la **proteina LamB** que permite el paso de maltosa y maltodextrinas a través de la membrana externa, la cual es sintetizada en cantidades apreciables solo en presencia de maltosa; la proteína **Tsx** responsable de la difusión de nucleósidos y receptor del fago T6.

Otros canales de difusión específica que forman parte de un sistema de transporte altamente específico son la **proteína TonA** involucrada en la toma de ferricromo-$Fe^{3+}$ y que a la vez actúa como receptor de los fagos T1, T5 y Ø80 y de la colicina M; **la proteina FepA** involucrada en la toma del quelato $Fe^{3+}$-enteroquelina y como receptor de la colicina B, **la proteína Fec** responsable de la toma de complejos de $Fe^{3+}$-citrato, **la proteína Cir** comprometida en la toma de complejos $Fe^{3+}$-?. Todas estas proteinas son sintetizadas en cantidades considerables cuando el cultivo se encuentra en condiciones de limitación de fierro.

La **proteína BtuB** forma un canal específico para la toma de vitamina B12 y actúa como receptor de las colicinas BF23 y E, esta proteína es sintetizada en cantidades considerables cuando la célula se encuentra en ayuno de dicha vitamina.

En condiciones de ayuno de fosfato, E. coli fabrica cantidades numerosas de **proteina PhoE,** la cual constituye un poro específico para la toma de este anión. Esta proteina consiste de un trimero de subunidades, cada una de ellas con su respectivo poro como se muestra en la Figura 2. Normalmente en la célula esta proteína aparece en muy pequeñas cantidades.

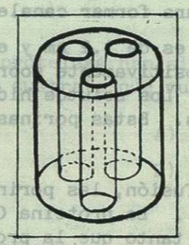


Fig. 2. Esquema que muestra la organización estructural de las porinas PhoE de E. coli y la proteina F de Pseudomonas aeruginosa.

En Pseudomonas aeruginosa se han detectado dos porinas, la **proteína F** - que funciona el el transporte de fosfato y la **proteina P** cuya función como poro de difusión es pobre. La proteina F existe como trimeros en la que - cada subunidad posee su propio poro. Existen evidencias de que esta pro-- teína forma dos tipos de poros, los canales pequeños que son los más abundantes, y los canales pequeños escasos. Debido a esta característica no es posible la entrada de antibioticos por lo que se explica la alta resistencia de este microorganismo a los antibióticos. En la figura 3 mostamos la arquitectura de la Proteina P.

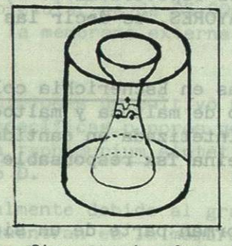


Fig.3. Representación esquemática de la proteina P de Pseudomonas aeruginosa.

Por cortes finos se ha determinado que la envoltura de las bacterias - gramnegativas -cuyo grosor es de 25 nm- consiste de dos membranas trilaminares separadas por una capa de peptidoglicana y el espacio periplásmico;- sobre ella está colocada la **membrana externa**, y en su parte inferior se lo caliza la **membrana citoiplasmica o membrana interna.**

Cuando la membrana externa se sometió a estudios de microscopía electró nica empleando la técnica de criofractura, se encontró que consiste de una bicapa discontínua de lípidos. Estas discontinuidades aparecen como partí culas de 4 - 8 nm de diámetero, son las proteínas membranales .

Tomando en consideración las características fisicoquímicas de las molé culas que la integran, presentamos el siguiente modelo sobre la arquitectu ra de la membrana externa donde se muestra que está formada por una bicapa de lipidos sw 7.5 nm de grosor, en su cara externa posee preferencialmente moléculas de **LPS** y en la interior **fosfolípidos**, en ella se encuentran - embebidas **proteinas** como las **porinas y la proteína OmpA.** La **lipoproteína de Braun** se localiza exclusivamente en la cara interna y se asocia covalen temente con la capa de peptidoglicana subyacente que tiene 2.5 nm de gro-- sor. El **espacio periplásmico**, de 7.5 nm de grosor separa las dos membra-- nas.



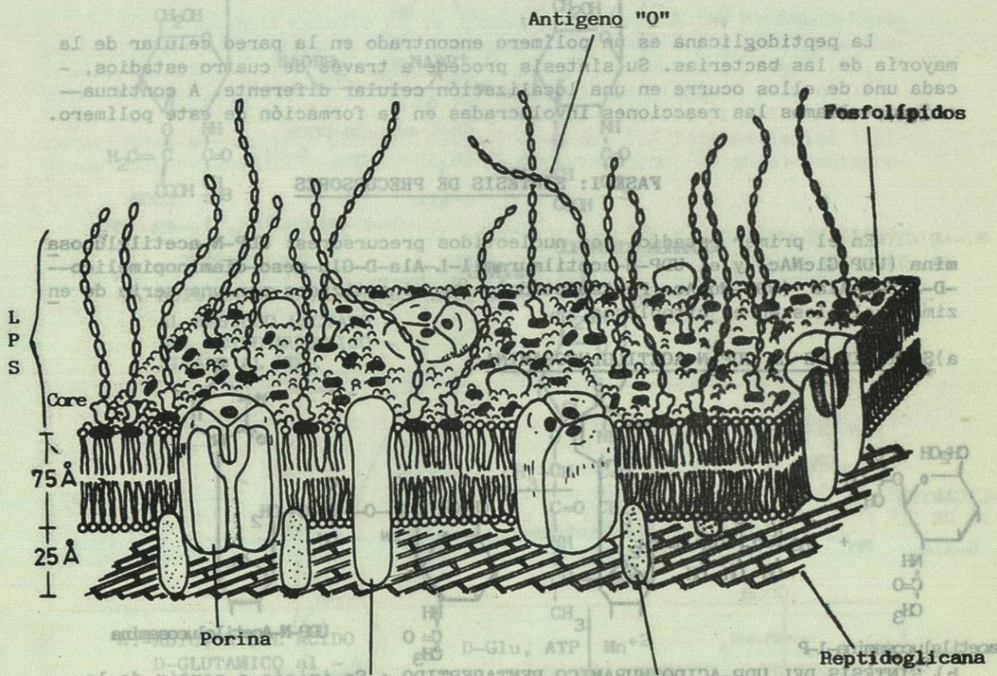



**Fig. 11. Representación esquematica donde se ilustra la posible arquitectura molecular de la pared celular de Escherichia coli**